

Identifizierung pflanzenabhängig-regulierter Gene in *Ustilago maydis*

Dissertation

An der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
vorgelegt von

Christian Aichinger

München, 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Regine Kahmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Ebel

Dissertation eingereicht am: 04.12.2000

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2001

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Müller, P., **Aichinger, C.**, Feldbrügge, M. and Kahmann, R. (1999). The MAP kinase *kpp2* regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol* 34, 1007-17.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungen und Fachbegriffe	VII
1 Einleitung	1
1.1 Ustilago maydis	1
1.2 Die molekulare Analyse der Inkompatibilitätsloci <i>a</i> und <i>b</i>	3
1.3 Signale und Signalverarbeitung in <i>U. maydis</i>	4
1.4 Pflanzeninduzierte Gene in <i>U. maydis</i>	7
1.5 "Enhancer trapping"	8
1.6 Voraussetzungen für die Etablierung eines "enhancer trap"-Mutagenese-systems in <i>U. maydis</i>	9
1.7 Zielsetzung	11
2 Ergebnisse	12
2.1 Expressionsanalyse bekannter Gene während der biotrophen Phase	12
2.1.1 Differentielle Genexpression von <i>mfa1</i> , <i>lga2</i> , <i>bE1</i> , <i>bW2</i> und <i>prf1</i> während der biotrophen Phase von <i>U. maydis</i>	12
2.1.2 Prf1 ist essentiell für die <i>mfa1</i> -Transkription in Tumorgeweben	14
2.1.3 GFP als <i>in vivo</i> -Reporter gen für differentiell exprimierte Gene: Nachweis der Expression von <i>mfa1</i> und <i>lga2</i> während des gesamten Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	15
2.2 REMI-"Enhancer Trap"-Mutagenese	20
2.2.1 Der experimentelle Aufbau der REMI-"Enhancer trap"-Mutagenese	20
2.2.2 Isolierung von <i>U. maydis</i> -Mutanten mit pflanzenspezifischer GFP-Expression	22
2.3 Analyse der Mutanten aus der REMI-"enhancer trap"-Mutagenese	25
2.3.1 Die Mutante #114	25
2.3.2 Die Mutante #1486	26
2.3.2.1 Eine regulatorische Funktion von GA-Wiederholungen in der Mutante #1486?	29
2.3.2.2 Der Phänotyp der Δ GA-Stämme kann nicht komplementiert werden	31
2.3.3 Die Mutante #219	32
2.3.4 Die Mutante #1685	35
2.3.4.1 Die <i>pig3</i> -Expression wird zu verschiedenen Zeitpunkten im Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> an- und abgeschaltet	42
2.3.4.2 Deletionsmutanten für <i>pig3</i> und <i>pig5</i>	44
2.3.4.3 Isolierung von Mutanten, die erhöhte <i>pig3</i> -Expression zeigen	45
2.3.4.3.1 <i>pig3</i> ist negativ reguliert	45

2.3.4.3.2 Versuch zur Isolierung von Mutanten, die in der Regulation von <i>pig3</i> gestört sind	47
3 Diskussion	49
3.1 Tumorspezifische Expression der Gene der <i>a</i>-und <i>b</i>-Paarungstyploci	49
3.3 Identifizierung pflanzeninduzierter Gene in <i>U. maydis</i> durch REMI-"enhancer Trap"-Mutagenese	52
3.3.1 Pig2: Eine ungewöhnliche Protein-Disulfid-Isomerase?	55
3.3.2 #1486: Die Deletion einer GA-Region führt zu reduzierter <i>mfa1</i> -Expression und vermindertem filamentösem Wachstum	57
3.3.3 Die Mutante #1685: eine Insel differentiell exprimierter Gene?	58
3.3.4 Die <i>pig3</i> -Expression ist negativ reguliert	59
3.3.5 Die Rolle des <i>p</i> -Locus in der pathogenen Entwicklung	60
3.3.6 Signale zur Induktion der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i>	66
4 Zusammenfassung	69
5. Materialien und Methoden	70
5.1 Material und Bezugsquellen	70
5.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	70
5.1.2 <i>Ustilago maydis</i> -Stämme	70
5.1.3 Verwendete Kits	72
5.1.4 Chemikalien, Proteine und Enzyme	72
5.1.5 Nukleinsäuren	72
5.1.6 Sonstige Materialien	73
5.1.7 Plasmide	73
5.2 Plasmidkonstruktionen	75
5.3 Mikrobiologische und genetische Methoden	77
5.3.1 Bestimmung der Zelldichte von <i>U. maydis</i>	77
5.3.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	77
5.3.3 Kultivierung von <i>U. maydis</i>	78
5.3.4 CaCl ₂ -Transformation von <i>E. coli</i> (Cohen <i>et al.</i> , 1972)	78
5.3.5 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	78
5.3.6 Transformation von <i>U. maydis</i> (Gillissen <i>et al.</i> , 1992; Schulz <i>et al.</i> , 1990)	78
5.3.7 Test auf filamentöses Wachstum bei <i>U. maydis</i> (Puhalla, 1968)	79
5.3.8 Test auf Pathogenität (Gillissen <i>et al.</i> , 1992)	79
5.3.9 REMI-Mutagenese (Bölker <i>et al.</i> , 1995)	79
5.3.10 Selektion von Mutanten anhand der GFP-Expression in axenischer Kultur	80
5.4 Molekularbiologische Standardmethoden (Sambrook <i>et al.</i>, 1989)	80
5.4.1 Handhabung von Nukleinsäuren	80
5.4.1.1 Fällung von DNA	80

5.4.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	80
5.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren	80
5.4.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	80
5.4.2.2 "plasmid rescue"	81
5.4.2.3 Maxipräparation von Cosmid- bzw. Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	81
5.4.2.4 DNA-Isolierung aus <i>U.maydis</i> (Hoffmann und Winston, 1987)	81
5.4.2.5 RNA-Isolierung aus <i>U.maydis</i>	81
5.4.3 <i>in vitro</i> -Modifikationen von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	82
5.4.3.1 Restriktion von DNA	82
5.4.3.2 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente	82
5.4.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten	83
5.4.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	83
5.4.4.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	83
5.4.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	83
5.4.4.3 Denaturierende Formamid/Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA	83
5.4.4.4 Denaturierende Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese von RNA	84
5.4.5 Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren auf Membranen	84
5.4.5.1 Transfer von DNA (Southern-Blot; Southern, 1975)	84
5.4.5.2 Transfer von RNA (Northern-Blot)	84
5.4.5.3 Herstellung einer DNA-Hybridisierungssonde (Feinberg und Vogelstein, 1984)	84
5.4.5.4 Spezifischer Nachweis von an Membranen gebundener DNA	85
5.4.5.5 Spezifischer Nachweis von an Membranen gebundener RNA	85
5.4.5.6 Koloniehybridisierung	86
5.4.6 Sequenzierung von Nucleinsäuren	86
5.4.7 Sequenzanalyse	86
5.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	86
5.4.9 Anchor-PCR (REMI-"rescue")	87
5.5 Zellbiologische Methoden	87
5.5.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	87
5.5.2 Mikroskopische Analyse der Reporterstämme auf der Oberfläche von Maisblättern und während der biotrophen Phase	87
5.5.3 Bildverarbeitung	88
Literaturverzeichnis	89
Danksagung	96
Lebenslauf	97
Anhang	98

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	PC	Phenol/Chloroform
ad	"zum Endvolumen auffüllen"	PCR	Polymerase Kettenreaktion
Amp	Ampicillin	PEG	Polyethylenglycol
aa	Aminosäure(n)	Pellet	Zentrifugationssediment
bp	Basenpaar(e)	pg	Picogramm
ca.	cirka	Primer	Startoligonukleotid für die PCR
cAMP	cyclisches Adenosinmono- phosphat	rATP	Riboadenosintriphosphat
CC	Charcoal (Aktivkohle)	RNA	Ribonukleinsäure
cDNA	reverses Transkript der Boten-Ribonukleinsäure	RNase	Ribonuklease
cm	Zentimeter	rRNA	ribosomale RNA
d. h.	das heißt	s.	siehe
DIC	"Differential interference contrast"	S	Svedbergeinheit
DMSO	Dimethylsulfoxid	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	sec	Sekunde(n)
DNase	Desoxyribonuklease	s. o.	siehe oben
dATP (A)	Desoxyadenosintriphosphat	s. u.	siehe unten
dCTP (C)	Desoxycytidintriphosphat	Tab.	Tabelle
dGTP (G)	Desoxyguanosintriphosphat	Tris	Trishydroxymethylamino- methan
dITP (I)	Desoxyinosintriphosphat	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
dNTP (N)	Desoxynukleosidtriphosphat	Upm	Umdrehungen pro Minute
dTTP (T)	Desoxythymidintriphosphat	UV	ultraviolettes Licht
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat	V	Volt
ds	doppelsträngig	W	Watt
F	Farad und auch Phenylalanin	z. B.	zum Beispiel
Fuz ⁺	filamentöser Phänotyp		
g	Gramm		
GFP	"green fluorescent protein"		
h	Stunde(n)		
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser		
kb	Kilobasenpaar=1000bp		
M&M	Materialien und Methoden		
M	Molar		
mM	Millimolar		
MOPS	3-(N-Morpholino)propan- sulphonat		
mRNA	Boten-RNA		
Mrd	Milliarde oder 10 ⁹		
OD	Optische Dichte		
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm		
ORF	Offener Leserahmen		

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*

Pilze sind sessile, heterotrophe Organismen, die auf die Aufnahme von Metaboliten aus ihrer Umgebung angewiesen sind. Diese können sowohl aus toter Materie stammen, als auch in Lebensgemeinschaften mit Wirtsorganismen aufgenommen werden. Letztere, als Biozöosen bezeichnete Lebensgemeinschaften werden Symbiosen genannt, wenn sie für beide Partner von Nutzen sind. Nützt ein Partner den Metabolismus des anderen aus, ohne daß dieser Vorteile erlangt, ist die Beziehung parasitär. Wird dabei der Wirt vom Pilz abgetötet und erst anschließend kolonisiert, handelt es sich um necrotrophe Parasiten. Biotrophe Pilze hingegen töten ihren Wirt nicht, sondern entnehmen die Metabolite dem laufenden Stoffwechsel.

Ustilago maydis ist ein Vertreter der fakultativ biotrophen Basidiomyceten. Systematisch wird er der Familie der Brandpilze zugeordnet (Ordnung der Ustilaginales, Klasse der Heterobasidiomyceten). Sein enges Wirtsspektrum beschränkt sich auf *Zea mays* und *Euchlena mexicana* (Teosinte), die als Wildform des Mais diskutiert wird (Doebley, 1992; Wang *et al.*, 1999). *U. maydis* kann alle oberirdischen Organe seiner Wirtspflanzen befallen, wobei es zum Ausbleichen von chlorophyllhaltigem Gewebe (Chlorose), Induktion der Anthocyan-Biosynthese und schließlich zur Tumorbildung kommt (Christensen, 1963). Die Vollendung des sexuellen Zyklus von *U. maydis* ist dabei eng an den Krankheitsverlauf gekoppelt und kann in drei Kernphasen unterteilt werden (Banuett und Herskowitz, 1996; Christensen, 1963). Haploide Sporidien vermehren sich hefeartig durch Knospung, leben saprophytisch und sind nicht pathogen. Kompatible Sporidien können über Konjugationshyphen fusionieren und ein filamentöses Dikaryon ausbilden (Rowell und DeVay, 1954; Snetselaar, 1993). In diesen Stadien ist nur wenig Pilzmaterial auf der Pflanzenoberfläche zu finden, da die filamentösen Dikarien von *U. maydis* nicht proliferieren. Der morphologische Wechsel ausgehend von den Sporidien kann aber im Labor auf aktivkohlehaltigen Medien nachvollzogen werden (Day *et al.*, 1971; Holliday, 1974). Für alle weiteren Entwicklungsschritte benötigt *U. maydis* den Kontakt mit der Wirtspflanze. Im Folgenden differenziert sich das filamentöse Dikaryon zu appressorienartigen Strukturen, die das Eindringen in den Wirt ermöglichen (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1993). Die Hyphen dringen vermutlich in meristematisches Gewebe vor, in welchem sie die Vermehrung dieses Gewebes anregen. Die einzige bis dahin sichtbare Reaktion der Pflanze ist die Synthese von Anthocyan. Pilzliches Wachstum innerhalb der Pflanzen scheint demzufolge von den Wirtspflanzen zwar erkannt, aber durch die Pflanzenabwehr nicht bekämpft zu werden. Sichtbar wird die Infektion durch *U. maydis* etwa nach sieben Tagen mit der Ausbildung der Tumore. Die einzelnen Tumore

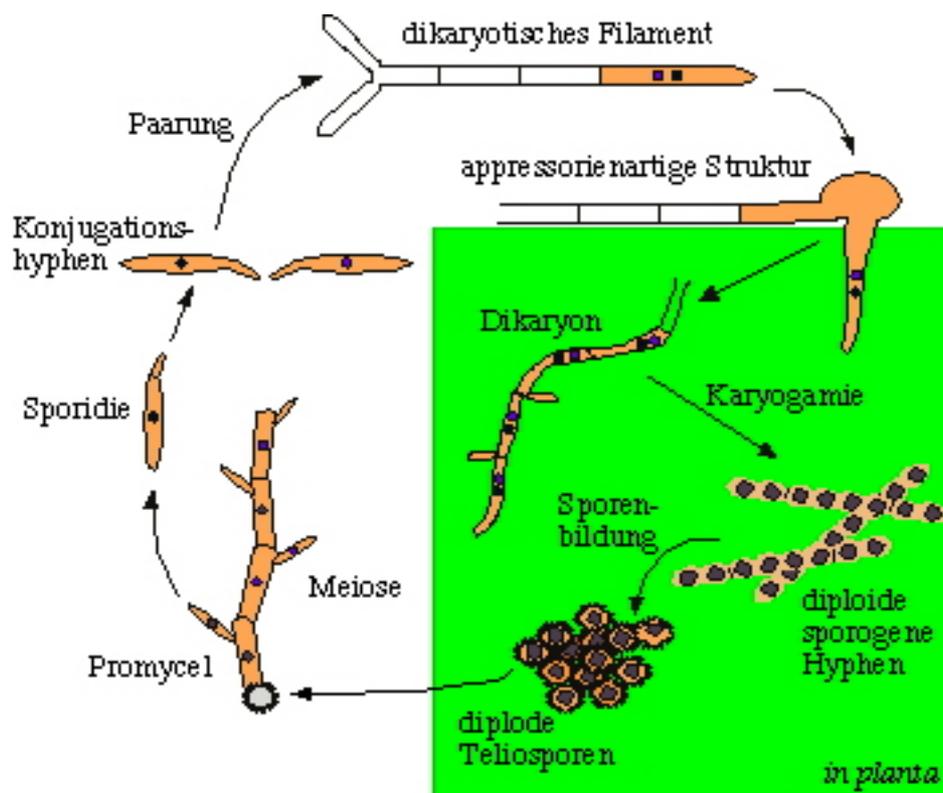


Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. Erläuterungen siehe Text.

stellen nahezu monoklonale Ereignisse dar, so daß angenommen wird, daß die Infektion durch *U. maydis* ein seltenes Ereignis ist (H. Böhnert, persönliche Mitteilung). Das Tumorgewebe selbst ist ein "sink Organ", in das Assimilate der Pflanze transportiert werden (Billet und Bournett, 1978). *U. maydis*-Zellen differenzieren in diesem Stadium zu sporogenen Hyphen. Während dieser Phase findet auch die Kernfusion statt, der sich eine massive Proliferation anschließt. Etwa zehn Tage nach der Infektion runden sich die sporogenen Hyphen ab und bilden Präsporen, die schließlich zu Teliosporen, der diploiden Dauerform reifen (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1993). Die Teliosporen werden durch Wind und Regen verbreitet und keimen aus, wenn geeignete Umweltbedingungen den Beginn einer neuen Vegetationsphase signalisieren. Dabei bildet sich zuerst ein Promycel, in das der diploide Kern einwandert und in dem die meiotische Teilung stattfindet. Mit der Abschnürung haploider Basidiosporen vom Promycel kann der Zyklus von neuem beginnen (Banuett und Herskowitz, 1996; Christensen, 1963 und Abb. 1). Fusion, filamentöses Wachstum und Pathogenität werden genetisch durch die zwei Inkompatibilitätsloci *a* und *b* kontrolliert (Puhalla, 1968; Rowell und DeVay, 1954). Der *a*-Locus ist biallelisch, mit den beiden Allelen *a1* und *a2*. Vom multiallelische *b*-Locus sind mindestens 20 verschiedene Allele bekannt (Kämper, persönliche Mitteilung). Für den Eintritt in den sexuellen Zyklus müssen

haploide Sporidien unterschiedliche *a* und *b*-Allele tragen. Durch Untersuchungen an künstlichen diploiden Stämmen konnten den beiden Paarungstyploci unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden (Holliday, 1961; Puhalla, 1969). Diploide Stämme, die heterozygot für *a* und *b* sind, wachsen filamentös und können in Pflanzen Symptome hervorrufen. Bei gleichen *a*- aber unterschiedlichen *b*-Allelen wachsen die Stämme hefeartig auf aktivkohlehaltigen Medien, sind aber in der Lage Pflanzen zu infizieren. Stämme mit unterschiedlichen *a*-Allelen und gleichem *b*-Allel wachsen hefeartig, sind aber nicht pathogen. Darüber hinaus konnte in "cytoduction"-Experimenten gezeigt werden, daß haploide Stämme, mit gleichen *b*- aber unterschiedlichen *a*-Allelen zwar fusionieren, aber kein filamentöses Dikaryon ausbilden können (Trueheart und Herskowitz, 1992). Daraus und im Vergleich zu haploiden Stämmen ergab sich, daß der *a*-Locus die Fusion haploider Sporidien vermittelt. Für filamentöses Wachstum werden zwei unterschiedliche *a*- und *b*-Loci benötigt. Die pathogene Entwicklung hingegen wird ausschließlich vom *b*-Locus bestimmt (Banuett und Herskowitz, 1989; Day *et al.*, 1971; Holliday, 1961; Puhalla, 1968).

1.2 Die molekulare Analyse der Inkompatibilitätsloci *a* und *b*

Der *b*-Locus von *U. maydis* trägt zwei divergent transkribierte Gene *bE* und *bW*, die für Homeodomänen-Proteine kodieren (Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad *et al.*, 1989; Schulz *et al.*, 1990). Ein *bE/bW*-Paar unterschiedlicher Allelität z. B. *bE1/bW2* reicht für die pathogene Entwicklung aus (Gillissen *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die *bE*- und *bW*-Proteine in nichtallelischer Kombination Heterodimere ausbilden, die dann als Transkriptionsfaktoren wirken (Kämper *et al.*, 1995; Romeis *et al.*, 2000). Somit kann auch ein haploider Stamm, CL13 (*a1bE1/bW2*), der *bE1*- und *bW2*-Proteine exprimiert, den Lebenszyklus durchlaufen (Bölker *et al.*, 1995).

Die molekulare Analyse der beiden *a*-Allele zeigte, daß sie für ein Pheromon/Rezeptor-System kodieren (Bölker *et al.*, 1992; Urban *et al.*, 1996). Der *a1*-Locus trägt zwei Gene, *mfa1* und *pra1*. *mfa1* kodiert für eine Pheromonvorstufe, *pra1* für einen Siebentransmembranrezeptor, der das Pheromon der *a2*-Stämme erkennen kann (Spellig *et al.*, 1994; Urban *et al.*, 1996). Der *a2*-Locus enthält entsprechend die Gene *mfa2* und *pra2*, sowie zwei weitere Gene, *lga2* und *rga2*, deren Funktion unbekannt ist (Urban *et al.*, 1996).

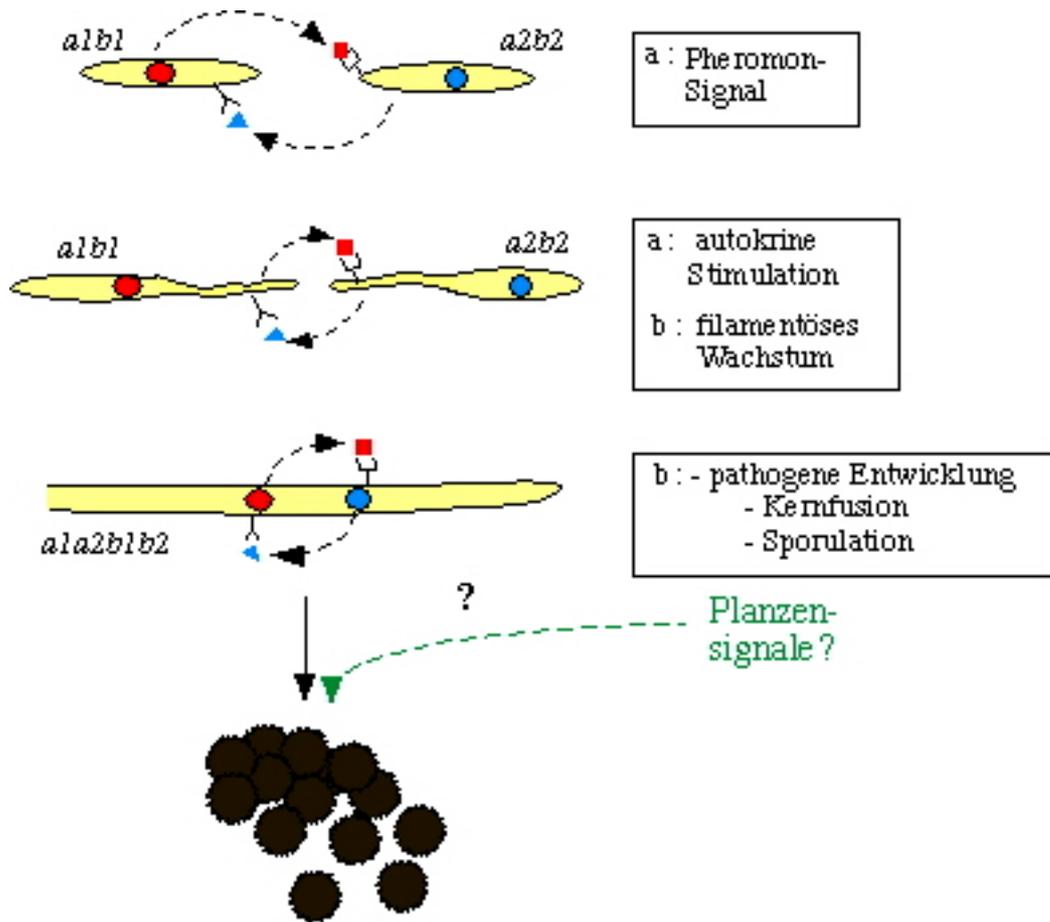


Abbildung 2: Die Inkompatibilitätsloci *a* und *b* von *U. maydis* kontrollieren die Fusion, das filamentöse Wachstum und die Pathogenität. Der *a*-Locus kontrolliert die Fusion haploider Sporidien durch ein Pheromon/Rezeptorsystem. Für filamentöses Wachstum werden unterschiedliche *b*-Allele ebenso wie eine kontinuierliche, autokrine Pheromonstimulation benötigt. Die pathogene Entwicklung wird durch den *b*-Locus reguliert. Signale der Wirtspflanze spielen bei der Interaktion zwischen Pilz und Pflanze vermutlich eine wesentliche Rolle.

1.3 Signale und Signalverarbeitung in *U. maydis*

Die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Signalen ist für alle Organismen die zentrale Voraussetzung, um adäquat auf Umweltveränderungen reagieren zu können. Die Signale können dabei sowohl abiotischen als auch biotischen Ursprungs sein. Während der Entwicklung von *U. maydis* sind eine Reihe von Signalen und Signalverarbeitungsprozessen denkbar, die nicht nur eine Anpassung an verschiedene Nahrungsmittelangebote, sondern auch die spezifische Intraspezieskommunikation zwischen kompatiblen Kreuzungspartnern und die

Interspezieskommunikation zwischen Pilz und Pflanze ermöglichen. Bislang sind in *U. maydis* Komponenten zweier Signaltransduktionswege beschrieben, die für die Fusion kompatibler Sporidien notwendig sind: der Pheromonweg und eine cAMP-abhängige Signaltransduktionskaskade (Bölker *et al.*, 1992; Gold *et al.*, 1994; Regenfelder *et al.*, 1997; Banuett, 1995; Hartmann *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1999; Urban *et al.*, 1996).

Die cAMP-Kaskade wird von einem bislang nicht näher definierten Umweltsignal aktiviert. Es wird über die α -Untereinheit des G-Proteins Gpa3 auf die Adenylatcyclase Uac1 übertragen (Gold und Kronstad, 1994). Diese kann cAMP bilden, das die Trennung der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A, Adr1, von der regulatorischen Untereinheit, Ubc1, vermittelt. Die daraus resultierende Aktivierung von Adr1 führt zu einer Induktion der *a*- und *b*-Gene. Umgekehrt führt die Deletion aktivierender Komponenten der cAMP-Kaskade zu einer Reduktion sowohl der basalen als auch der induzierten Expression von *mfa1*. Entsprechend sind solche Stämme steril (Gold *et al.*, 1997; Gold und Kronstad, 1994; Regenfelder *et al.*, 1997). Umgekehrt zeigen Mutanten der negativen regulatorischen Komponente der Proteinkinase A, *ubc1*, oder das konstitutiv aktive Allel von *gpa3* (*gpa3*_{Q206L}) starke Induktion der *a*- und *b*-Gene (Krüger *et al.*, 1998; Regenfelder *et al.*, 1997).

Der Pheromonweg wird über die Bindung von Pheromon an seinen Rezeptor aktiviert. Nullmutanten der Pheromon- wie auch der Rezeptorgene sind steril (Bölker *et al.*, 1992). Das Pheromonsignal wird vermutlich über ein noch nicht identifiziertes G-Protein auf ein MAP-Kinase-Modul weitergeleitet. Als Komponenten solch eines Moduls wurden kürzlich die Proteine Kpp2, Fuz7 und Kpp4 identifiziert (Banuett, 1995; Müller *et al.*, 1999 und P. Müller, persönliche Mitteilung). Mutationen in der MAPK Kpp2, der MAPKK Fuz7 und der MAPKKK Kpp4 führen zu einer reduzierten Expression der *a*- und *b*-Gene, sowie einer reduzierten Pathogenität.

Die Signale der cAMP-Kaskade sowie des Pheromonwegs werden auf den Transkriptionsfaktor Prf1 geleitet. *prf1* kodiert für ein HMG-Box-Protein, welches über die Bindung an kurze DNA-Motive (PRE-Boxen), die sich in den Promotoren der *a*- und *b*-Gene befinden, die Expression dieser Gene reguliert (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996). Darüber hinaus konnten im Prf1-Protein fünf putative Phosphorylierungsstellen für PKA-Proteine und sechs solcher Erkennungssequenzen für die Phosphorylierung durch MAP-Kinasen identifiziert werden, die für die Funktion von Prf1 notwendig sind (Hartmann *et al.*, 1996; M. Leibundgut und M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). Prf1 reguliert sowohl die basale als auch die induzierte Expression der *a*- sowie die Expression der *b*-Gene (Hartmann *et al.*, 1996). Vor der Fusion haploider Sporidien kommt es zu einer Induktion der *a*- und *b*-Gene. Nach der Fusion, im filamentösen Dikaryon, führt die Anwesenheit des aktiven bE/bW-Heterodimers zur Repression der Pheromon- und Pheromonrezeptorgene (Urban *et al.*, 1996). Entsprechend dieser Regulation sind *prf1*-

Deletionstämme steril. Da Prf1 aber auch die Expression der *b*-Gene reguliert, sind *prf1*-Deletionstämme apathogen, auch wenn sie unterschiedliche *b*-Allele tragen. Dieser Defekt kann aber durch die konstitutive Expression kompatibler bE- und bW-Proteine komplementiert werden (Hartmann *et al.*, 1996).

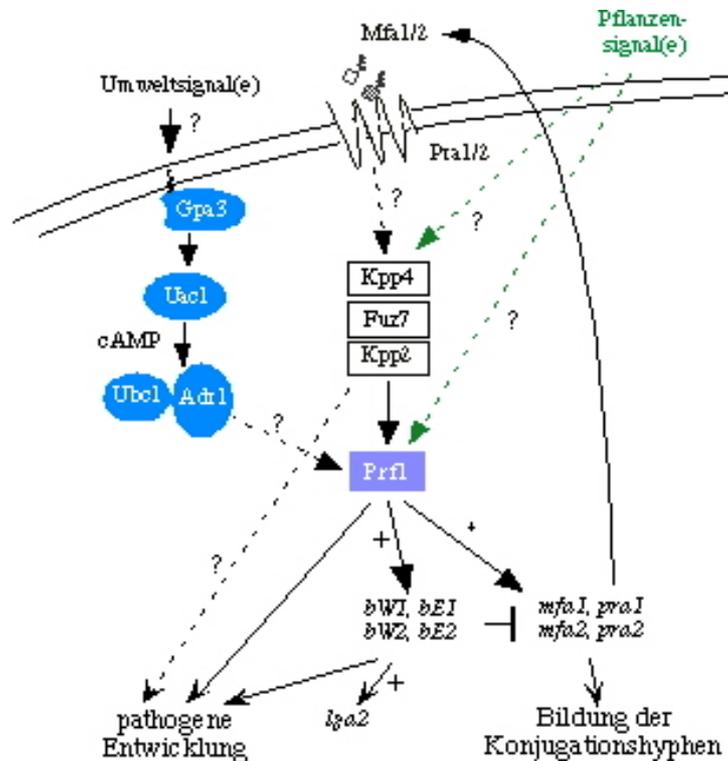


Abbildung 3: Der Pheromon- und cAMP-Signaltransduktionsweg von *U. maydis*. Die einzelnen Genprodukte sind im Text beschrieben. Aktivierende und reprimierende Einflüsse sind durch entsprechende Pfeile dargestellt. Erläuterungen siehe Text.

In Mutationsanalysen konnte für fast alle Komponenten beider Kaskaden, wie z.B. Gpa3, Uac1, Kpp2 oder Kpp4 neben ihrer Rolle in der *a*- und *b*-Genexpression auch eine Beteiligung an der pathogenen Entwicklung beobachtet werden (Hartmann *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1999; Regenfelder *et al.*, 1997). Die Pathogenitätsdefekte konnten dabei nicht oder nur teilweise durch die konstitutive Expression eines aktive_bE/bW_Heterodimers komplementiert werden. Daraus wurde geschlossen, daß durch den Pheromon-signalweg wie auch den cAMP-Weg neben Prf1 weitere, für die pathogene Entwicklung notwendige Faktoren aktiviert werden. Da diese Aktivierung sich auf die biotrophe Phase auswirkt, sind Pflanzenfaktoren als Signale höchst wahrscheinlich.

1.4 Pflanzeninduzierte Gene in *U. maydis*

Bislang sind die Prozesse, die nach dem Eindringen von *U. maydis* in die Wirtspflanze stattfinden, nur auf morphologischer Ebene beschrieben. Das Dikaryon wächst nach der Penetration zunächst intrazellulär, wobei die Zytoplasmamembran nicht beschädigt wird (Snetselaar und Mims, 1993). In diesem frühen Stadium findet keine Kernteilung statt, der Pilz wächst unidirektional und hinterläßt leere Abschnitte durch Septenbildung. In diesen frühen biotrophen Stadien ist nur wenig Pilzmaterial vorhanden, da keine Proliferation stattfindet. Einige Tage nach der Infektion befindet sich *U. maydis* zwischen den Pflanzenzellen und beginnt als Dikaryon zu proliferieren (Snetselaar und Mims, 1993). Zeitgleich mit der Tumorentwicklung treten sporogene Hyphen auf, aus denen sich Prä- und später Teliosporen entwickeln (Snetselaar und Mims, 1993). *U. maydis* durchläuft während der biotrophen Phase eine ganze Reihe morphologischer Veränderungen, die bislang aber nicht durch molekulare Marker differenziert werden können. Die einzelnen morphologischen Transitionen legen jedoch den Schluß nahe, daß für die Ausbildung der Infektionssymptome wie auch für die Vervollständigung des Lebenszyklus eine signalvermittelte Interspezieskommunikation von Bedeutung ist. Die entsprechenden Pflanzensignale könnten über verschiedene Signalwege weitergeleitet und zur Induktion pflanzenspezifisch exprimierter Gene oder zu posttranslationalen Proteinmodifikationen führen, die letztendlich die morphologischen Transitionen in den einzelnen Stadien bewirken. Die Analyse differentiell exprimierter Gene könnte deshalb dazu beitragen, die molekularen Prozesse der pathogenen Interaktion besser zu verstehen und die einzelnen Stadien auf molekularer Ebene zu charakterisieren.

In den letzten Jahren konnten bereits mittels revers genetischer Verfahren in verschiedenen phytopathogenen Pilzen pflanzenspezifisch exprimierte Gene isoliert werden (Pieterse *et al.*, 1991; Basse *et al.*, 2000; Hahn und Mendgen, 1997; Spellig *et al.*, 1996). Über ihre Homologie zu bekannten Proteinen konnten einige Gene dem Primär- und Sekundärmetabolismus, aber z. B. auch Signaltransduktionskaskaden zugeordnet werden (Basse *et al.*, 2000; Hahn und Mendgen, 1997; Spellig *et al.*, 1996). Erstaunlicherweise konnte in keiner der Nullmutanten für diese Gene ein Bezug zur pathogenen Entwicklung festgestellt werden. Andererseits wurde eine differentielle Expression für Gene, wie z. B. *MPG1* aus *Magnaporthe grisea* festgestellt, die aus Mutanten mit Pathogenitätsdefekt isoliert wurden (Talbot *et al.*, 1993). *MPG1* ist in den Appressorien, also bereits sehr früh in der pathogenen Entwicklung induziert. Deshalb wurde vermutet, daß die frühen biotrophen Stadien für die pathogene Entwicklung entscheidend sind. Um diese initialen Prozesse besser zu verstehen, wäre es wünschenswert, früh in der Entwicklung induzierte Gene zu isolieren.

1.5 "Enhancer trapping"

In *U. maydis* besteht das besondere Problem, daß während der frühen Phase der biotrophen Entwicklung kaum Pilzmaterial zu finden ist und dieses zudem nicht von der Wirtspflanze getrennt werden kann. Dadurch sind Techniken, die auf dem Vergleich von mRNA-Populationen beruhen oder auch genomische Ansätze, die die Betrachtung aller Gene erlauben, limitiert (Chu *et al.*, 1998; Spellig *et al.*, 1996). "enhancer trapping" ist eine alternative Methode zur Isolierung differentiell exprimierter Gene. Hier wird die Aktivität von *cis*-Elementen durch ein Reporterogen sichtbar gemacht. Da *cis*-Elemente alleine keine Promotoraktivität besitzen, muß das Reporterkonstrukt über einen Basalpromotor verfügen, der die Expression des Reportergens kontrolliert. Der Basalpromotor sollte allein keine oder nur geringe Transkription vermitteln. Aktiviert nun ein "enhancer"-Element den Basalpromotor, hat dies die Expression des Reportergens zur Folge ("enhancer trapping"). Reguliert ein *cis*-Element ein differentiell exprimiertes Gen, so kommt es auch zur differentiellen Expression des Reportergens (Bellen *et al.*, 1989; Lis *et al.*, 1983 und Abb.4).

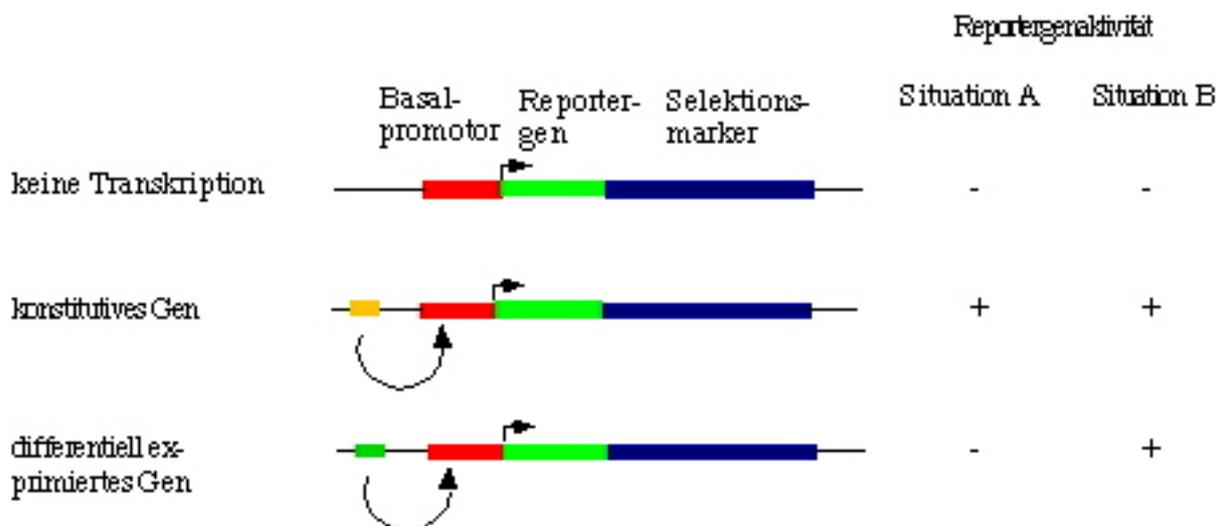


Abbildung 4: Mögliche Expression eines Reportergens nach Insertion eines "enhancer trapping" Reporterkonstruktes. Kommt es zu einer Insertion in einer Region, in der kein *cis*-Element die Expression des Basalpromotors induziert, ist keine Reportergenaktivität zu beobachten. Führt ein "enhancer"-Element zur konstitutiven Expression des Reportergens, ist unter allen untersuchten Bedingungen Reportergenaktivität nachzuweisen. Reguliert ein "enhancer"-Element die differentielle Expression des Reportergens, so kann zwischen verschiedenen Bedingungen unterschieden werden.

cis-Elemente sind häufig unabhängig von ihrer Orientierung aktiv. Abhängig vom Organismus können sie von einigen hundert Basen bis über viele Kilobasen hinweg aktiv sein. In Pilzen liegen "enhancer"-Elemente aber meistens in direkter Nachbarschaft der durch sie regulierten Gene.

Dadurch sollte der Phänotyp der Insertionsmutanten mit einem der naheliegenden Gene an der Insertionsstelle verbunden sein.

In einer Bank von Mutanten können über das Reportergerm die unterschiedlichsten Einflüsse auf die Expression, wie etwa verschiedene Zuckerquellen, Mangelbedingungen, Temperatur usw. untersucht werden. Es lassen sich aber auch Expressionsunterschiede während Zelldifferenzierungsprozessen beobachten. Besonders interessant ist dabei, daß diejenigen Einzelzellen, die einer unterschiedlichen genetischen Kontrolle unterliegen, auch innerhalb eines Zellverbandes unterschieden und über ganze Entwicklungszyklen hinweg verfolgt werden können. "enhancer-trapping" kam deshalb hauptsächlich bei entwicklungsbiologischen Fragestellungen in *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana*, aber auch in humanen Zelllinien oder Mäusen zum Einsatz. Es konnte dabei eine Vielzahl von Mutanten isoliert werden, die stadienspezifische Genexpression zeigten (Bellen *et al.*, 1989; Joyner, 1991; Sundaresan *et al.*, 1995).

1.6 Voraussetzungen für die Etablierung eines "enhancer trap"-Mutagenesesystems in *U. maydis*

Für eine umfassende "enhancer trap"-Mutagenese muß eine Bank von Mutanten hergestellt werden, die das Reporterkonstrukt an möglichst vielen verschiedenen Stellen im Genom trägt. Bei den Ansätzen in *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* wurden die Mutantenbanken durch Transposoninsertion erstellt (Bellen *et al.*, 1989; Cooley *et al.*, 1988; Smith und Parker, 1993). In *U. maydis* ist zwar kein Transposonmutagenesesystem etabliert, es besteht aber die Möglichkeit, Insertionsmutanten durch REMI-(restriction enzyme mediated integration) Mutagenese herzustellen (Bölker *et al.*, 1995). Dabei erfolgt die Transformation eines zirkulären Plasmids in Anwesenheit eines Restriktionsenzym (Abb. 5A). Dieses Enzym wird zusammen mit der Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen. Die Enzymkonzentration wird dabei so eingestellt, daß während dieses Vorgangs sowohl die Plasmid-DNA linearisiert als auch die genomische DNA geschnitten wird. Auf eine noch unbekannt Art erfolgt dann die Integration des Plasmids an einer Schnittstelle im Genom (Abb. 5B). Die Integrationsstelle hängt dabei von der Sequenzspezifität des verwendeten Restriktionsenzym ab (Bölker *et al.*, 1995; Kuspa und Loomis, 1992; Schiestl und Peters, 1991). Bei einem Restriktionsenzym, das eine Hexanukleotidsequenz erkennt, könnte somit im Durchschnitt etwa alle 4000 bp eine Insertion stattfinden. Die Reisolierung der die Insertionsstelle flankierenden Sequenzen erfolgt so, daß außerhalb des Reporterkonstruktes im Genom geschnitten wird. Nach Zirkularisierung kann das Plasmid inklusive der genomischen *U. maydis* DNA in *E. coli* transformiert werden ("plasmid rescue", Abb. 5C). Durch REMI-

Mutagenesen wurden bereits eine Reihe von Pathogenitätsmutanten in phytopathogenen Pilzen erzeugt (Maier und Schäfer, 1999). Einige der Gene wurden isoliert und in der Analyse ergab sich

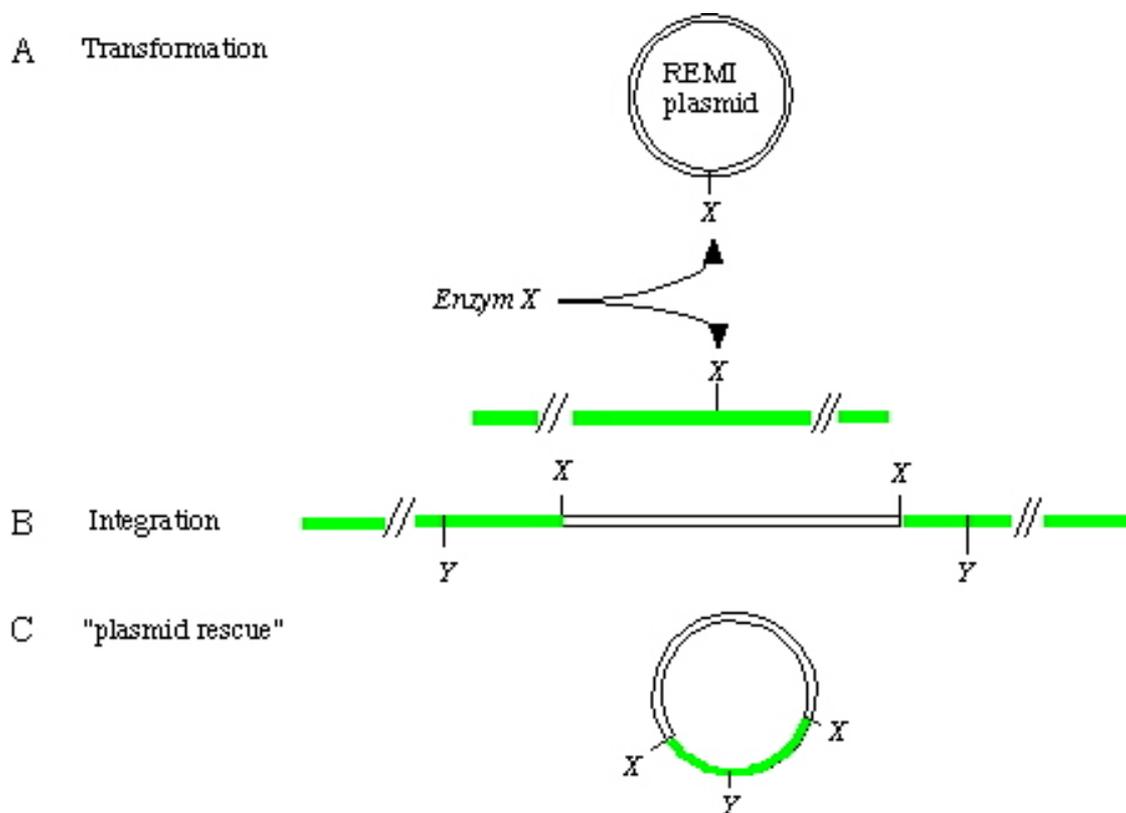


Abbildung 5: REMI-Insertion und "plasmid rescue". **A:** Das REMI-Plasmid wird zusammen mit einem Restriktionsenzym "X" transformiert. **B:** Die Integration erfolgt an der Schnittstelle des Enzyms "X". **C:** Durch Restriktion mit einem Enzym "Y", das nicht im REMI-Plasmid schneidet, kann, nach Zirkularisierung das Plasmid inklusive der flankierenden Sequenzen reisoliert werden ("plasmid rescue", s. M&M).

ein Zusammenhang zur pathogenen Entwicklung, wie z.B. bei den *pth*-Genen aus *M. grisea* (Sweigard *et al.*, 1998). Bei der Charakterisierung der Mutanten zeigte sich, daß in nur etwa 50% der Mutanten der Phänotyp mit der Insertion cosegregiert. Die Phänotypen in den übrigen Mutanten waren wahrscheinlich auf sogenannte "second site"-Mutationen zurückzuführen, die vermutlich durch das Restriktionsenzym und den Transformationsvorgang verursacht wurden.

Eine erfolgreiche "enhancer trap"-Mutagenese setzt ein geeignetes Reportergen zur Markierung der Expression voraus. Für *U. maydis* wurde kürzlich GFP als *in vivo*-Reportergen etabliert (Spellig *et al.*, 1996). Für die Aktivität von GFP sind keine weiteren exogenen Faktoren oder Substrate nötig, so daß das Protein direkt fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann (Chalfie *et al.*, 1994). Mit Hilfe von Fusionen eines konstitutiven Promotors an GFP konnte so bereits die biotrophe Entwicklung von *U. maydis* anhand der GFP-Fluoreszenz über den gesamten

Lebenszyklus hinweg verfolgt werden (Spellig, 1996). Darüber hinaus war unter der Kontrolle des Promotors von *gpa4* pflanzenspezifische Geninduktion beobachtet worden (Spellig *et al.*, 1996).

1.7 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, das Verständnis der molekularen Prozesse der für *U. maydis* spezifischen Wirts-Pflanzeninteraktion zu vertiefen. Dazu sollten pflanzenspezifisch-regulierte Gene isoliert und charakterisiert werden, da davon ausgegangen wurde, daß solche Gene in Pathogenitätsprozessen eine wichtige Rolle spielen. In einem ersten Schritt wurde die Expression bekannter, bereits außerhalb der Pflanze differentiell exprimierter Gene der Paarungstyploci *a* und *b* in Northernanalysen und durch GFP-Reporterstämme während der biotrophen Phase von *U. maydis* bestimmt. Dabei sollte untersucht werden, ob sich die Induktion wie auch die Repression einzelner Gene während des gesamten Lebenszyklus von *U. maydis* nachweisen lassen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte durch die Kombination von REMI-Mutagenese und GFP als Reporter gen ein "enhancer trap"-Mutagenese-System etabliert werden. Ziel war die Isolierung von Genen, die bereits früh in der biotrophen Phase induziert werden. Gene, die diese Kriterien erfüllen, sollten bezüglich ihrer Funktion und Regulation untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Expressionsanalyse bekannter Gene während der biotrophen Phase

Für Northernanalysen in Tumorgewebe wurden die Gene *mfa1*, *pra1*, *lga2*, *prf1*, *bE1* und *bW2* ausgewählt. Sie sind an der Fusion haploider Sporidien, filamentösem Wachstum und Pathogenität beteiligt und ihre Expression ist auf aktivkohlehaltigen Festmedien bereits gut untersucht (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996).

mfa1 schien zudem gut geeignet, um in *mfa1*:GFP-Reporterstämmen festzustellen, wie sich z.B. eine hohe *mfa1*-Expression vor der Fusion, die anschließend durch das bE/bW-Heterodimer reprimiert wird, auf das relativ stabile GFP-Protein auswirkt. *lga2* war als ein guter Marker für früh durch die b-Proteine induzierte Gene bekannt. Anhand eines entsprechenden Reporterkonstruktes sollte sich der Zeitpunkt der *lga2*-Expression bestimmen lassen. Darüber hinaus könnten sich auch so indirekt Hinweise zur Aktivität des b-Heterodimers während der biotrophen Phase gewinnen lassen.

2.1.1 Differentielle Genexpression von *mfa1*, *lga2*, *bE1*, *bW2* und *prf1* während der biotrophen Phase von *U. maydis*

Für Northernanalysen wurden junge Maispflanzen mit Mischungen von FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) infiziert. Diese beiden Stämme sind kompatibel und können nach ihrer Fusion Maispflanzen infizieren. Etwa sieben Tage nach der Infektion wurden die so induzierten Tumore kurz vor der Sporulation geerntet. Anschließend wurde das Expressionsniveau von *mfa1*, *pra1*, *lga2*, *prf1*, *bE1* und *bW2* bestimmt und mit der Expression in Mischungen von FB1 und FB2 auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien verglichen (M&M). Da der diploide, solopathogene Stamm FBD11 (*a1a2b1b2*) als Ausgangsstamm für die REMI-Mutagenese dienen sollte, wurde die Expression der ausgewählten Gene auch in diesem Stamm untersucht.

Die mRNA-Menge aus den verschiedenen Präparationen war anhand der konstitutiven Expression des *ppi1*-Gens so eingestellt, daß in allen Spuren vergleichbare Mengen an pilzlicher RNA geladen waren (Abb. 6). Aus dem Vergleich der eingesetzten Menge an Gesamt-RNA ergab sich, daß die Tumorgewebe etwa 1 - 2% Pilz-RNA enthielten.

In Mischungen von FB1 und FB2 sowie in FBD11 war nach 48 h Inkubation auf den Plattenmedium die Expression von *pra1*, *prf1*, *bE1* und *bW2* gut nachweisbar. Es wurde zudem eine hohe *lga2*-Expression beobachtet. Für *mfa1* konnte in den ebenfalls gute Expression nachgewiesen werden, in FBD11 Stämmen war diese aber nur gering (Abb. 6). In Tumorgewebe aus Infektionen

mit Mischungen der Stämme FB1 und FB2 war ebenfalls eine gut nachweisbare Expression von *mfa1* und *pra1* bzw. *bW2* zu beobachten, während *prf1* hier nur gering exprimiert war und *lga2*- und *bE1*-Transkripte nicht nachweisbar waren (Abb. 6). In FBD11 ergaben sich auf Plattenmedien im Vergleich zu Mischungen von FB1 und FB2 keine Expressionsunterschiede für *pra1*, *prf1*, *bE1* und *bW2*. Nur die *mfa1*-mRNA war hier nicht nachweisbar. In Tumorgewebe aus Infektionen mit FBD11 konnte im Vergleich zur Expression in Wildtypumoren eine geringere Expression von *mfa1*, *pra1* und *prf1* nachgewiesen werden, während alle übrigen Gene (*bW2*, *bE1* und *lga2*) wie in der Wildtypsituation exprimiert waren (Abb. 6). Mit der Repression von *lga2* in den Tumorgeweben zeigt sich für dieses Gen eine deutliche differentielle Expression im Vergleich zu der Situation auf Plattenmedien. Auch *mfa1* scheint in Tumorgewebe anders als im filamentösen Dikaryon exprimiert zu werden. Im Dikaryon wird Repression durch das b-Heterodimer beobachtet. Diese Repression scheint in der Pflanze nicht stattzufinden (Abb. 6). Für die *b*-Gene

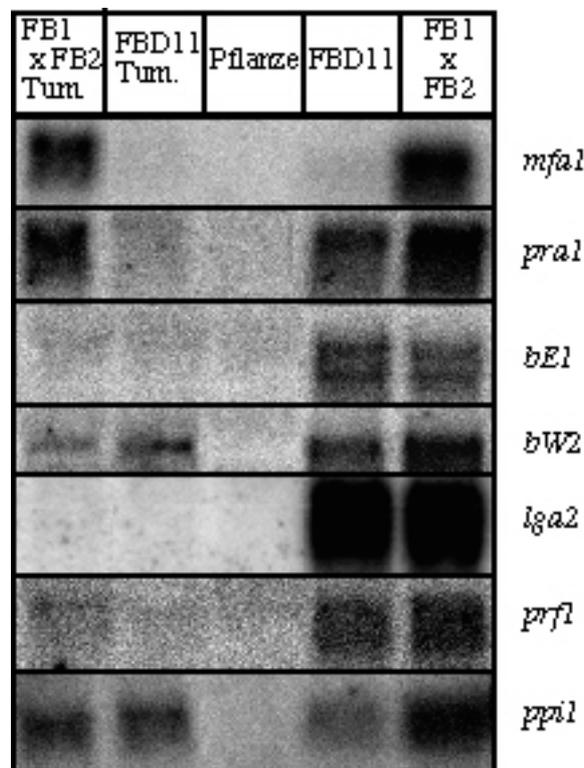


Abbildung 6: Expressionsanalyse von *mfa1*, *lga2*, *pra1*, *prf1*, *bE1* und *bW2* in Tumorgewebe im Vergleich zur Expression auf Plattenmedien. Die verwendeten Stämme, Stammkombinationen und Tumorgewebe sind über den Spuren angegeben. Für RNA-Präparationen von Plattenmedien wurden die Stämme und Stammkombinationen 48 h auf CM-Aktivkohle-Platten inkubiert. Bei RNA-Extraktionen von Plattenmedien wurden je 1,5 µg Gesamt-RNA, bei RNA aus Tumor- und Pflanzengeweben je 80 µg Gesamt-RNA pro Spur geladen. Die zur Detektion der Expression verwendeten Sonden sind in M&M angegeben.

ergab sich ein komplexeres Bild: *bE1* war in Tumorgewebe herunterreguliert, während für *bW2* konstitutive Expression in allen Stadien festgestellt wurde (Abb. 6). *prf1* war zwar im Vergleich zur Situation auf Plattenmedien im Tumor herunterreguliert. Es konnte aber Expression in allen Stadien nachgewiesen werden (Abb. 6). In Tumorgeweben, das aus Infektionen mit FBD11 hervorgegangen war konnte bezüglich der Expression von *bE1*, *bW2*, *prf1* und *lga2* kein Unterschied gegenüber Tumoren aus Infektionen mit FB1 und FB2 festgestellt werden. Auffallend waren aber die vergleichsweise geringen Mengen an *mfa1*- und *pra1*-Transkripten (Abb. 6).

Zusammengefaßt ergibt sich daraus eine tumorspezifische Induktion für die Gene *mfa1* und *pra1* bzw. eine Repression von *lga2* und *bE1*. Durch das Expressionsmuster dieser Gene im Tumor wird auf molekularer Ebene ein neues Stadium von *U. maydis* definiert, daß dieses von haploiden Sporidien und dem filamentösen Dikaryon deutlich abgrenzt.

2.1.2 Prf1 ist essentiell für die *mfa1*-Transkription in Tumorgeweben

Die differentielle Expression von *pra1*, *mfa1*, *lga2* und *bE1* in Tumorgewebe warf die Frage auf, welche Faktoren diese Gene während der biotrophen Phase regulieren. Anhand der Expression von *mfa1* und *lga2* sollte dies genauer untersucht werden, da für diese Gene bereits zwei Regulatoren, das Prf1-Protein und das bE/bW-Heterodimer bekannt und gut untersucht waren (Hartmann *et al.*, 1996; Romeis *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 1996). Da sowohl Prf1 als auch das b-Heterodimer für die Pathogenität essentiell sind, wurden Pflanzen mit den Stämmen HA103 (*alb^{con}*) und HA108 (*alb^{con}Δprf1*) infiziert. In HA103 sind die natürlichen Promotoren der *b*-Gene durch konstitutive Promotoren ersetzt. Somit ist die Expression der *b*-Gene in allen Stadien von *U. maydis* gewährleistet (Hartmann *et al.*, 1996). HA108 exprimiert, wie HA103, konstitutiv ein aktives bE1/bW2-Heterodimer. Zusätzlich trägt dieser Stamm eine Deletion des *prf1*-Gens. Dies erlaubt den Einfluß von Prf1 auf die *mfa1*-Expression zu untersuchen. Beide Stämme sind solopathogen und können ohne Kreuzungspartner Pflanzen infizieren. Weder in HA103 noch in HA108 läßt sich auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien *mfa1*-mRNA nachweisen, da *mfa* durch den aktiven b-Komplex reprimiert wird bzw. *prf1*-Deletionsstämme *mfa1* nicht exprimieren (Hartmann *et al.*, 1996).

In Tumoren aus Infektionen mit HA103 war eine deutliche Expression von *mfa1* zu beobachten, vergleichbar der Expression in Mischungen kompatibler haploider Stämme, die auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien gezogen wurden (Abb. 7). Im Gegensatz dazu war in Tumorgewebe aus Infektionen mit HA108 keine *mfa1*-Transkription nachzuweisen (Abb. 7). Demnach führt die konstitutive Expression eines aktiven bE/bW-Komplexes in Tumorgewebe nicht zu einer

Repression der *mfa1*-Transkription. Darüber hinaus ist *prf1* zwingend für die Transkription von *mfa1* in Tumorgewebe notwendig.

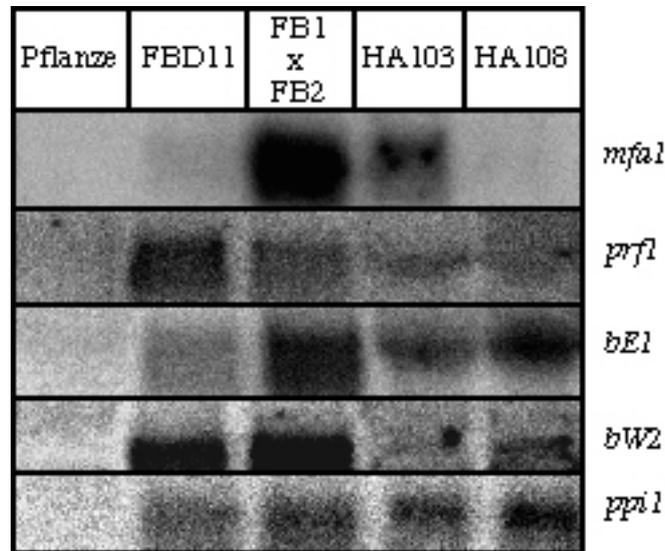


Abbildung 7: Der Einfluß von Prf1 und dem bE/bW Heterodimer auf die *mfa1*-Expression in Tumorgeweben. Die verwendeten Stämme, Stammkombinationen und Tumorgewebe sind über den Spuren angegeben. Für RNA-Präparationen von Plattenmedien, wurden die Stämme und Stammkombinationen 48 h auf CM-Aktivkohle-Platten bei 21°C inkubiert. Bei RNA-Präparationen von Plattenmedien wurden je 1,5 µg gesamt RNA, bei RNA aus Tumor und Pflanzengeweben je 80 µg gesamt RNA pro Spur geladen. Die für die Expressionsanalyse verwendeten DNA-Sonden sind in M&M angegeben.

2.1.3 GFP als *in vivo*-Reportergen für differentiell exprimierte Gene: Nachweis der Expression von *mfa1* und *lga2* während des gesamten Lebenszyklus von *U. maydis*

Die starken Unterschiede im Expressionsniveau von *mfa1* bzw. *lga2* zwischen Dikarien, die auf Plattenmedien wuchsen und Pilzzellen in Tumoren lieferten die Voraussetzungen dafür, einen Wechsel von Induktion und Repression mittels geeigneter GFP-Reporterstämme über den gesamten Lebenszyklus hinweg verfolgen zu können. Besonderes Interesse galt dabei der Expression in den frühen Stadien der Entwicklung von *U. maydis*, da durch REMI-“enhancer trapping” primär früh induzierte Gene isoliert werden sollten. Darüber hinaus sollte durch diese Untersuchungen auch eine Optimierung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse ermöglicht werden. Mit einem Longpass Filter (LP520 Zeiss) wurde in den folgenden Experimenten Licht mit Wellenlängen von mehr als 520 nm (Rotlicht) herausgefiltert und somit die rote Autofluoreszenz der Mais-Chloroplasten, welche die GFP-Fluoreszenz überlagert, eliminiert.

Die Induktion von *mfal* war in Mischungen von *mfal*:GFP-Reporterstämmen und einem kompatiblen Wildtypstamm bereits im Wassertropfentest untersucht worden (Spellig *et al.*, 1996). Dazu wurden die *U. maydis* Zellen in Wasser gewaschen, 1:1 gemischt und in einem Wassertropfen auf einer hydrophoben Oberfläche inkubiert. Die Induktion von GFP konnte dabei schon nach zwei Stunden beobachtet werden. Die *b*-abhängige Repression der *mfal*-Transkription war aber auch nach 8 h noch nicht zu erkennen (Spellig *et al.*, 1996). Dies wurde auf die lange Halbwertszeit des GFP-Proteins zurückgeführt.

Da die Selektion der REMI-Mutanten nach Infektion stattfinden sollte, wurde die Analyse der *mfal*-Expression auf der Oberfläche von Maisblättern und beim Wachstum innerhalb der Pflanze untersucht. Es wurden dazu neue Reporterstämmen generiert, da bei den bisherigen Stämmen die Leserahmen von *mfal* und GFP nicht basengenau ausgetauscht waren. In diesen Stämmen war deshalb eine Modifikation der Promotoraktivität nicht auszuschließen. Für den exakten Austausch von *mfal* durch GFP wurde im Plasmid pCA2 ein 952 bp langes Fragment aus dem *mfal*-Promotor im Startkodon von *mfal* an das SGFP-Gen fusioniert (M&M). Dieses Fragment enthält alle bislang bekannten und für die Regulation von *mfal* notwendigen Elemente (Urban *et al.*, 1996). Das Konstrukt wurde ektopisch in FB1 integriert, da die Deletion von *mfal* zur Sterilität führt. Ein Problem bei ektopischen Integrationen ist, daß regulatorische Elemente an der Integrationsstelle die Expression der Reporterkonstrukte beeinflussen können. Deshalb wurde in einem Vorexperiment die *mfal*-Expression von vier unabhängigen Transformanden (CA2-1, Ca2-2, CA2-3, Ca2-4) im Kreuzungstest auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien untersucht und mit den bekannten Expressionsdaten verglichen. Die Reporterstämmen wurden dazu im Verhältnis 1:1 mit einem FB2-Stamm gemischt, auf aktivkohlehaltige Plattenmedien getropft. Nach 24 h Inkubation wurde die Menge an GFP-Protein fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (nicht gezeigt). Dabei konnten zwischen den einzelnen Transformanden keine Expressionsunterschiede festgestellt werden. Das Expressionsniveau in den Einzelzellen war jedoch uneinheitlich. Etwa 15 % der Sporidien zeigten GFP-Expression. Waren Konjugationshyphen ausgebildet worden so konnte in etwa 50% der Zellen Fluoreszenz beobachtet werden, die darüber hinaus im Vergleich zu Sporidien wesentlich stärker war. In filamentösen Dikarien wurde die geringste GFP-Fluoreszenz beobachtet, wobei in etwa 20% der Filamente keine Fluoreszenz zu sehen war. Nach 24 h war demnach eine Induktion von *mfal* in induzierten und fusionsbereiten Zellen zu erkennen. Darüber hinaus konnte auch die *b*-abhängige Repression durch Abnahme der Fluoreszenz in den filamentösen Dikarien beobachtet werden.

Für die Expressionsanalyse von *mfal* auf der Blattoberfläche wurden der Reporterstamm CA2-1 im Verhältnis 1:1 mit FB2 gemischt und jungen Maispflanzen injiziert. Die Proben wurden 24 Stunden nach der Infektion entnommen und die GFP-Menge fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (Abb. 8).

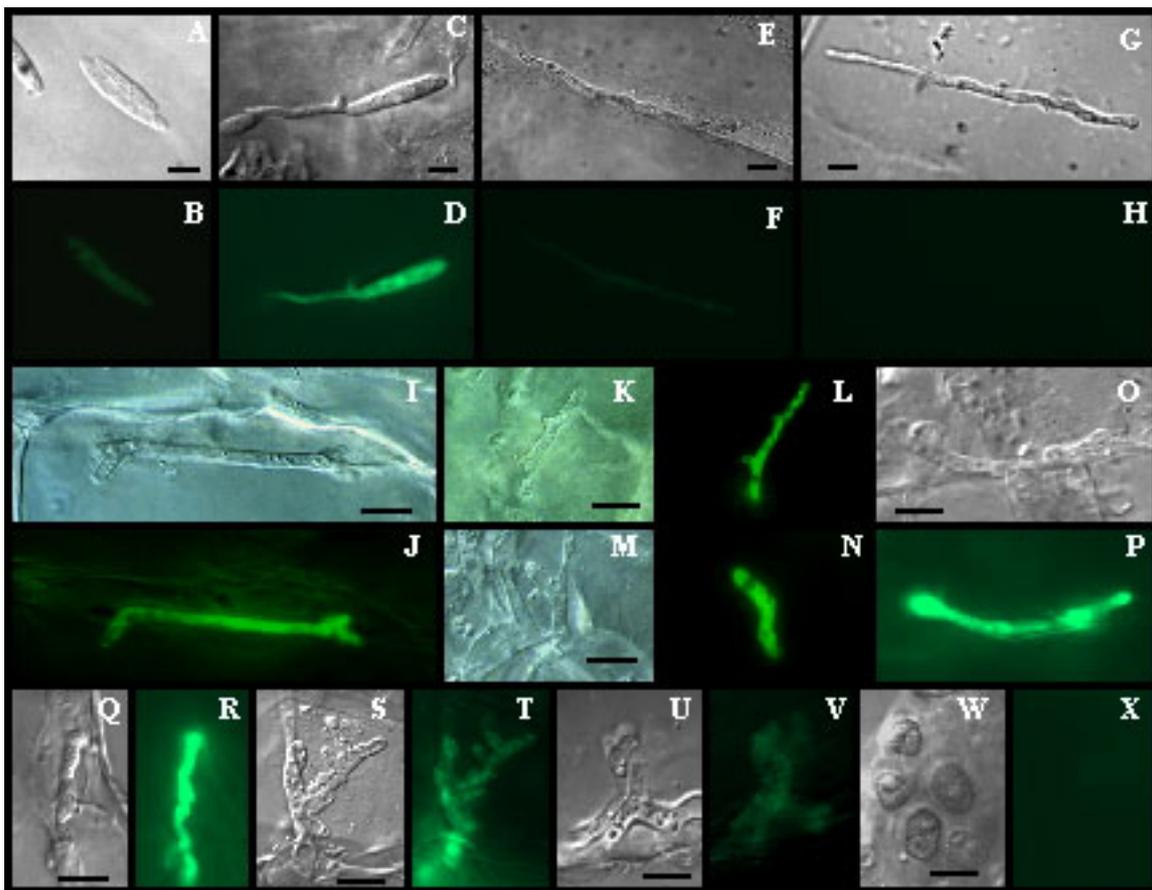


Abbildung 8: Nachweis der *mfa1*-Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien von *U. maydis* durch GFP-Reporterstämme. Eine 1:1-Mischung der Stämme FB2 und CA2-1 wurde jungen Maispflanzen injiziert. Nach 24 h und dann im Abstand von zwei Tagen nach der Infektion wurden Proben lichtmikroskopisch (DIC) auf Pilzstrukturen hin untersucht, deren Morphologie bestimmt und einzelnen Entwicklungsstadien zugeordnet. A: Sporidien; C: Konjugationshyphen; E: Filamente; G: Appressorien; I und K: Dikarien; M, O, Q, S, U: sporogene Hyphen; W: Prä- und Teliosporen. Die GFP-Expression wurde dann in den Proben fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, V, X). Der angegebene Größenstand entspricht 3 μm .

Auf der Blattoberfläche waren zeitgleich Sporidien, Sporidien mit Konjugationshyphen, filamentöse Dikarien und appressorienartige Strukturen zu sehen. In 17 von 100 untersuchten Sporidien war geringe und zudem verschieden starke GFP-Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 8b und nicht gezeigt). Zellen mit Konjugationshyphen zeigten zu 50 % GFP-Fluoreszenz, die zudem wesentlich intensiver als in Sporidien war (Abb. 8D). In filamentösen Dikarien konnte zwar GFP-Fluoreszenz beobachtet werden, diese war aber deutlich schwächer als in Zellen mit Konjugationshyphen und den meisten Sporidien war (Abb. 8F). Darüber hinaus war in drei von 20 untersuchten Filamenten keine GFP-

Expression zu erkennen (nicht gezeigt). In appressorienartigen Strukturen war nur noch in 3 von 20 Zellen geringe GFP-Expression nachweisbar (Abb. 8H).

Um die GFP-Expression in den biotrophen Stadien zu untersuchen, wurden Schnittpräparate von infizierten Maisblättern und Tumorgeweben angefertigt. Die Stadien wurden anhand morphologischer Kriterien differenziert und die GFP-Menge fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. In verzweigten Dikarien konnte dabei durchwegs starke grüne Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 8J, 8L). Sporogene Hyphen wiesen hingegen wiederum ein heterogenes Expressionsmuster auf. Neben Zellen mit hoher GFP-Expression (Abb. 8N, 8P, 8R) waren auch sporogene Hyphen zu beobachten, die nur geringe oder fast keine Fluoreszenz zeigten (Abb. 8T und 8V). In Teliosporen war keine grüne Fluoreszenz nachweisbar (Abb. 8X).

In Sporidien auf der Blattoberfläche kommt es demnach zu einer Induktion der *mfa1*-Expression, die vermutlich mit der Paarungsbereitschaft einhergeht. Nach der Fusion wurde die Repression von *mfa1* in den filamentösen Dikarien und appressorienartigen Strukturen beobachtet. Bereits kurz nach der Penetration wird *mfa1* in Dikarien erneut induziert und im weiteren Verlauf der Infektion in sporogenen Hyphen wieder reprimiert. Die dabei beobachteten Expressionsunterschiede zwischen morphologisch ähnlichen Stadien lassen vermuten, daß Signale, welche die *mfa1*-Expression regulieren, entweder unterschiedlich verteilt sind, oder daß sich die Zellen trotz morphologischer Ähnlichkeit in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden.

In einem weiteren Vorexperiment zur Etablierung des REMI-"enhancer trap"-Systems wurde auch für das *lga2*-Gen ein Expressionsprofil über den gesamten Lebenszyklus von *U. maydis* hinweg erstellt. Im Ausgangsplasmid (pCA64) wurde hierbei das *lga2*-Gen komplett durch das SGFP-Gen ersetzt. Das resultierende Plasmid pCA7 wurde in FB2 (*a2b2*) transformiert. Nach Southernanalysen wurden zwei unabhängige Stämme, CA7-3 und CA7-5, in denen *lga2* durch *lga2*:sGFP ersetzt war für die Expressionsstudien ausgewählt. Die *lga2*-Expression wurde anhand der GFP-Menge (s. o.) während der Kreuzung auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien und während der biotrophen Phase bestimmt.

CA7-3 und CA7-5 zeigten keine Expressionsunterschiede in verschiedenen Stadien, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die beobachtete GFP-Expression der *lga2*-Expression entspricht. Sowohl in haploiden Sporidien als auch in Konjugationshyphen konnte keine GFP-Expression auf Plattenmedien oder auf der Pflanzenoberfläche beobachtet werden (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war bereits 24 Stunden nach der Inokulation sowohl in Paarungsstrukturen als auch in filamentösen Dikarien GFP-Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 9B und 9D). Darüber hinaus konnte auf der Pflanzenoberfläche GFP-Expression in appressorienartigen Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 9F). Innerhalb der Pflanze war zu keinem Zeitpunkt Expression zu erkennen (Abb. 9H und 9J). *lga2* wird demnach ausschließlich im filamentösen Dikaryon und in Appressorien

exprimiert. Da die GFP-Expression bereits kurz nach der Fusion nachweisbar war, mußte eine schnelle Induktion von *lga2* erfolgt sein. Nach der Penetration wird *lga2* wieder herunterreguliert.

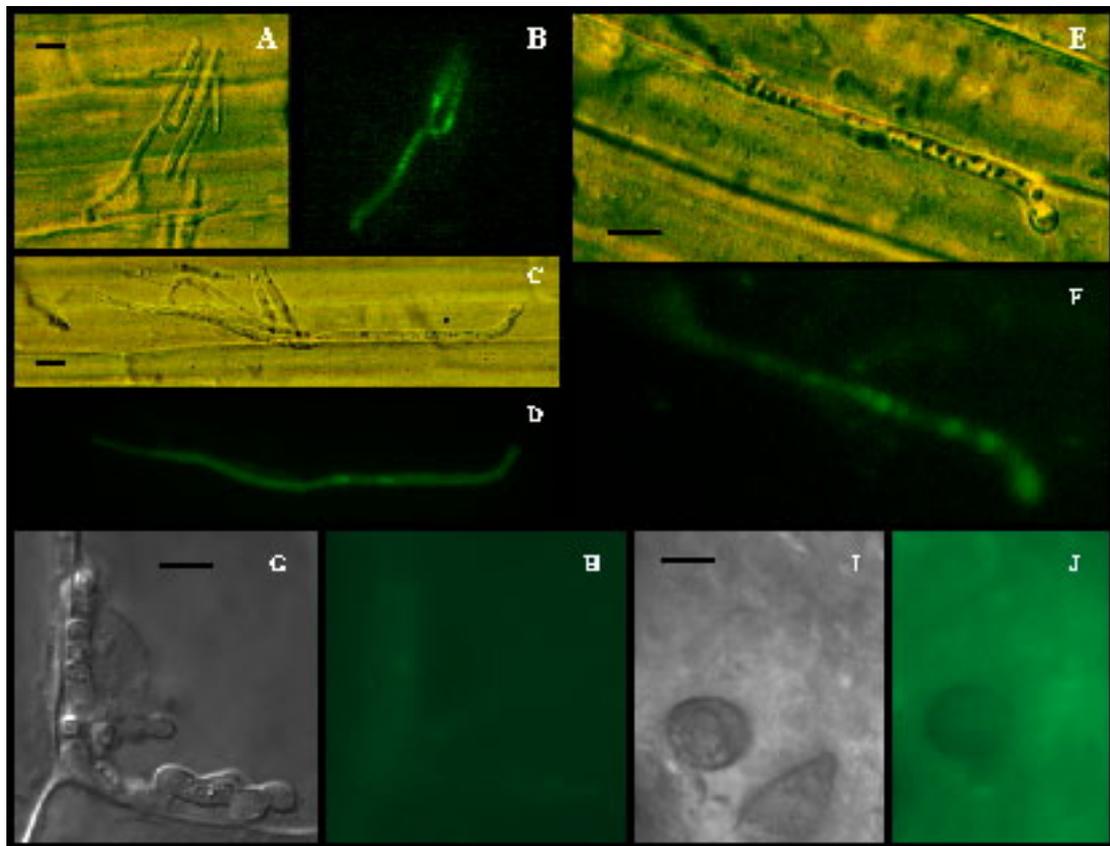


Abbildung 9: *lga2* ist ausschließlich in filamentösen Dikarien exprimiert. Eine Mischung der Stämme FB2 und CA7-3 wurde in junge Maispflanzen injiziert. Nach 24 h und anschließend im Abstand von zwei Tagen nach der Infektion wurden Proben auf Pilzstrukturen und GFP-Fluoreszenz hin untersucht. Die Proben wurden jeweils mit DIC-Lichtmikroskopie (A: Sporidien und Paarungsstruktur; C: Sporidien und dikaryotisches Filament; E: Appressorium; G: sporogene Hyphe; I: Prä- und Teliosporen) und Fluoreszenzmikroskopie (B, D, F, H, J) untersucht (M&M). Der angegebene Gößenstandard entspricht 3 μm .

Da für *mfa1*, wie auch *lga2* eine Regulation während der biotrophen Phase stattfindet, sind daran neben der bekannten *b*-abhängigen Regulation vermutlich auch Pflanzenfaktoren beteiligt. Die Expressionsanalyse erlaubt somit den Nachweis differentieller Expression während der biotrophen Phase. Deshalb sollte es möglich sein, auch in einem "screening"-Ansatz Stämme zu isolieren, die GFP spezifisch während der biotrophen Phase exprimieren. Durch Northernanalysen sollte es möglich sein, die ermittelten GFP-Daten für spätere Stadien zu verifizieren.

2.2 REMI-“enhancer trap“-Mutagenese

Nachdem die detaillierte Expressionsanalyse von pilzlichen Genen in verschiedenen Entwicklungsstadien während der biotrophen Phase etabliert war, mußte die bereits bestehende Methode der REMI-Mutagenese (Bölker *et al.*, 1995) so modifiziert werden, daß pflanzeninduzierte Gene markiert und isoliert werden können.

2.2.1 Der experimentelle Aufbau der REMI-“enhancer trap“-Mutagenese

Für die REMI-“enhancer trap“-Mutagenese wurde in zwei Schritten das REMI-Plasmid pCA104 konstruiert. In das Plasmid pSP72 wurde ein 62 bp langes Fragment aus dem *mfaI*-Promotor als

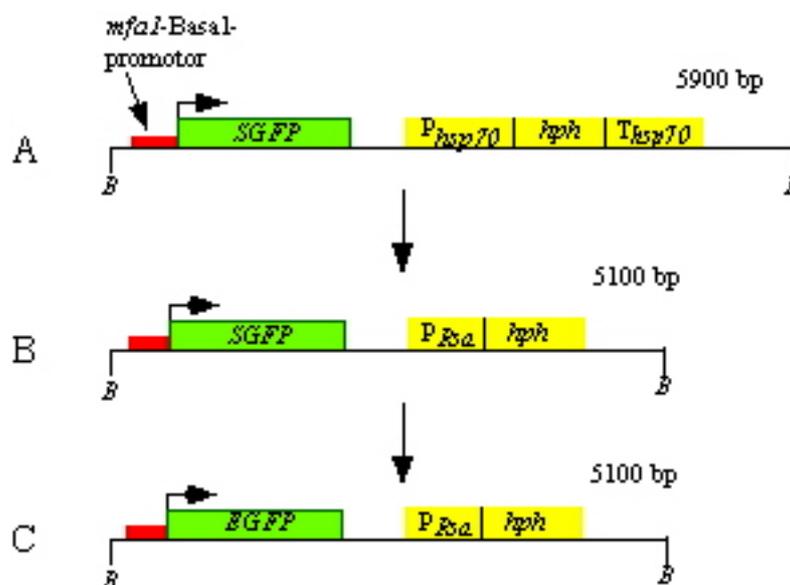


Abbildung 10: Schematische Darstellung der REMI-“enhancer trap“-Mutageneseplasmide pCA104 und pCA125. Die Beschreibung der Plasmide befindet sich im Text, die Konstruktion kann dem M&M-Teil entnommen werden.

ATG-Fusion mit dem SGFP-Gen eingebracht (Abb. 10A). Direkt am 5' Ende des Promotorfragmentes befindet sich eine singuläre *Bam*HI-Schnittstelle. Als Resistenzmarker für die Selektion in *U. maydis* trägt das Plasmid das *hph*-Gen unter der Kontrolle eines DNA-Fragmentes aus *S. cerevisiae*, das konstitutive Expression in *U. maydis* vermittelt (Bölker *et al.*, 1995, Abb. 10B). Diese Resistenzkassette enthält keine *U. maydis* Sequenzen und wurde gewählt, um sonst mögliche homologe Rekombinationsereignisse zu vermeiden (Bölker *et al.*, 1995).

Die singuläre *Bam*HI-Schnittstelle kann zur Integration von pCA104 verwendet werden. Das 62 bp lange *mfa1*-Promotorfragment dient als Basalpromotor für das "enhancer trapping". Der Basalpromotor vermittelt allein keine nachweisbare Expression. Befinden sich aber "enhancer"-Elemente im angrenzenden 5'-Bereich, sollte Transkription initiiert werden. Nachdem erste Experimente gezeigt hatten, daß mit pCA104 nur relativ stark exprimierter Gene markiert wurden, wurde das SGFP-Gen in pCA104 durch EGFP ersetzt. Das resultierende Plasmid pCA125 ist in Abb. 10C gezeigt. EGFP besitzt laut dem Hersteller (Clontech) eine sechsfach höhere Lichtemission als SGFP und erlaubt dadurch die Detektion schwächer exprimierter Gene.

Da eine Beteiligung pflanzeninduzierter Gene an der pathogenen Entwicklung nicht auszuschließen war, wurde als Ausgangsstamm für die REMI-Mutagenese der solopathogene, diploide Stamm FBD11(*ala2b1b2*) verwendet. Der Verlust eines rezessiven Pathogenitätsgens sollte in dem Stamm nicht zum Verlust der Pathogenität führen, da eine zweite Genkopie vorhanden ist. Die Bedingungen für die Transformation von pCA104 in der Gegenwart von *Bam*HI wurden für FBD11 so angepaßt, daß pro Transformation zwischen 5 und 50 Transformanden isoliert werden konnten (M&M). Da die REMI-Transformation bekanntermaßen neben der Integration eines einzelnen REMI-Plasmids zu Tandem- und Mehrfachintegrationen an verschiedenen Stellen im Genom führt (Bölker *et al.*, 1995; Sweigard *et al.*, 1998), wurden in einem Vorversuch in verschiedenen Transformanden die Integrationsereignisse untersucht. 8 REMI-Transformanden wurden einer Southernanalyse mit pCA104 als DNA-Sonde unterzogen (Abb. 11). Da die DNA mit *Nco*I restringiert wurde, sollten bei singulären Insertionen drei Banden detektiert werden (Abb. 11A und 11B): das 1,8 kb Fragment entspricht dabei einem internen Vektorfragment, die übrigen Banden stellen die 3'- und 5'- Flanken an der Insertionsstelle dar, wie bei den Transformanden #114, #427 #480 und #500 zu erkennen war. Tandemintegrationen wiesen zusätzlich ein weiteres internes Fragment von 2,8 kb auf (#213, #220 und #430). Es konnten jedoch nur in der Mutante #213 alle 4 erwarteten Fragmente detektiert werden (Abb. 11A und 11C). Die Mutanten #220 und #430 wurden auch dieser Klasse zugeordnet, da das nur bei Tandemintegrationen auftretende 2,8 kb Fragment zu sehen war. Mehrfachintegrationen an verschiedenen Stellen im Genom waren in der Mutante #461 zu beobachten. Neben dem internen 1,8 kb Vektorfragment sollten vier Banden zu erkennen sein, welche die 3'- und 5'- Bereiche an den Integrationsstellen repräsentieren. Hier waren aber nur drei zusätzliche Banden zu sehen (Abb. 11A und 11D). Da jedoch das 2,8 kb Fragment fehlte, wurde in der Mutante #461 von Integrationen an zwei verschiedenen Stellen im Genom ausgegangen.

Auffällig war, daß in dieser Southernanalyse oft nicht alle erwarteten Fragmente sichtbar waren. Das lag vermutlich daran, daß sehr kleine oder sehr große Fragmente nicht detektiert wurden. Durch die charakteristischen Bandenmuster konnten aber trotzdem alle Integrationsereignissen zugeordnet werden. In früheren REMI-Ansätzen fanden in etwa 15 % der Mutanten Mehrfachintegrationen statt

(Bölker *et al.*, 1994). Hier wurden solche Integrationsereignisse in etwa doppelt so vielen Transformanten gefunden. Ein möglicher Grund dafür ist, daß in FBD11 Mutationen und Umstrukturierungen im Genom, die in haploiden Stämmen letal sind, aufgrund des doppelten Chromosomensatzes toleriert werden können.

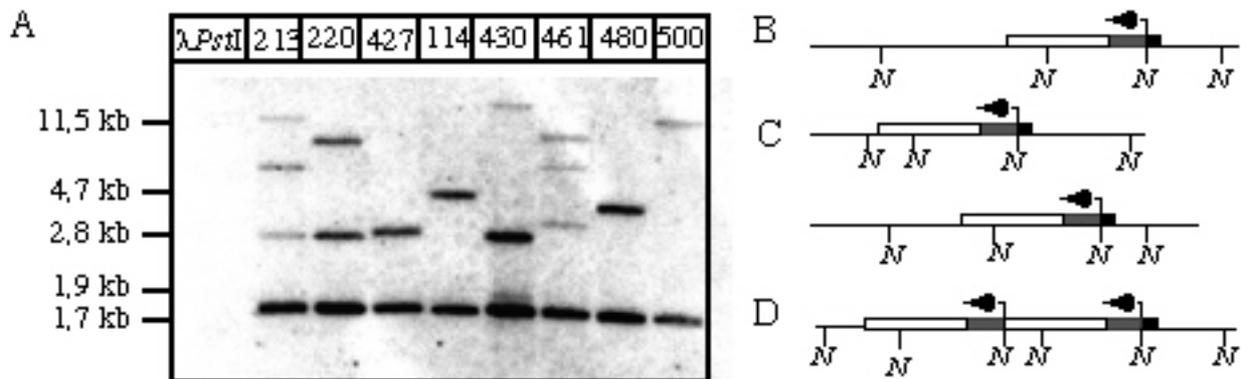


Abbildung 11: A: Southernblot von REMI-Mutanten zur Analyse der Integrationsereignisse. Die jeweiligen Stämme für die Southernanalyse sind über den Spuren angegeben. DNA wurde aus den jeweiligen Stämmen extrahiert und mit *NcoI* geschnitten. Nach dem Transfer auf eine Membran wurden die Filter mit pCA104 als DNA-Sonde hybridisiert. *PstI* restringierte λ -DNA diente als Größenstandard. **B:** Schematische einer Einzelintegration des REMI-Plasmids. **C:** Schematische Darstellung von zwei unabhängigen Integrationsereignissen im Genom. **D:** Schematische Darstellung einer Mehrfachintegration mit drei inserierten REMI-Plasmiden. Das REMI-Plasmid pCA104 verfügt über zwei interne *NcoI*-Schnittstellen. Nach Restriktion mit *NcoI* können die einzelnen Integrationsereignisse anhand charakteristischer Bandenmuster zugeordnet werden (siehe Text). *N* = *NcoI*.

Nachdem die Transformationsbedingungen für die REMI-Mutagenese eingestellt waren, wurde eine Bank von Mutanten hergestellt. Es wurden 600 Mutanten mit dem Plasmid pCA104 und 1750 Transformanten mit dem Plasmid pCA125 generiert. Die Mutanten wurden einzeln hochgezogen und in Mikrotiterplatten konserviert. Bei einer geschätzten Genomgröße von 20 Mb und einer zufälligen Verteilung der Integrationsereignisse waren statistisch in etwa der Hälfte aller im Genom vorkommenden *BamHI*-Schnittstellen REMI-Plasmide integriert.

2.2.2 Isolierung von *U. maydis*-Mutanten mit pflanzenspezifischer GFP-Expression

Durch die REMI-“enhancer trap“-Mutagenese sollten *U. maydis*-Stämme isoliert werden, die ausschließlich GFP-Fluoreszenz während der biotrophen Phase aufweisen. Ziel war es, zuerst alle Mutanten, die auf synthetischen Medien GFP-Fluoreszenz zeigten, auszusortieren und jene Mutanten weiter zu untersuchen, in denen keine GFP-Expression nachweisbar war.

Da viele Gene durch Umwelteinflüsse wie z.B. das Nahrungsangebot oder den morphologischen Wechsel von hefeartigem zu filamentösem Wachstum reguliert werden, wurde die GFP-Expression der REMI-Mutanten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Da die Intensität der Fluoreszenz die Proteinmenge widerspiegelt, wurden zunächst alle Stämme in Flüssigkultur hochgezogen und dann Kulturen mit etwa der gleichen Dichte von Mikrotiterplatten aus auf verschiedene Plattenmedien gestempelt. Dabei konnte in PD- und CM-Medium die Expression bei komplexen Medien untersucht werden. In CM-Medium konnte zudem, da die *a*- und *b*- Gene exprimiert werden, deren Einfluß untersucht werden. Auf PD-CC-Medium, einem Medium, auf dem Kreuzungstests durchgeführt werden, ließ sich neben der *a*- und *b*-abhängigen Regulation auch der Einfluß des filamentösen Wachstums untersuchen. In MM-Medium (MM + 1% Glukose) konnten der Einfluß von Mangelbedingungen und der Glukose auf die Expression untersucht werden (Abb. 12 und M&M). Nach 36 h Inkubation auf den Plattenmedien wurde GFP in den Kolonien durch Blaulicht angeregt und die Fluoreszenz mit Hilfe einer CCD-Kamera (Stratagene) und einem vorgeschalteten HQ525/50m Filter (Chroma Technology) detektiert (Abb. 12 und M&M). Stämme wurden verworfen, sobald unter den getesteten Bedingungen GFP-Fluoreszenz sichtbar war.

Von den 600 Transformanten, die nach Transformation mit pCA104 isoliert wurden, zeigten 78 Mutanten (13 %) grüne Fluoreszenz. Wurde pCA125 als Mutageneseplasmid verwendet, wurde in 735 von 1750 Mutanten (42 %) grüne Fluoreszenz beobachtet. Dieser Unterschied spiegelt vermutlich die höhere Sensitivität von EGFP gegenüber SGFP wieder. In einer mikroskopischen GFP-Analyse von etwa 100 Transformanten konnte die in den Kolonien beobachtete Fluoreszenz verifiziert werden (nicht gezeigt). Deshalb wurde davon ausgegangen, daß die GFP-Expression, die man auf Kolonienebene detektieren konnte, der in Einzelzellen entsprach. Unabhängig vom verwendeten Mutageneseplasmid konnten teilweise große, medienabhängige Unterschiede in der Lichtemission einzelner Klone nachgewiesen werden (Abb. 12). Dies war der erste Hinweis, daß durch REMI-"enhancer trapping" differentiell exprimierte Gene markiert wurden, deren Expression unter den getesteten Bedingungen variierte.

Von ursprünglich 2350 Transformanten wurden die 1537 Stämme, die keine GFP-Fluoreszenz bei Wachstum auf den getesteten Medien zeigten, für den Test auf pflanzenspezifische GFP-Expression ausgewählt. Der Stamm #1486 wurde weiterbearbeitet, da GFP in filamentösen Dikarien im Vergleich zu haploiden Sporidien induziert war. Hier bestand die Hoffnung, anhand dieses Beispiels relativ schnell den Erfolg der "enhancer trapping"-Methode zu überprüfen. (s. Kapitel 2.4.3).

Um Stämme mit pflanzenabhängig induzierter GFP-Expression zu isolieren, wurden mit den Transformanten, die keine GFP-Expression auf Plattenmedien zeigten, Infektionen durchgeführt. In einem Vorexperiment wurde zuerst ermittelt, unter wievielen Transformanten ein Stamm, der GFP

exprimiert, isoliert werden kann. Dazu wurden FBD11-Wildtypstämme mit einem GFP exprimierenden Reporterstamm im Verhältnis 10:1 bzw. 50:1 gemischt und anschließend Pflanzen infiziert. In einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnten dabei jeweils die GFP-exprimierenden Stämme sicher identifiziert werden (nicht gezeigt).

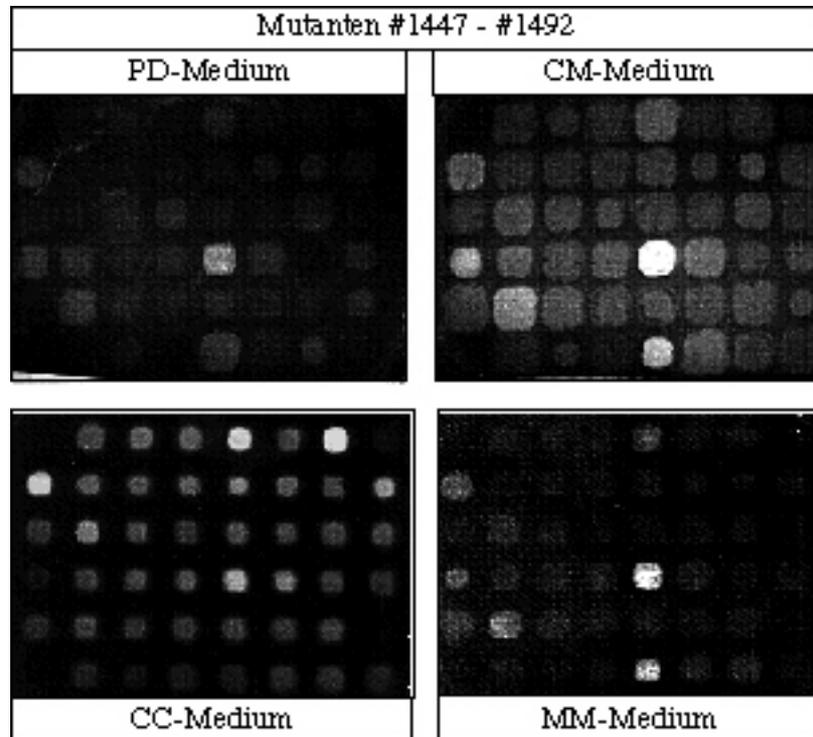


Abbildung 12: Detektion von GFP-Fluoreszenz in Kolonien von REMI-Transformanten auf verschiedenen Plattenmedien. Alle 2350 REMI-Transformanten wurden in YEPS-Hyg50-Medium hochgezogen und in Mikrotiterplatten überimpft und von dort, wie in diesem Beispiel dargestellt, zu je 46 Mutanten auf PD-, MM-, CM- und CM-CC-Platten gestempelt zu werden. GFP-Fluoreszenz wurde nach 36 h Inkubation in den Kolonien bestimmt (M&M). Die Kolonie an Position 6, obere Reihe ist der Stamm #1486.

Um zu gewährleisten, daß alle Mutanten repräsentativ vertreten sind, wurden die Infektionen mit "pools" von 5 - 10 Transformanten durchgeführt. Jeweils zwei, vier und sechs Tage nach der Infektion erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen in Aufsicht- und Schnittpräparaten (M&M). In 11 infizierten Pflanzen konnten grün fluoreszierende Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Mit den einzelnen Mutanten dieser "pools" wurden erneut Maispflanzen infiziert. Die Stämmen #114, #219, #271, #424, #500, #698, #704, #727 und #1685 zeigten GFP-Expression beim Wachstum innerhalb und/oder auf der Pflanzenoberfläche (nicht gezeigt). Um Induktion durch Flüssigmedien oder das entsprechende Umfeld auszuschließen, wurden die Stämme acht Stunden in MM- oder CM-Flüssigmedien bzw. Wasser inkubiert.

Anschließend wurde die Menge an GFP fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. In den Mutanten, #114 und #219 konnte GFP nicht nachgewiesen werden. Somit lag Induktion ausschließlich nach Inokulation von Pflanze vor. In den restlichen Mutanten (#271, #424, #480, #500, 624, #698, #704, #727 und #1685) konnte in Flüssig- und auf Plattenmedien geringe GFP-Expression festgestellt werden. Davon wurde nur die Mutante #1685 weiter bearbeitet, da hier ein sehr großer Unterschied in der Fluoreszenz zwischen Sporidien in axenischer Kultur und solchen, die sich auf der Blattoberfläche befanden, zu erkennen war. Die übrigen Mutanten aus dieser Gruppe wurden verworfen, da keine signifikanten Unterschiede in der GFP-Expression beobachtet werden konnten und somit angenommen werden mußte, daß hier konstitutiv exprimierte Gene markiert wurden. Zusätzlich wurde die Mutante #1486 ausgewählt, da hier eine spezifische Induktion von GFP in dikaryotischen Filamenten auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien zu erkennen war. Hier bestand die Aussicht, das entsprechende Gen schnell zu identifizieren, da die Expressionsunterschiede in diesen beiden Stadien vergleichsweise einfach zu bestimmen sind.

2.3 Analyse der Mutanten aus der REMI-"enhancer trap"-Mutagenese

2.3.1 Die Mutante #114

Der Phänotyp der Mutante #114 zeichnete sich dadurch aus, daß GFP-Fluoreszenz nur während des Wachstums in der Pflanze, nicht aber auf Plattenmedien zu beobachten war (Abb. 13 und nicht gezeigt). Southernanalysen zeigten, daß ein einzelnes REMI-Plasmid in das Genom der Mutante

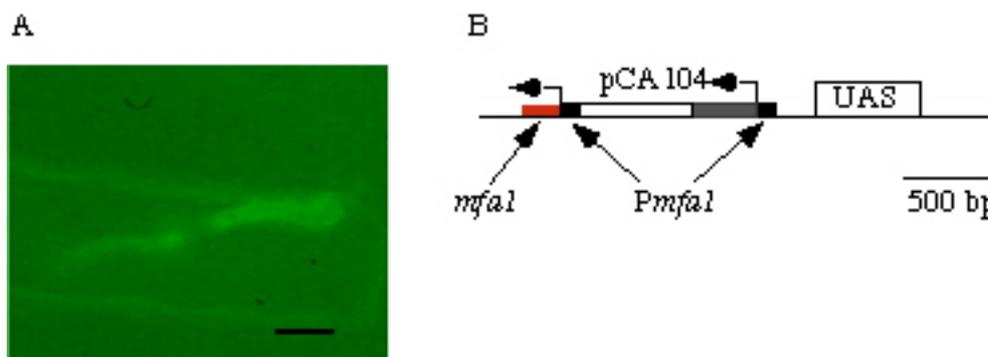


Abbildung 13: A: Pflanzenspezifische GFP-Expression in der Mutante #114. Junge Maispflanze wurden mit der Mutante #114 infiziert. 24 h (A) nach Infektion wurde fluoreszenzmikroskopisch eine grüne Färbung in den Pilzzellen beobachtet. Der Größenstandard, als schwarzer Balken dargestellt, entspricht $3\mu\text{m}$. **B:** Schematische Darstellung der Integration von pCA104 in der Mutante #114. Die Integration fand im Promotor von *mfaI* statt. Das *mfaI*-Gen ist rot markiert. Der Basalpromotor *pmfaI* wurde bei der Integration dupliziert. Die UAS-Elemente des *mfaI*-Promotors regulieren die GFP-Expression.

insetiert war (Abb. 11). Die Isolierung der genomischen *U. maydis*-DNA, die an der Insertionsstelle das REMI-Plasmid flankiert, erfolgte durch "plasmid rescue". Dazu wurde die DNA der Mutante mit *MluI* restringiert, ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert. So konnte das Plasmid pCA114-3 isoliert werden. Die Sequenzierung der genomischen *U. maydis* DNA in diesem Plasmid und die anschließende Datenbankanalyse ergaben Sequenzidentität auf Nukleotidebene zum *al*-Locus von *U. maydis* (M&M). Da sich an der Integrationsstelle keine *Bam*HI-Schnittstelle, dafür aber der *mfal*-Basalpromotor befand, handelt es sich bei dieser Insertion vermutlich um eine homologe Integration eines zirkulären REMI-Plasmids in den endogenen *mfal*-Promotor von FBD11 (Abb. 13B). Die Rekombination fand vermutlich zwischen den 62 bp identische Sequenz aus dem *mfal*-Promotor des REMI-Plasmids und der endogenen Kopie statt. Dadurch wurde *mfal* durch GFP ersetzt und unterlag so der Kontrolle des *mfal*-Promotors. Obwohl in haploiden Sporidien auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien *mfal* exprimiert wird, wurde die Mutante #114 bei der Vorselektion nicht aussortiert. Ein möglicher Grund dafür ist, daß in dem für *b* heterozygoten Mutagenesestamm FBD11 *mfal* zwar auf Plattenmedien, nicht jedoch während der biotrophen Phase reprimiert wird (Urban *et al.*, 1996, siehe auch Kapitel 2.1.1). Die Markierung eines Gens mit bekannter pflanzenabhängiger Induktion wurde als Positivkontrolle für die "screening"-Bedingungen gewertet.

2.3.2 Die Mutante #1486

In der Mutante #1486 war GFP-Fluoreszenz nur in dikaryotischen Filamenten nachweisbar und damit potentiell ein Gen markiert, das in diesem Stadium induziert wird (Abb. 14). Dies erschien deshalb interessant, weil das filamentöse Stadium eine Voraussetzung für die weitere pathogene Entwicklung von *U. maydis* ist und Gene, die während dieser Phase exprimiert werden, essentiell für die pathogene Entwicklung sein könnten (Banuett, 1992).

Die Versuche zum "rescue" dieser Mutante waren nicht erfolgreich. Deshalb wurde mittels einer Southernanalyse zunächst die Umgebung der Insertionsstelle untersucht, wobei pCA104 als Sonde diente. Die Restriktion mit *Bam*HI ergab, daß beide *Bam*HI-Schnittstellen an der Integrationsstelle vorhanden waren und deshalb wahrscheinlich eine REMI-Integration vorlag.

Durch Restriktion mit weiteren Enzymen konnten die Flanken kartiert werden (Abb. 15). Für die Isolierung der angrenzenden Sequenzen wurde in der Mutante #1486 eine auf PCR basierende Methode verwendet (Anchor-PCR, s. M&M). Dazu wurde die genomische DNA der Mutante mit *Sph*I geschnitten, ligiert und die flankierenden Sequenzen durch Primer, die spezifisch an pCA104 binden, amplifiziert (REMI-5' und *hyg*3'). So konnte ein 1750 bp großes Fragment genomischer *U. maydis* DNA isoliert und in pCRTOP02.1 (Invitrogen) ligiert werden (pCA233). Anschließend

wurde das Insert aus pCA233 sequenziert (Abb. 16, Anhang und M&M). Auf dem Fragment befand sich kein größerer, durchgehender ORF. Zudem konnte in Northernanalysen mit diesem Fragment als DNA-Sonde weder in den Stämmen FB1, FB2, FBD11 noch in Mischungen der Stämme FB1 und FB2, die auf aktivkohlehaltigen Medien gewachsen waren, ein Transkript nach-

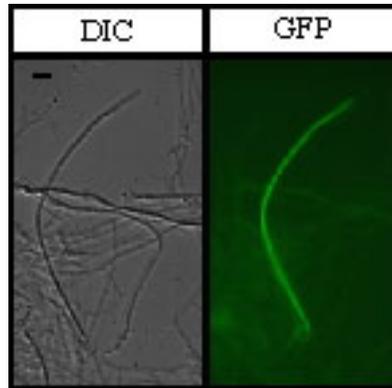


Abbildung 14: Die GFP-Expression in der Mutante #1486 ist auf das filamentöse Dikaryon beschränkt. **A:** Die Mutante #1486 wurde 36 h auf PD-Aktivkohle-Platten inkubiert. **B:** Anschließend wurden Filamente licht- (DIC) und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Größenstandard entspricht $3\mu\text{m}$.

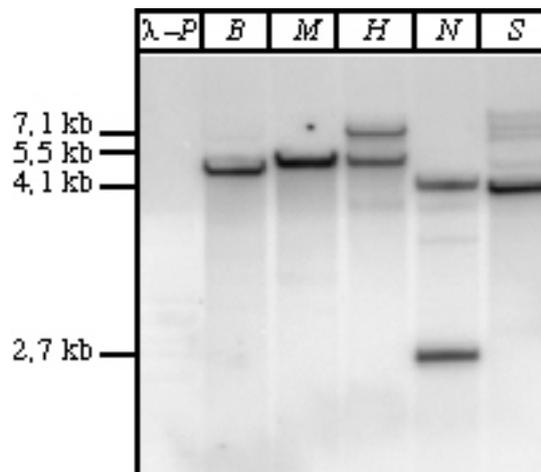


Abbildung 15: Southernanalyse der Mutante #1486. Genomische DNA wurde mit den angegebenen Enzymen geschnitten. *B* = *Bam*HI, *M* = *Mlu*I, *H* = *Hind*III, *N* = *Nco*I und *S* = *Sal*I. Als Sonde wurde das Plasmid pCA104 verwendet. Als Größenstandard diente *Pst*I-geschnittene λ -DNA.

gewiesen werden (nicht gezeigt). Um das Gen zu isolieren, dessen regulatorischen Elemente in dieser Mutante die GFP-Expression steuern, wurden deshalb die flankierenden DNA-Abschnitte aus den entsprechenden Cosmiden 8H11 und 9A durch Hybridisierung mit dem 1750 bp *Sph*I-Fragment isoliert und analysiert. Aus dem Cosmid 9A1 wurden ein 4681 bp großes Fragment

sequenziert, welches die Insertionsstelle umfaßte (s. Anhang, Abb. 16). Diese befand sich in einem intergenischen Bereich von 3500 bp zwischen zwei ORFs, *uat1* (*Ustilago maydis* Ammoniumtransporter 1) und *npi5* (non plant induced gene). *uat1* liegt 2300 bp 3' der Insertionsstelle und kodiert für ein putatives Polypeptid von 461 aa mit Homologie zu den Ammoniumtransportern *MEP2/MEP3* aus *S. cerevisiae*. 1200 bp stromaufwärts der Insertionsstelle liegt ein zu *uat1* konvergent transkribierter ORF, *npi5*, der für ein putatives Polypeptid mit signifikanter Homologie zu einem nicht näher untersuchten Protein (NC 001137.2) aus *S. cerevisiae* kodiert (nicht gezeigt).

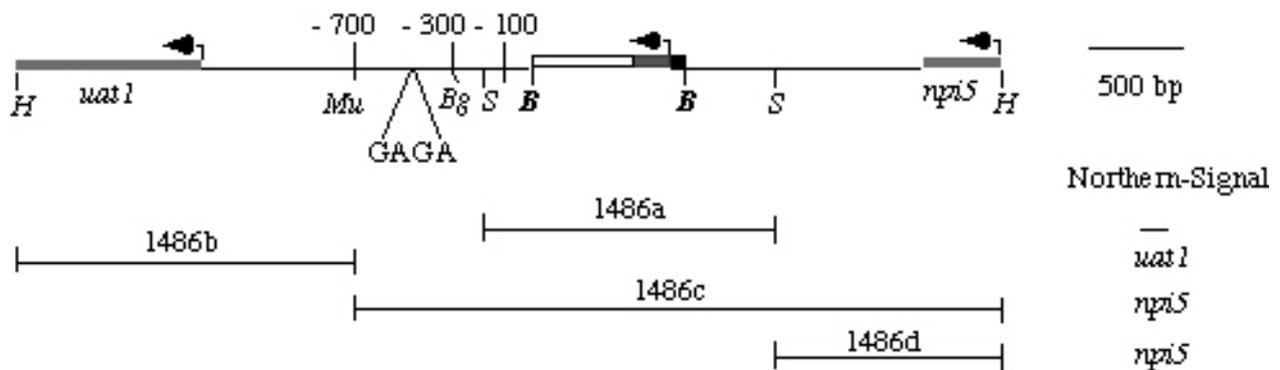


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Integrationsstelle von pCA125 in der Mutante #1486. Offene Leseraster und deren Orientierungen sind als Pfeile, Sonden für Northern- und Southernanalysen sind als Balken dargestellt. Alle DNA-Sonden wurden aus pCA234 isoliert und sind in M&M angegeben. GAGA markiert die Position der repetitiven GA-Sequenz. An den Positionen -100, -300 und -700 wurden die Konstrukte pSC5, pSC6 und pSC7 inseriert. H = *HindIII*, E = *EcoRI*, Bg = *BglII*, S = *SphI* und B = *BamHI*. Der Größenstandard entspricht 500 bp.

In Northernanalysen wurde die Expression von *uat1* und *npi5* untersucht. Es wurde dazu die Expression in FB1 (*alb1*), FB2 (*a2b2*), FBD11 (*alb1a2b2*), HA103 (*alb^{con}*) bzw. FB1 und FB6a (*a2b1*), die 48h auf aktivkohlehaltigen Platten inkubiert waren, verglichen. FB1 und FB2 wachsen unter diesen Bedingungen hefeartig, FBD11, HA103 und Dikarien, die durch Fusion von FB1 und FB2 entstanden sind wachsen aufgrund der Präsenz des aktiven bE/bW-Heterodimers filamentös. In Mischungen aus FB1 und FB6a kann der Einfluß der Pheromonstimulation auf die Expression untersucht werden. Zusätzlich wurde die Expression von *uat1* und *npi5* in FBD11-Zellen, die in Flüssigminimalmedium (MM), in YEPS-Flüssigmedium (YEPS), in flüssigem CM-Medium sowie in Tumorgewebe aus Infektionen mit Mischungen von FB1 und FB2 bestimmt. Es konnte sowohl für *uat1* als auch *npi5* eine schwache, konstitutiv exprimierte mRNA-Spezies detektiert werden (nicht gezeigt). Deshalb wurde angenommen, daß die regulatorischen Elemente von *uat1* und *npi5* nicht an der differentiellen GFP-Expression in der Mutante #1486 beteiligt sind.

Das *MEP2* Gen aus der Bäckerhefe ist einer der Rezeptoren, die über Gpa2p den intrazellulären cAMP-Spiegel regulieren. In *U. maydis* beeinflusst der cAMP-Spiegel die Zellmorphologie und die Pheromongenexpression (Gold *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob *uat1* an der Regulation der Pheromongenexpression beteiligt ist, wurde eine Deletion im *uat1*-Gen eingeführt. Dazu wurde in dem entsprechenden Plasmid pCA240 der Bereich deletiert, der für die aa 18 – 203 von Uat1 kodiert und durch eine Hygromycin B-Resistenzkassette ersetzt (M&M). Die nach der Transformation erhaltenen Deletionsstämme FB1 Δ *uat1*#3 und #5 bzw. FB2 Δ *uat1*#16 und #19 zeigten in Kreuzungsexperimenten mit kompatiblen *uat1*-Mutanten und gegenüber Wildtyppartnern kein verändertes Paarungsverhalten. Bei Infektionen mit Mischungen kompatibler Mutantenstämme wurde gegenüber den Kontrollinfektionen auch keine abweichende Virulenz beobachtet (nicht gezeigt). Hieraus läßt sich ableiten, daß *uat1* weder an der Paarung noch an der pathogenen Entwicklung beteiligt ist. Die Ursache für die stadienspezifische GFP-Expression in der Mutante #1486 bleibt somit weiter ungeklärt.

2.3.2.1 Eine regulatorische Funktion von GA-Wiederholungen in der Mutante #1486?

In der Mutante #1486 fiel eine Region in der Nähe der Integrationsstelle durch eine repetitive, polymorphe GA-Dinukleotidsequenz auf (Abb. 16). In FB1 wurden 72 GA-Dinukleotide gezählt, in FB2 hingegen nur 27 (nicht gezeigt). Um diese Wiederholungen aus dem *U. maydis* Genom zu entfernen, wurde mit Hilfe des Plasmids pCA248 eine 600 bp Deletion in den Stämmen FB1, FB2 und SG200 (*a1::mfa2 bE1/bW2*) eingeführt (Abb. 18A, 18B und M&M). In Southernanalysen kann bei homologem Genaustausch ein 5,7 kb *Hind*III-Fragment statt des 5,5 kb-*Hind*III-Fragments im Wildtyp beobachtet werden (Abb. 18A). Die SG200 Δ GA#43- und #44- Stämme

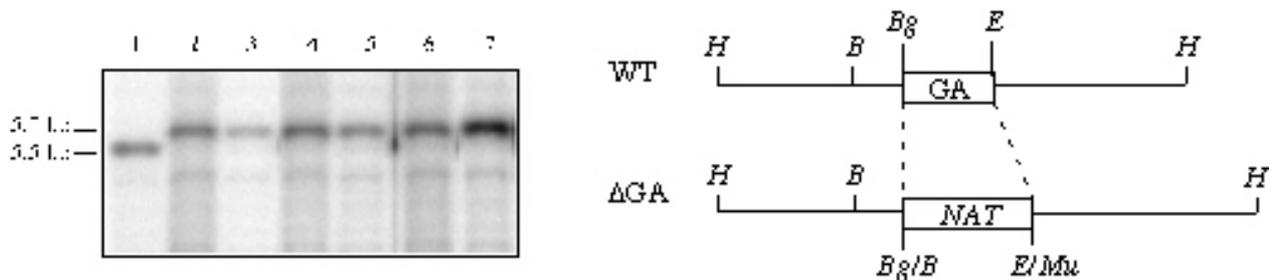


Abbildung 17: A: Southernanalyse der Δ GA-Mutanten. Aus den pCA248-Transformanten und FB1 wurde DNA präpariert und mit *Hind*III geschnitten. Als DNA-Sonde diente ein 5,5 kb *Hind*III Fragment aus dem Plasmid pCA234 (M&M). Spur 1: FB1; Spur 2: FB1 Δ GA#27; Spur 3: FB1 Δ GA#5; Spur 4: FB2 Δ GA#29; Spur 5: FB2 Δ GA#7; Spur 5: SG200 Δ GA#43 und Spur 7: SG200 Δ GA#44 Als Größenmarker diente *Pst*I geschnittene λ -DNA. **B: Schematische Darstellung der Wildtypsituation und Δ GA-Mutation.** Die repetitive GA-Sequenz wurde in pCA248 durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette ausgetauscht. H = *Hind*III, B = *Bam*HI, Bg = *Bgl*III, E = *Eco*RI, Mu = *Mun*I.

zeigten auf aktivkohlehaltigen Medien gegenüber SG200 keinen Unterschied bezüglich der Filamentbildung, während im Kreuzungstest kompatibler Δ GA-Stämme (FB1 Δ GA#27 und FB2 Δ GA#5 bzw. FB1 Δ GA#29 und FB2 Δ GA#7) vermindertes filamentöses Wachstum beobachtet wurde (Abb. 18A und nicht gezeigt). Im Pathogenitätstest verhielten sich SG200 Δ GA#43-Derivate

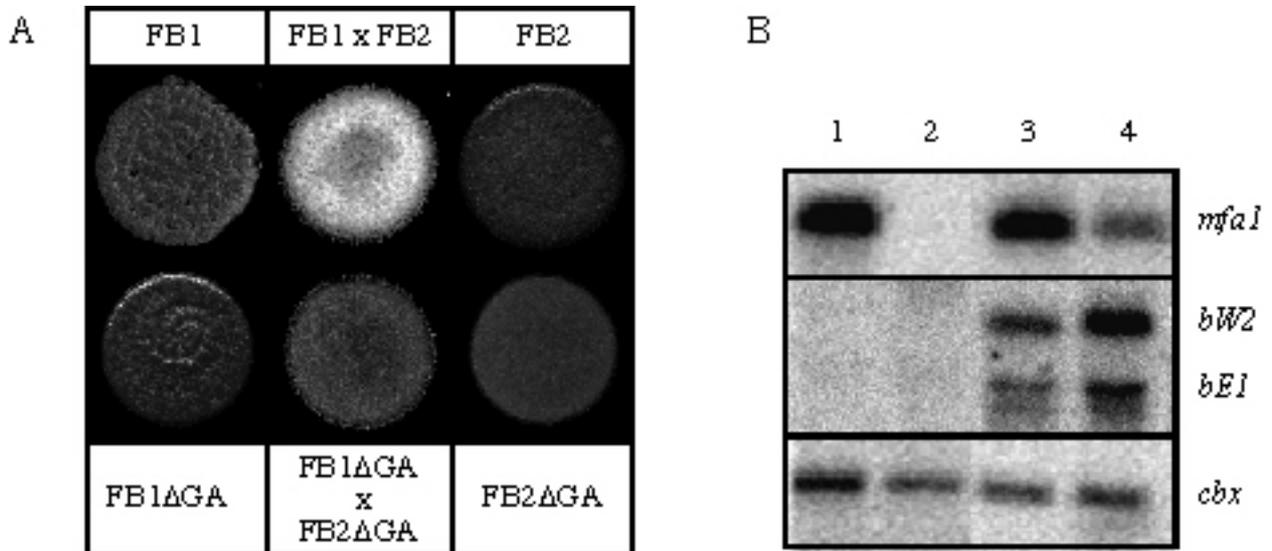


Abbildung 18: A: Kompatible Δ GA-Stämme zeigen reduziertes filamentöses Wachstum. FB1 Δ GA#28 und FB2 Δ GA#5 wurden über Nacht in YEPS-Medium hochgezogen, gemischt und anschließend auf PD-Aktivkohle-Platten getropft. Die Filamentbildung wurde nach 36 h bei 21°C mit dem Binokular beobachtet. Die Kolonien sind sechsfach vergrößert dargestellt. **B: Δ GA-Mutanten zeigen reduzierte *mfa1*-Expression.** Spur 1: FB1; Spur 2: FB1 Δ GA; Spur 3: FB1 x FB2; Spur 4: FB1 Δ GA x FB2 Δ GA. Alle Stämme wurden vor der RNA-Extraktion 48 h auf CM-Aktivkohle-Platten inkubiert. Es wurden je 10 μ g RNA pro Spur geladen. Die verwendeten Sonden zur Expressionsanalyse sind in M&M angegeben.

sowie Mischungen aus FB1 Δ GA#28 und FB2 Δ GA#5 wie die entsprechenden Wildtypstämme (nicht gezeigt). Da kompatible Δ GA-Mutanten reduziertes filamentöses Wachstum zeigten, lag es nahe, daß der deletierte Bereich entweder an der Zell/Zell-Erkennung oder der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Filaments beteiligt ist. Deshalb wurde in Northernanalysen die Expression des *mfa1*-Gens und der *b*-Gene, die diese Prozesse kontrollieren, in haploiden Δ GA-Mutanten und Kreuzungen kompatiblen Mutantenstämme auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien untersucht und mit den Wildtyp-Kontrollen verglichen (Abb. 18B). Die basale *mfa1*-Expression war in FB1 Δ GA-#28 reduziert. Auch in Kreuzungen kompatibler Mutanten (FB1 Δ GA-#28 und FB2 Δ GA-#5) war ein verringertes *mfa1*-mRNA-Niveau festzustellen (Abb. 18B). Die *mfa2*-Expression war ähnlich der *mfa1*-Expression sowohl in FB2 Δ GA#28 als auch in der Kreuzung kompatibler Δ GA-Mutanten im Vergleich zur jeweiligen Wildtypsituation reduziert (nicht gezeigt). Im gleichen Experiment waren

für die Expression der *b*-Gene aber keine Unterschiede festzustellen (Abb. 18B). Deshalb ist vermutlich die reduzierte Pheromongenexpression in Δ GA-Mutanten die Ursache für die verminderte Filamentbildung. Da sich aber auf dem in Δ GA-Mutanten deletiertem Fragment keine mRNA nachweisen ließ (siehe Kapitel 2.4.5.) und auch die Sequenzanalysen keinen Hinweis auf ein Gen lieferten, bleibt weiter ungeklärt, welche Eigenschaft dieser Region zum Phänotyp der Mutanten führt.

2.3.2.2 Der Phänotyp der Δ GA-Stämme kann nicht komplementiert werden

Um den regulatorischen Effekt der GA-Region auf die Pheromongenexpression näher zu charakterisieren, wurden Experimente zur Komplementation des Phänotyps der Δ GA-Mutanten durchgeführt.

Dafür wurden sowohl das Plasmid pSC4, das ein 5,5 kb *Hind*III-Fragment mit der GA-Region enthält (Abb. 17 und M&M), als auch die Cosmide 8H11 und 9A1 in FB1 Δ GA- bzw. FB2 Δ GA-Stämme transformiert. Daraus resultierten die Stämme CA107 (*a1b1* Δ GApSC4) und CA108 (*a2b2* Δ GApSC4) bzw. Transformanden mit den Cosmiden FB1-8H11, FB2-8H11, FB1-9A1 und FB2-9A1. Da durch ektopische Integration die Regulation der potentiell komplementierenden Gene beeinflußt werden könnte, wurden je acht verschiedene Stämme in paarweiser Kombination auf die Ausbildung von dikaryotischen Filamenten im Kreuzungstest untersucht. Es wurde in keinem Fall eine Komplementation des Kreuzungsdefektes beobachtet (nicht gezeigt). Ein möglicher Grund dafür könnte sein, daß die verwendeten Fragmente nicht alle für eine Komplementation benötigten Elemente besaßen. Alternativ wäre möglich, daß die Position der inserierten Fragmente im genomischen Kontext wichtig für die Komplementation ist.

In einem weiteren Experiment zur Charakterisierung der GA-Mutation wurde eine Insertionsmutagenese durchgeführt. Dazu wurden Stämme generiert, die ein SGFPcbx-Fragment mit dem bereits beschriebenen 62 bp *mfa1*-Basalpromotor aus pCA125 an den Positionen -100, -300 und -700 relativ zur Poly-GA-Sequenz trugen (pSC5, pSC6, pSC7, M&M und Abb. 16). Durch das Einbringen des GFP-Reportergens sollte GFP-Expression festzustellen sein, falls sich ein aktives *cis*-Element in der Nähe befindet. Bei der Analyse von jeweils drei unabhängigen Insertionsmutanten in FB1 und FB2 (FB1SC5, FB2SC5, FB1SC6, FB2SC6, FB1SC7, FB2SC7) wurde aber weder der Δ GA-Phänotyp noch GFP-Expression beobachtet (S. Cubasch, persönliche Mitteilung). In einem weiteren Experiment wurde die Mutante #1486 einer Segregationsanalyse unterzogen. Es konnten Segreganden isoliert werden, die die Δ GA-Mutation in den vier Kreuzungstypen trugen. Nach Mischung solcher Stämme mit kompatiblen Partnern konnte GFP-

Fluoreszenz in den Filamenten nachgewiesen werden, es wurde aber kein Kreuzungsdefekt in Mischungen kompatibler Mutanten festgestellt.

Da der Phänotyp der Δ GA-Mutanten nicht durch Komplementation gerettet werden konnte und Insertionen nicht zum GA-Phänotyp führten, bleibt die Ursache des Phänotyps weiter unklar.

2.3.3 Die Mutante #219

Bei der Mutante #219 kann nach Infektion von Maispflanzen schwache GFP-Fluoreszenz ausschließlich beim Wachstum in der Pflanze beobachtet werden (nicht gezeigt). Um das Integrationsereignis zu untersuchen, wurde für Southernanalysen die DNA mit *Bam*HI geschnitten und mit pCA104 als DNA-Sonde hybridisiert. Es konnten zwei Fragmente von etwa 5,1 kb bzw. etwa 8,4 kb detektiert werden. Demnach lagen zwei Insertionen von pCA104 an unterschiedlichen Stellen im Genom vor. Bei einem Integrationsereignis war mindestens eine *Bam*HI-Schnittstelle verloren gegangen, da das detektierte Fragment größer als der Plasmidanteil allein war (nicht gezeigt). Durch "plasmid rescue" konnten zwei Plasmide, pCA219-13 und pCA219-15 isoliert werden. Diese enthielten neben pCA104 weitere genomische DNA-Sequenzen, die vermutlich die Flanken der Insertionsstelle darstellen (Abb. 19A und Abb. 19B). Beide Plasmide wurden durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen kartiert (nicht gezeigt). Die jeweilige *U. maydis*-DNA wurde sequenziert. Es zeigte sich, daß sich in pCA219-13 nur 5' des Plasmidanteils von pCA104 eine *Bam*HI-Schnittstelle befand, die entsprechende Schnittstelle an der 3'-Position jedoch fehlte. Deshalb war vermutlich eine *Bam*HI-Schnittstelle bei der Integration zerstört worden. Im Plasmid pCA219-15 wurden zwei *Bam*HI-Schnittstellen durch Sequenzierung ermittelt (Abb. 20). Beide Plasmide waren demnach an *Bam*HI-Schnittstellen inseriert. Dies läßt auf eine durch *Bam*HI vermittelte REMI-Integrationen schließen.

Im Plasmid pCA219-13 befand sich die REMI-Insertion in einer 3120 bp langen intergenischen Region von zwei konvergent transkribierten Leserahmen, von denen einer für ein Gen kodiert, das Ähnlichkeit zu Abp1p aus *S. cerevisiae* (NP010012.1) aufwies. Das entsprechende Gen wurde *abp1* (actin binding protein 1) genannt. Das putative Stopkodon von *abp1* befand sich 770 bp vom 3'-Ende von pCA104 entfernt. Der zweite Leserahmen kodierte für ein putatives Polypeptid von 1176 aa mit Ähnlichkeit zum LIM-Domänen-Protein Lrg1p aus *S. cerevisiae* (Müller *et al.*, 1994). Für dieses Gen, *ldp1*, liegt das potentielle Startkodon 2350 bp stromaufwärts des *mfa1*-Basalpromotors (Abb. 19A). Ldp1 gehört zu einer Klasse von Proteinen, die in verschiedenen Organismen an entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt ist (Sanchez-Garcia und Rabbitts, 1994). Die Deletion von Lrg1p beeinträchtigt beispielsweise das Paarungsverhalten und die Sporulation in der Bäckerhefe (Müller *et al.*, 1994). Deshalb wurde versucht, *ldp1*-Nullmutanten

herzustellen. Dafür wurde das Plasmid pCA213 konstruiert, indem 3147 Basenpaare des offenen Leserahmens von *ldp1* vom putativen Startkodon an durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt sind (M&M). pCA213 wurde in FB1 und FB2 transformiert und die Transformanden in Southernanalysen auf homologen Genaustausch hin untersucht. Aus 126 haploiden Transformanden konnte keine *ldp1*-Nullmutante isoliert werden (nicht gezeigt). Es ist deshalb gut möglich, daß *ldp1* für *U. maydis* essentiell ist.

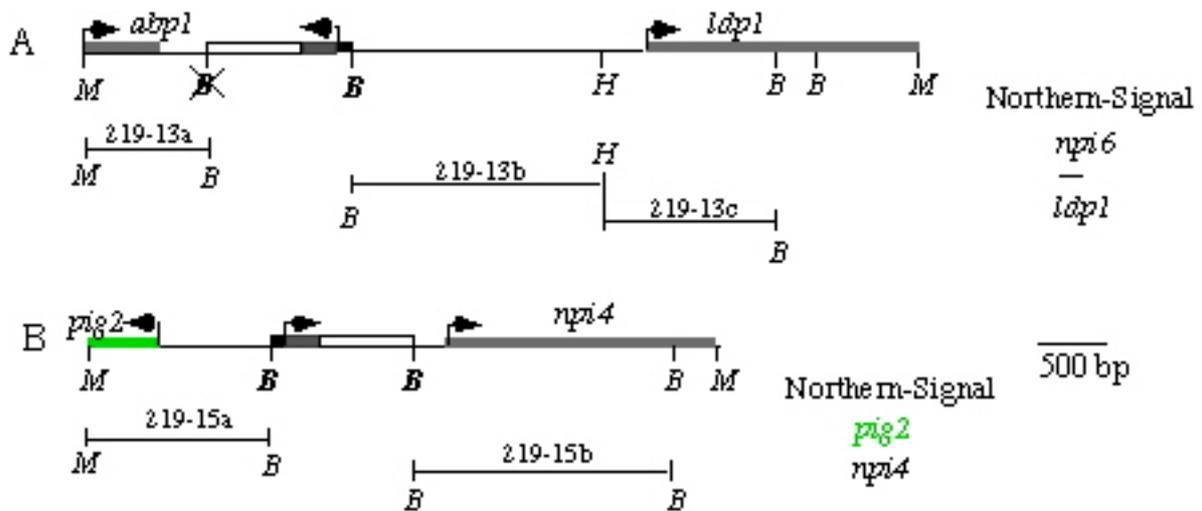


Abbildung 19 : Schematische Darstellung der Integrationsereignisse in der Mutante #219. A: Offene Leserahmen und deren Orientierungen sind als Pfeile dargestellt. pCA104 ist nicht Maßstabsgetreu dargestellt und ist 5,1 kb groß. Die Insertionsschnittstelle ist durch Fettdruck hervorgehoben. **B:** Die in Northernanalysen verwendeten DNA-Sonden sind in M&M beschrieben. Das *pig2*-Gen wird pflanzenspezifisch induziert. Der Größenstandard entspricht 500 bp. B = BamHI, M = MluI, H = HindIII.

Im Plasmid pCA219-15 wurde die REMI-Insertion in einer intergenischen Region von 1220 bp lokalisiert. 250 bp stromabwärts der Insertionsstelle befand sich ein ORF, der für die C-terminalen 1023 aa eines putatives Polypeptids codiert, das signifikante Ähnlichkeit zu einem 164 kD-Protein aus *S. pombe*, dem bislang keine Funktion zugeordnet wurde, aufwies (Altschul *et al.*, 1997). 723 bp stromaufwärts von der Integrationsstelle lag ein weiterer ORF, der divergent zum *mfal*-Basalpromotor aus pCA104 transkribiert wurde (Abb. 19B). Das vorhergesagte Genprodukt war 551 aa lang und wies Ähnlichkeit zu Protein-Disulfid-Isomerasen auf (Altschul *et al.*, 1997; Tachikawa *et al.*, 1991).

In Northernanalysen wurde die Expression der vier isolierten Gene in FB1, FB2, FBD11 und Mischungen von FB1 und FB2, die auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien inkubiert wurden, mit der Expression in Tumorgewebe aus Infektionen mit Mischungen von FB1 und FB2 verglichen. Als DNA-Sonden dienten Fragmente aus den jeweiligen ORFs (M&M, Abb. 19). Für das *abp1*-, das

ldp1- und das Gen, das Homologie zu dem 164 kD-Protein in *S. pombe* aufwies, wurde jeweils ein Transkript beobachtet, dessen Menge nicht variierte (nicht gezeigt). Letzteres wurde deshalb als *npi4* bezeichnet. Aufgrund der Northernanalyse war es unwahrscheinlich, daß die differentielle GFP-Expression in der Mutante #219 durch die regulatorischen Elemente dieser Gene vermittelt wird.

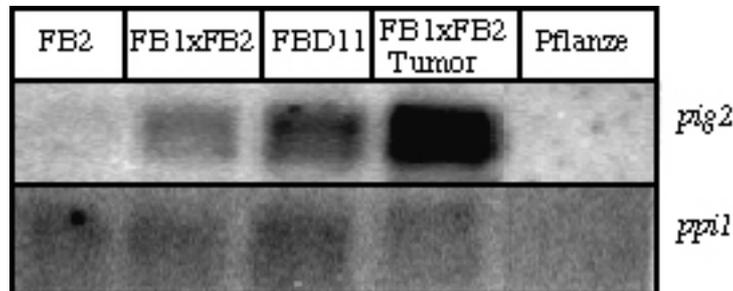


Abbildung 20: *pig2* ist spezifisch in der Pflanze induziert. Die verwendeten Stämme, Stammkombinationen und Tumorgewebe sind über den Spuren angegeben. Bei RNA-Präparationen von Stämmen, die auf Plattenmedien gewachsen waren erfolgte eine vorherige Inkubation der Stämme und Stammkombinationen von 48 h auf CM-Aktivkohle-Platten. Von RNA aus axenischer Kultur wurden jeweils 0,5 µg Gesamt-RNA und von RNA aus Tumor- und Pflanzengewebe je 80 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Als Sonde zur Detektion von *pig2*-mRNA diente ein 1500 bp langes *BamHI/MluI*-Fragment aus pCA219-15 (219-15a). Als Marker für konstitutive Genexpression wurde der Blot mit einem 150 bp *SalI/PstI*-Fragment aus dem *ppi1*-Gen hybridisiert.

Für das Gen, das Homologie zu Protein-Disulfid-Isomerasen aufwies konnte ein differentielles Expressionsmuster beobachtet werden (Abb. 20). In haploiden Sporidien war eine geringe basale Expression detektierbar. In Mischungen kompatibler Sporidien sowie in FBD11 war demgegenüber eine Induktion festzustellen. In Tumorgewebe, erfolgte eine weitere, im Vergleich zu filamentösen Dikarien etwa achtfache Erhöhung der Expression (Abb. 20). Das Gen wurde aufgrund seiner pflanzenabhängigen Induktion *pig2* (plant induced gene2) genannt. Da das REMI-Plasmid im Plasmid p219-15 umgekehrt zur Transkriptionsrichtung des *pig2*-Gens orientiert war, ist es wahrscheinlich, daß es sich bei dem Element, das die pflanzen-spezifische GFP-Expression in der Mutante steuert, um ein *cis* aktives Element des *pig2*-Promotors handelt (Abb. 19B). Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der REMI-Mutanten konnte bei der Mutante #219 keine Fluoreszenz auf Plattenmedien festgestellt werden. Dies läßt darauf schließen, daß die Expression von *pig2* in haploiden Sporidien und im filamentösen Dikaryon nicht für eine detektierbare Menge an SGFP in der Mutante ausreichte. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß markierte Gene relativ stark exprimiert sein müssen, um mit SGFP als Reportergen die entsprechende GFP-Fluoreszenz nachzuweisen zu können. Um *pig2* eine Funktion im Lebenszyklus von *U. maydis* zuzuordnen, wurden von K. Hansson freundlicherweise *pig2*-

Insertionsmutanten hergestellt. Dazu wurde im Plasmid pKH222 eine Hygromycin B-Kassette 45 aa nach dem putativen Translationsstart in den ORF von *pig2* inseriert. pKH222 wurde in FB1 und FB2 transformiert und die Transformanten anschließend in Southernanalysen auf homologen Genaustausch hin untersucht. Es konnte eine Reihe solcher Stämme isoliert werden (FB1 Δ *pig2* und FB2 Δ *pig2*), die sich aber in Kreuzungsexperimenten und im Pathogenitätstest nicht von Kontrollstämmen unterschieden (K. Hansson, persönliche Mitteilung). Obwohl *pig2* während der biotrophen Phase induziert wurde, war es für diese Prozesse nicht essentiell.

2.3.4 Die Mutante #1685

In der Mutante #1685 wurde GFP-Fluoreszenz in Sporidien auf der Blattoberfläche beobachtet (Abb. 21), nicht jedoch auf künstlichen Medien (nicht gezeigt). Differentielle Genexpression fand damit in einem Stadium statt, in dem der morphologische Wechsel zum filamentösem Wachstum noch nicht vollzogen war. Deshalb handelte es sich bei dieser Induktion um ein frühes Ereignis vor der biotrophen Phase, das aber dennoch spezifisch für die Interaktion mit der Pflanze ist. Southernanalysen der Mutante #1685 zeigten, daß hier 25 -30 Plasmide in Tandemanordnung im Genom integriert waren (Abb. 24). Damit war eine Reisolierung der Flanken durch Methoden, die auf Ligation beruhen (Transformation oder PCR-Methode) nicht möglich (H. Böhnert und K.- H. Braun, persönliche Mitteilungen). Deshalb wurde die 5'- Flanke an der Integrationsstelle durch Southernhybridisierung mit dem 62 bp *mfa1*-Basalpromotorfragment aus pCA125 als DNA-Sonde identifiziert (Abb. 22). Durch den Vergleich mit dem Bandenmuster im Ausgangsstamm FBD11 konnte die endogene Kopie von *mfa1* nachgewiesen und dadurch von der 5'- Flanke an der Insertionsstelle von pCA125 unterschieden werden (Abb.22).

Die genomische DNA von FBD11 und der Mutante #1685 wurde mit verschiedenen Enzymen geschnitten (Abb. 22). Nach der Hybridisierung mit dem *mfa1*-Basalpromotorfragment war in FBD11 jeweils eine Bande zu erkennen, die der genomischen Kopie von *mfa1* entsprach. In der Mutante waren drei Banden zu erkennen. Ein stark hybridisierendes Fragment mußte den repetitiven Vektoranteil repräsentieren. Zwei Banden gleicher Intensität sollten der 5'-Flanke an der Insertionsstelle und der endogenen Kopie von *mfa1* entsprechen (Abb. 22). Ein 800 bp großes *NcoI*-Fragment, das die stromaufwärts liegenden Fragmente an der Insertionsstelle enthielt, wurde für eine Klonierung ausgewählt, da sich die größeren, potentiell störenden Vektorfragmente hiervon gut abtrennen ließen. Dazu wurde die genomische DNA der Mutante #1685 mit *NcoI* geschnitten und Fragmente der entsprechenden Größe kloniert. Nach Transformation dieser partiellen genomischen *U. maydis* DNA-Bank in *E. coli* konnte durch Hybridisierung mit dem *mfa1*-

Basalpromotor-Fragment in einem Koloniehybridisierungsexperiment ein Plasmid mit einem 800 bp langen *NcoI*-Fragment isoliert werden (pCA242, M&M).

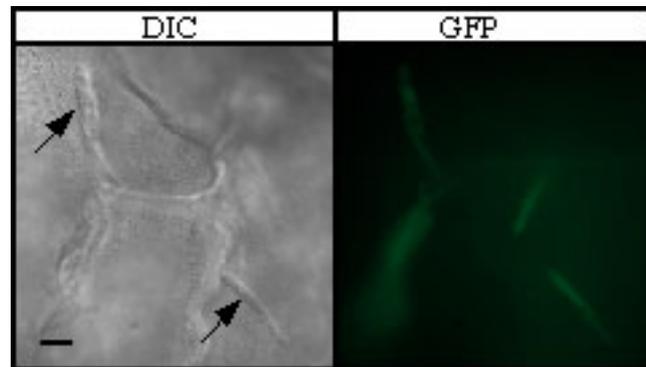


Abbildung 21: In der Mutante #1685 ist GFP-Expression in Sporidien auf der Blattoberfläche zu beobachten. Die Mutante #1685 wurde in junge Maispflanzen injiziert. Nach 24 h wurden Proben jeweils lichtmikroskopisch (DIC) und fluoreszenzmikroskopisch (GFP) beobachtet und auf Pilzstrukturen und grüne Fluoreszenz hin untersucht (M&M). Der Gößenstandard, als schwarzer Balken dargestellt, entspricht 3 μ m.

Die Sequenzierung ergab, daß das Fragment neben dem *mfa1*-Basalpromotor noch unbekannte genomische *U. maydis*-Sequenzen, vermutlich aus dem 5'-Bereich an der Insertionsstelle, enthielt (Abb. 23A und M&M). Die *Bam*HI-Schnittstelle an der Integrationsstelle war ebenfalls erhalten geblieben, so daß höchstwahrscheinlich eine *Bam*HI vermittelte REMI-Integration vorlag. Da sich auf dem 800 bp-Fragment kein ORF befand, wurden mit dem Fragment als DNA-Sonde die Cosmide 10E1 und 21A2 isoliert, die weitere flankierende Sequenzen enthielten. Nach der Sequenzierung stellte sich heraus, daß die Insertion von pCA125 2509 bp stromaufwärts eines, zum GFP-Gen divergent transkribierten ORFs erfolgt war. Dieser ORF, *pig3*, kodiert für ein putatives Polypeptid von 936 aa, das keine Homologie zu bekannten Proteinen aufwies (Tabelle 1). 248 bp stromabwärts der REMI-Insertion befand sich ein zweiter ORF, *pig4*, der konvergent zu *pig3* transkribiert wird und für ein putatives Polypeptid von 706 aa kodiert (Abb. 23A).

Das Pig4-Protein zeigte in Datenbankanalysen (Altschul *et al.*, 1997) signifikante Ähnlichkeit zu Mitgliedern der Hexose-Transporter-Familie (Abb. 32 und Tabelle 1). Weitere Computeranalyse (ExPASy tools) sagten für Pig4 neben zwei Hexose-Transportmotiven, die in Hexosetransporter typischerweise vorkommenden 12 Transmembrandomänen voraus (Abb. 32).

Interessanterweise wurde für beide Gene Induktion während der biotrophen Phase festgestellt (Abb. 24). Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß sich in dieser Umgebung noch weitere differentiell exprimierte Gene befinden. Auf insgesamt 20180 bp, im folgenden als *p*-Locus bezeichnet, konnten

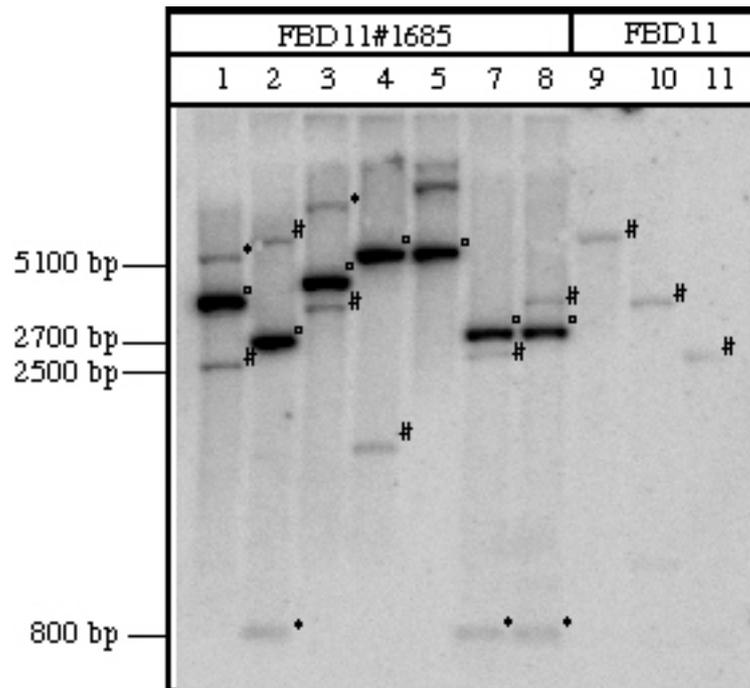


Abbildung 22: Southernanalyse der Mutante #1685 zur Identifizierung der genomischen 5' Flanke. Die verwendeten Stämme sind angegeben. Die DNA wurde wie folgt geschnitten: Spur 1: *PstI*; Spur 2: *NcoI*; Spur 3: *EcoRI*; Spur 4: *SacII*; Spur 5: *SacI*; Spur 6 *NcoI/PstI*; Spur 7 *NcoI/PstI*; Spur 8: *NcoI/EcoRI*; Spur 9: *NcoI*; Spur 10: *EcoRI*; Spur 11: *PstI*, aufgetrennt, gebロットet und anschließend mit dem *mfa1*-Basalpromotorfragment als Sonde hybridisiert. Die mit # gekennzeichneten Banden entsprachen der endogenen Kopie von *mfa1*, wobei die Länge der Fragmente durch Sequenzanalysen des bekannten *al*-Locus ermittelt wurden oder in FBD11 als Fragmente gleicher Länge nachzuweisen waren. Mit ° gekennzeichnete Banden stellten die Plasmidanteile dar. Die mit * markierte Banden entsprachen der 5' Flanke an der Insertionsstelle im Genom der Mutante. Als Größenmarker diente *PstI* geschnittene λ -DNA.

4 weitere ORFs, *npi1*, *npi2*, *npi3* und *pig6* sowie ein Sequenzabschnitt, der große Ähnlichkeit zu 5,8s rRNA Genen aufwies, identifiziert werden. *npi3*, *npi1* und *pig6* lagen stromaufwärts der Insertionsstelle, wobei *pig6* und *pig4* divergent und *npi1* konvergent zur Transkriptionsrichtung des GFP-Gens abgelesen wurden (Abb. 23B). *pig3* und *npi2* liegen stromabwärts der Insertionsstelle und werden divergent zum GFP-Gen transkribiert (Abb. 23B). *pig6* kodiert für ein putatives Polypeptid von 603 aa, das hohe Ähnlichkeit zur "multiple drug resistance transporter"-Familie aufweist (Abb. 33 und Tabelle 1). Laut Vorhersage des Protein-programms "Expasy Tools" besitzt Pig6 12 Transmembrandomänen (Abb. 31). *npi1* kodiert für ein putatives Polypeptid von 649 aa Länge, das Homologie zu einem nicht charakterisierten Protein aus Hefe aufweist (YLR290C). Der ORF von *npi2* wurde durch ein Stopkodon unterbrochen, so daß die Größe des putativen Polypeptids nicht bekannt ist. Zudem konnte in einer Proteinanalyse keine Homologie zu bekannten

Proteinen festgestellt werden. Die N-terminalen 351 aa des putativen Npi3-Polypeptids weisen keine Homologie zu bekannten Proteinen auf.

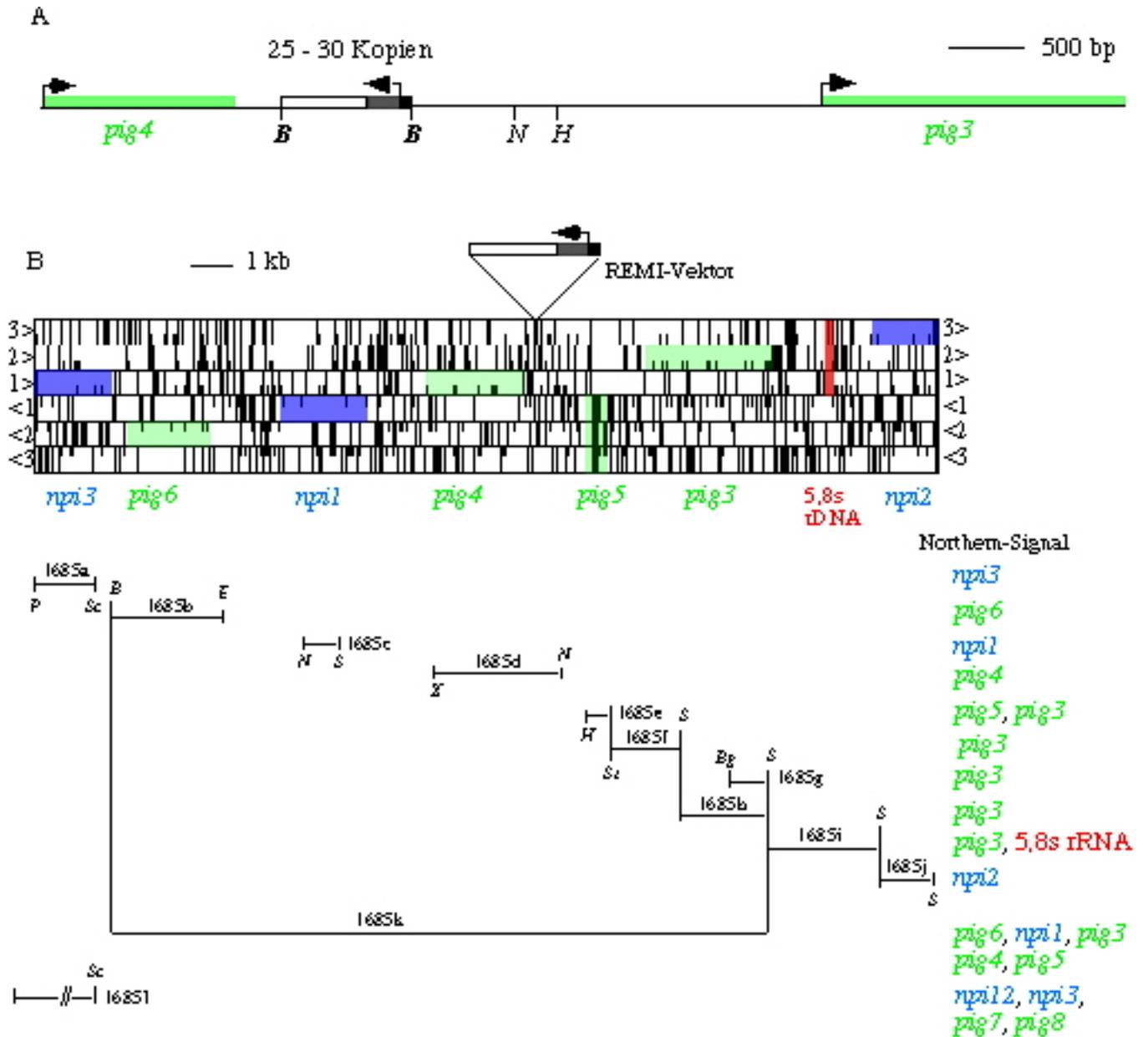


Abbildung 23. A: Schematische Darstellung der REMI-Insertion in der Mutante #1685. Die Insertionsschnittstelle ist durch Fettdruck hervorgehoben. pCA125 ist nicht maßstabsgetreu dargestellt und ist 5,1 kb groß. Pfeile geben die Orientierung der Transkriptionsrichtungen an. *B* = *Bam*HI, *N* = *Nco*I, *H* = *Hind*III. Der Größenstandard entspricht 500 bp. **B: Der *p*-Locus von *U. maydis* als ORF-Karte dargestellt.** pCA125 markiert die Insertionsstelle. ORFs sind hervorgehoben, wobei pflanzenspezifisch exprimierte Gene grün und konstitutiv exprimierte Gene blau dargestellt sind. Der Bereich mit Homologie zu 5,8s rRNAs ist rot gekennzeichnet. Die für Northernanalysen verwendeten DNA-Sonden und davon detektierten Transkripte sind angegeben und in M&M näher beschrieben. Der Größenstandard entspricht 1 kb.

Tabelle 1: Die Gene des *p*-Locus

Gene	Anzahl der aa der putativen Polypeptide	Homologie zu	Organismus
<i>pig3</i>	936	keine Homologie zu bekannten Proteinen	
<i>pig4</i>	706	Hexosetransporter	<i>D. radiodurans</i>
<i>pig5</i>	-	keine Homologie, kein ORF?	
<i>pig6</i>	603	"multiple drug resistance transporter"	<i>P. olsonii</i>
<i>npi1</i>	649	Homologie zu YLR290C	<i>S. cerevisiae</i>
<i>npi2</i>	?	keine Homologie zu bekannten Proteinen	
<i>npi3</i>	351	keine Homologie zu bekannten Proteinen	
<i>U.m. 5,8s rRNA</i>	-	5,8s rRNA	

Um die Expression der Gene des *p*-Locus zu bestimmen, wurden Northernanalysen durchgeführt, wobei jeweils die Genexpression in Mischungen aus FB1 und FB2 auf aktivkohlehaltigen Medien mit der in jungen und alten Tumorgewebe verglichen wurde. Als junge Tumore wurden solche Stadien bezeichnet, in denen die Sporulation noch nicht eingesetzt hatte, während in sogenannten alten Tumoren bereits Teliosporen gebildet wurden (M&M). Alle verwendeten Sonden sind in Abb. 25 bzw. M&M angegeben. In Vorexperimenten wurde gezeigt, daß diese nicht mit RNA-Spezies aus der Maispflanze kreuzhybridisieren (nicht gezeigt). Für *npi1*, *npi2* und *npi3* wurde je ein Transkript nachgewiesen, dessen Menge in den einzelnen Stadien nicht variierte. Demzufolge sind diese Gene unabhängig von Pflanzenfaktoren exprimiert (Abb. 24).

Die Expression der *pig4*-mRNA war nur in Tumorgewebe nachweisbar, nicht jedoch in axenischer Kultur, wobei die Expression in alten Tumoren höher war als in jungen (Abb. 24). Das *pig4*-Gen wird demnach spezifisch in der späten Entwicklungsphase transkribiert. Für *pig6* konnte keine oder nur sehr geringe Transkription in Tumorgewebe detektiert werden. Dafür war *pig6* in Mischungen von FB1 und FB2 auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien stark exprimiert (Abb. 24). Das *pig6*-Gen wird demnach während der biotrophen Phase reprimiert.

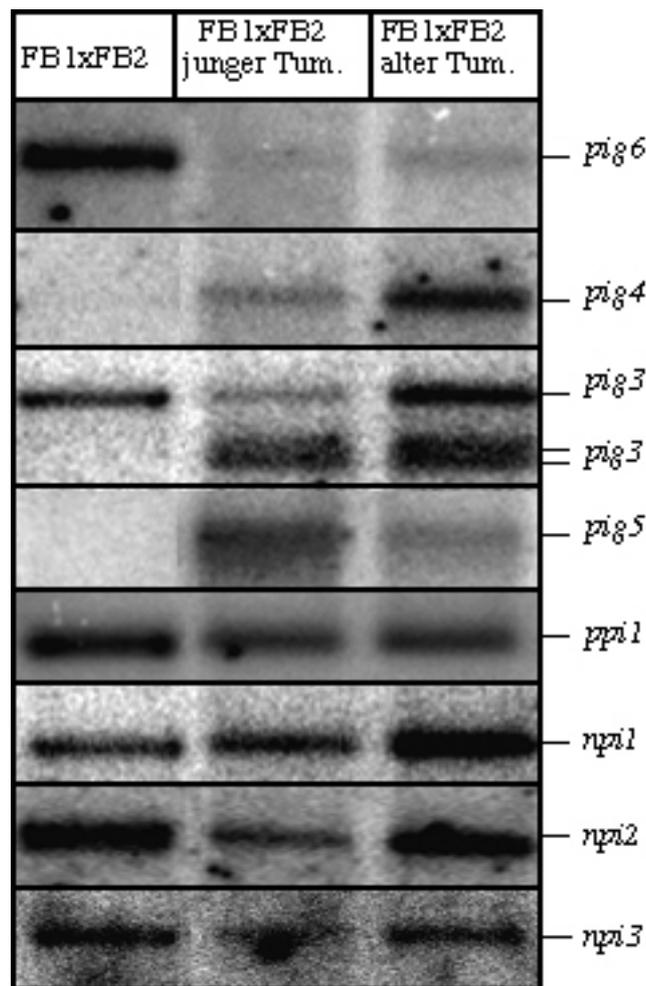


Abbildung 24: Die Expression von *pig3*, *pig4*, *pig5* und *pig6* ist pflanzenspezifisch reguliert. Zur Isolierung von RNA aus Tumorgewebe wurden Maispflanzen mit Mischungen aus FB1 und FB2 infiziert und die Tumore wie angegeben geerntet. Der RNA-Extraktionen aus Kreuzungen von FB1 und FB2 ging eine 48 stündige Inkubation auf CM-Aktivkohle-Platten voraus. Es wurden 0,07 μg poly A⁺ RNA aus axenischer Kultur und je 1 μg poly A⁺ RNA aus Tumorgewebe pro Spur aufgetragen (M&M). Als Sonden zur Analyse der Genexpression wurden folgende Fragmente verwendet: für *pig3* ein 2,1 kb *SphI*-Fragment (1685h) aus pKH541; für *pig4* ein 1,6 kb *NcoI/XbaI*-Fragment(1685d) aus pKH519; für *pig5* ein 480 bp *HindIII/SpeI*-Fragment (1685e) aus pKh541; für *pig6* ein 2,3 kb *BamHI/EcoRI*-Fragment (1685b) aus pKH551; für *npil* ein 850 bp *SphI/NcoI*-Fragment (1685c) aus pKH551; für *npil2* ein 900 bp *SphI*-Fragment (1685j) aus KH550; für *npil3* ein 600bp *PstI/SacI*-Fragment aus pKH570 (1685a). Als Mengenbestimmung für konstitutive Genexpression wurde der Blot mit einem 150 bp *SalI/PstI*-Fragment aus dem *ppil*-Gen hybridisiert.

Bei den Northernanalysen konnte mit dem Fragment 1685f eine weitere differentiell exprimierte mRNA-Spezies, *pig5*, nachgewiesen werden (Abb. 24). Die höchste *pig5*-Expression konnte in jungen Tumoren beobachtet werden, während in älteren Tumoren weniger und auf

aktivkohlehaltigen Plattenmedien keine Transkription nachweisbar war (Abb. 24). Der *pig5*-mRNA konnte durch Sequenzanalysen aber kein ORF zugeordnet werden. Ob *pig5* für ein Protein kodiert ist somit unklar. Darüber hinaus konnte mit dem Fragment 1685f und weiteren Sonden das *pig3*-Gen nachgewiesen werden. Es wurden dabei drei mRNA-Spezies detektiert (Abb. 24). Ein großes Transkript (ca. 4000 - 4300 nt) konnte in allen untersuchten Stadien beobachtet werden, wobei es in frühen Tumorstadien (sehr junge Tumore) kaum exprimiert wurde (nicht gezeigt). Zwei kürzere mRNA-Spezies (ca. 3000 - 3300 nt) wurden ausschließlich in Tumorgewebe detektiert (Abb. 24). Für die kurzen Transkripte konnte somit ein klares, pflanzenabhängiges Regulationsmuster etabliert werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im *p*-Locus bislang für vier Gene *pig3*, *pig4*, *pig5* und *pig6* pflanzenspezifisch regulierte Transkription nachgewiesen wurde. Alle diese Gene werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung von *U. maydis* exprimiert. Deshalb sind vermutlich verschiedene Pflanzenkomponenten an der Regulation dieser Gene beteiligt. Zwischen den pflanzenregulierten Genen liegen drei konstitutiv exprimierte Gene, die somit unabhängig von der Regulation der *pig*-Gene exprimiert werden.

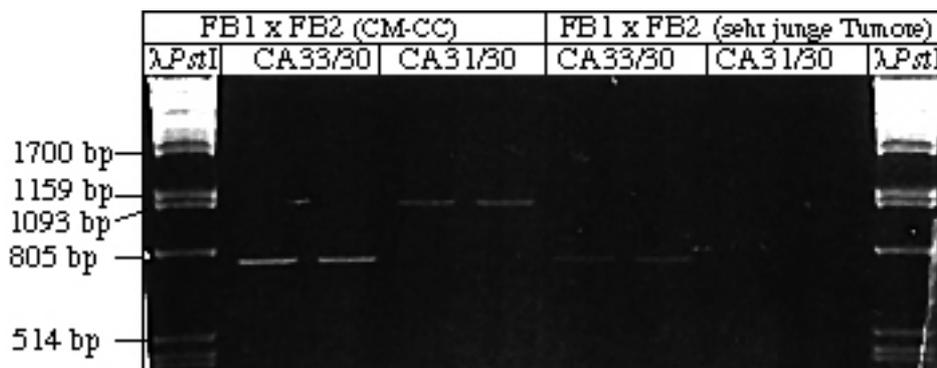


Abbildung 25: Die drei Transkripte von *pig3* unterscheiden sich in ihrem 5' UTR. Die PCR-Reaktionen wurden wie in M&M beschrieben durchgeführt und die Produkte anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt. Die verwendeten DNAs und Primer sind über den Spuren angegeben. Die Färbung von DNA erfolgte mit EtBr (M&M) und wurden mittels einer Geldoc Anlage (Biorad) detektiert.

Da sich von *pig3* beim Wachstum in der Pflanze in sehr frühen Tumorstadien hauptsächlich die beiden kürzeren mRNA-Spezies, das große Transkript jedoch kaum nachweisen ließ, stellte sich die Frage, ob die Transkription an unterschiedlichen Stellen initiiert wird, und/oder die unterschiedlichen mRNAs für unterschiedliche Proteine kodieren. Durch Northernanalysen mit RNA aus jungen und alten Tumoren sowie RNA von Mischungen aus FB1 und FB2 von aktivkohlehaltigen Plattenmedien wurde durch Hybridisierung mit entsprechenden Sonden (Abb. 23B) aus der 5' Region von *pig3* festgestellt, daß das große Transkript einen etwa 1kb langen 5'

UTR besitzt (nicht gezeigt). Durch RT-PCR- Experimente wurde nun untersucht, ob die Varianz in der Transkriptlänge zu einer Veränderung im putativen Pig3-Polypeptid führt.

Die Oligonucleotide CA30, CA31 und CA33 wurden so gewählt, daß ihre Bindestellen sich an den Positionen +480, -210 und -700 bezüglich dem putativen Startkodon von *pig3* befinden. Wenn eine entsprechend lange mRNA existiert, können mit den Primerpaaren Fragmente von 790 bp (CA30/CA33) bzw. 1180 bp (CA30/CA31) amplifiziert werden. Die Fragmente umfassen jeweils das erste Startkodon von *pig3*. Als Matrizen dafür wurden cDNAs, ausgehend von zwei unabhängigen Gesamt-RNA-Präparationen aus "sehr jungen" Tumoren bzw. Mischungen von FB1 und FB2 von aktivkohlehaltigen Plattenmedien, hergestellt (M&M). Mit der Primerkombination CA30/CA33 konnte sowohl in cDNAs aus Mischungen von FB1 und FB2 als auch aus cDNA aus Tumorgewebe das 790 bp Fragment amplifiziert werden (Abb. 25). In der Oligonucleotidkombination CA30/CA31 konnte jedoch nur mit cDNA aus Mischungen von FB1 und FB2 nicht jedoch mit cDNA aus Tumorgewebe das 1180 bp Fragment amplifiziert werden (Abb. 25). Nach Sequenzierung der PCR-Produkte wurden in keinem Amplikon Sequenzabweichungen zur genomischen *pig3*-Sequenz festgestellt (nicht gezeigt). Das bedeutet, daß alle Transkripte das gleiche putative Startkodon beinhalten und die Transkriptlänge im 5' UTR von *pig3* variiert. Es wird deshalb angenommen, daß der N-Terminus von Pig3 in allen Stadien das gleiche Polypeptid ist. Spleissvarianten im C-Terminus von Pig3 sind jedoch nicht ausgeschlossen.

2.3.4.1 Die *pig3*-Expression wird zu verschiedenen Zeitpunkten im Lebenszyklus von *U. maydis* an- und abgeschaltet

pig3 schien aufgrund der Lage der REMI-Insertion das Gen zu sein, dessen regulatorische Elemente die GFP-Expression in der Mutante #1685 steuern. Deshalb wurde in GFP-Reporterstämmen die *pig3*-Expression über den gesamten Lebenszyklus hinweg verfolgt. Dazu wurde im Plasmid pCA307 der ORF von *pig3* vom ersten Startkodon bis zum Stopkodon durch das EGFP-Gen ersetzt (M&M). pCA307 wurde in die haploiden Stämmen FB1 (*alb1*) und FB2 (*a2b2*) transformiert und homologer Genaustausch durch Southernanalyse bestätigt (nicht gezeigt). Durch die homologe Rekombination entstanden dabei nicht nur die gewünschten Reporterstämme, sondern auch *pig3*-Deletionsmutanten (siehe unten). Homologer Genaustausch konnte für zwei unabhängige FB1-Derivate (FB1 Δ *pig3-1* und FB1 Δ *pig3-2* von K. Hansson) und zwei FB2-Derivate (CA307-7, CA307-13) in dieser Arbeit nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Für die Expressionsanalyse von *pig3* wurden Maispflanzen mit Mischungen kompatibler GFP-

Reporterstämme infiziert und anschließend die Transkription von *pig3* fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (Abb. 26 und M&M).

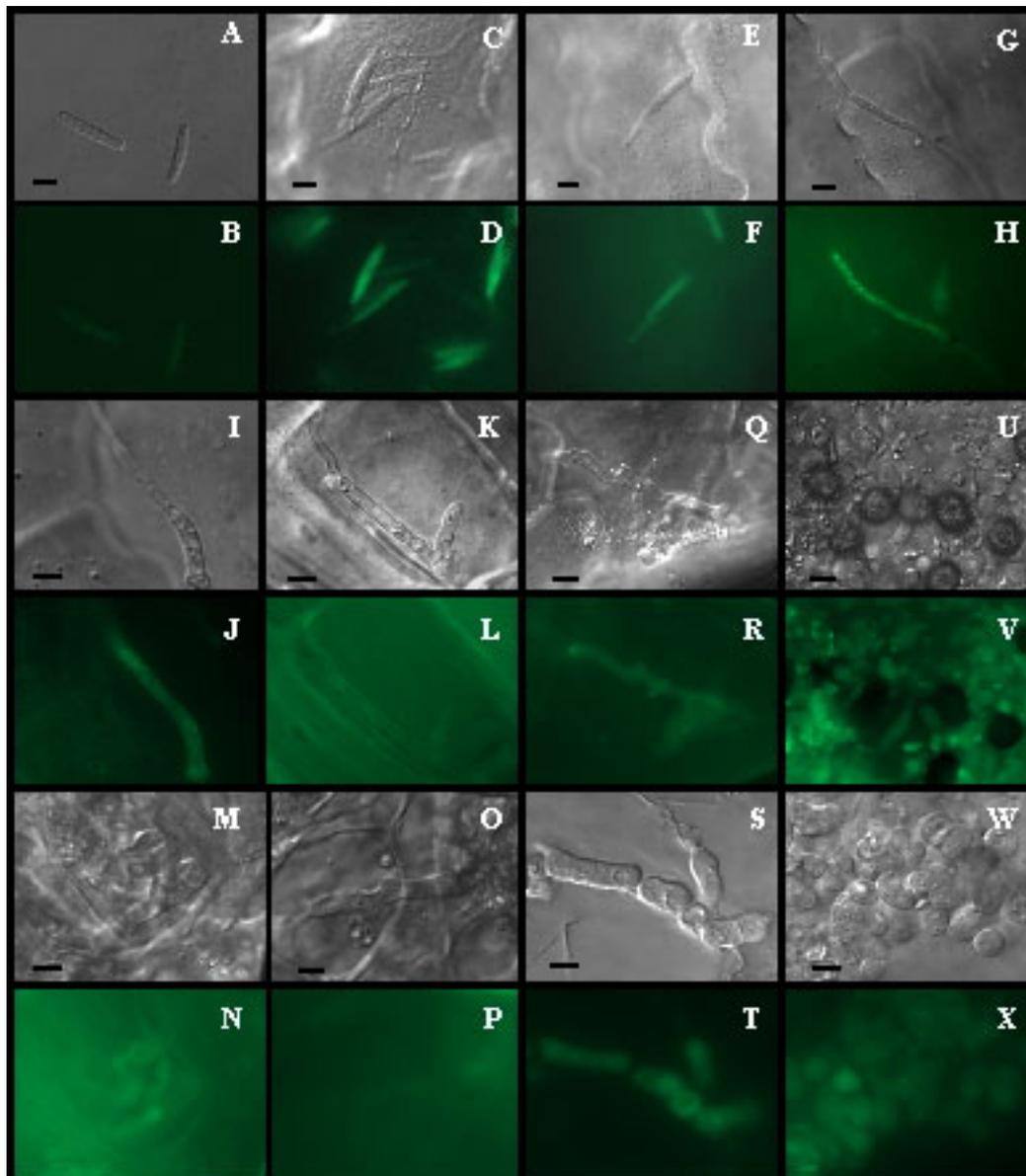


Abbildung 26: GFP-Expression in *pig3*-Reporterstämmen in verschiedenen Stadien der biotrophen Phase von *U. maydis*. Infiziertes Pflanzenmaterial wurde nach 24 h und anschließend alle 2 Tage nach Infektion auf Pilzbefall und GFP-Fluoreszenz hin untersucht. Der Größenstandard entspricht 3 μm . Weitere Erläuterungen siehe Text.

In einem Vorexperiment wurde die GFP-Expression in den Reporterstämmen nach Inkubation in PD- und MM-Flüssigmedium untersucht. Dabei konnte nur sehr schwache GFP-Expression

beobachtet werden (Abb. 26B und nicht gezeigt). In Sporidien, die sich auf der Blattoberfläche befanden, war hingegen starke GFP-Expression zu sehen (Abb. 26D und 26F). Im Vergleich dazu zeigten Sporidien mit Konjugationshyphen geringere GFP-Fluoreszenz, und auch in dikaryotischen Filamenten (Abb. 26H) und appressorienartigen Strukturen (Abb. 26J) war geringere GFP-Expression als in Sporidien zu beobachten. Es kommt also zur Induktion von *pig3* in Sporidien auf der Blattoberfläche, in den folgenden Stadien wird *pig3* wieder reprimiert. In Hyphen, die innerhalb der Pflanze wuchsen, war zunächst keine GFP-Fluoreszenz nachweisbar (Abb. 26L, 26N und 26P). Sobald Tumore gebildet wurden, war in den Hyphen erneut GFP-Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 26R und 26T). Diese Fluoreszenz verstärkte sich in sporogenen Hyphen und Präsporen (Abb. 26X) und war in Teliosporen nicht mehr nachweisbar (Abb. 26V). Damit kommt es während der Tumorentwicklung erneut zur Induktion von *pig3*, der eine Repression in Teliosporen folgt. Das Expressionsmuster von *pig3* in den GFP-Reporterstämmen entsprach damit der GFP-Expression in der Mutanten #1685 (nicht gezeigt). Deshalb regulieren die *cis*-Elemente von *pig3* vermutlich die GFP-Expression in dieser Mutante.

pig3 unterliegt demnach einer komplexen differentiellen Regulation, die verschiedene Induktions- und Repressionsschritte beinhaltet. Die Signale, die zu dieser Regulation führen, sollten sowohl auf der Pflanzenoberfläche als auch in Tumorgewebe zu finden sein.

2.3.4.2 Deletionsmutanten für *pig3* und *pig5*

Für *pig5* konnte kein offensichtlicher ORF identifiziert werden. Kurze ORFs in dieser Region wiesen keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen auf. Um dennoch *pig5*-Nullmutanten herzustellen, wurde ein 354 bp Fragment im Genom deletiert, das als Sonde in Northernanalysen die *pig5*-mRNA erkannt hatte (nicht gezeigt). Diese Deletion verhindert vermutlich nicht nur die Expression von *pig5* sondern auch die von *pig3*, da davon auch der 5' UTR von *pig3* betroffen ist. Im Plasmid pCA310 wurde ein 354 bp große Fragment deletiert und durch die *cbx*-Resistenzkassette ersetzt (M&M). pCA310 wurde in FB1 und FB2 transformiert und Stämme mit homologem Genaustausch durch Southernanalyse selektiert (nicht gezeigt). In den unabhängigen Transformanden FB1 Δ *pig5*#3, FB1 Δ *pig5*#8, FB2 Δ *pig5*#13, FB2 Δ *pig5*#25 war *pig5* durch den entsprechenden Bereich pCA310 ersetzt. In einem Kreuzungstest kompatibler Mutanten auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien konnte kein verändertes Paarungsverhalten festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob *pig5* an der pathogenen Entwicklung beteiligt ist, wurden Maispflanzen mit Mischungen aus kompatiblen Mutantenstämmen infiziert. Im Vergleich zu Infektionen aus FB1 und FB2 ergab sich auch hier keine Veränderung in der Pathogenität (nicht gezeigt). *pig5* wird demnach weder für die Paarung noch für die pathogene Entwicklung benötigt. Da der Verlust des *pig5*-

Transkriptes nicht experimentell bestätigt wurde und für *pig5* kein ORF abgeleitet werden konnte, muß diese Aussage jedoch mit Vorsicht bewertet werden.

Die Reporterstämme für die *pig3*-Expressionsstudien waren durch den Austausch von *pig3* durch GFP gleichzeitig Nullmutanten von *pig3* (siehe oben). Alle Reporterstämme waren lebensfähig und zeigten gegenüber den Ausgangsstämmen keine abweichende Morphologie. Zunächst wurde das Kreuzungsverhalten von Δ *pig3*-Mutanten auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien untersucht. Dazu wurden CA307-7, CA307-13 und FB2 Δ *pig3*-1 und FB2 Δ *pig3*-2 untereinander und gegen die Ausgangsstämme gekreuzt. Sowohl die Kreuzung einer Nullmutante gegen einen kompatiblen Wildtypstamm als auch die Kreuzung kompatibler Mutanten untereinander führte zur Ausbildung des filamentösen Dikaryon und damit zu keiner Veränderung gegenüber der Reaktion in kompatiblen Wildtypstämmen (nicht gezeigt). Da *pig3* verstärkt beim Wachstum in der Pflanze exprimiert war, wurde als nächstes der Einfluß des Funktionsausfalls von *pig3* auf die pathogene Entwicklung untersucht. Dazu wurden Maispflanzen mit den Stämmen CA307-7 und FB2 Δ *pig3*-1 bzw. CA307-13 und FB2 Δ *pig3*-2 infiziert. 90 % der Pflanzen zeigten nach Infektion mit kompatiblen Δ *pig3*-Mutanten Anthocyanfärbung, 98 von 117 infizierten Pflanzen bildeten Tumore aus. Da für die Kontrollinfektion mit den Ausgangsstämmen ebenfalls 92 % Anthocyanbildung und 95 % Tumorentwicklung festgestellt wurde, wird *pig3* auch nicht für die sexuelle Entwicklung benötigt.

2.3.4.3 Isolierung von Mutanten, die erhöhte *pig3*-Expression zeigen

Die pflanzenregulierte Expression der *pig*-Gene warf die Frage auf, welche Faktoren diese Gene regulieren. Eine Möglichkeit solche Faktoren zu isolieren, ist die Erzeugung von regulatorischen Mutanten der *pig*-Gene, die in einem zweiten Schritt komplementiert werden können. *pig3* wurde aufgrund seines Expressionsmusters für eine weitere Charakterisierung ausgewählt, weil Faktoren, die an seiner Regulation beteiligt sind, vermutlich in der frühen Phase der Entwicklung benötigt werden (s. Abb. 26). In einem ersten Schritt wurde der Promotor von *pig3* durch eine Deletionsanalyse näher charakterisiert.

2.3.4.3.1 *pig3* ist negativ reguliert

Für Promotordelationen wurden drei Plasmide hergestellt, die je ein 1077 bp (pCA304), ein 480 bp (pCA305) und ein 262 bp (pCA306) langes Promotorfragment von *pig3* als translationale Fusion an das EGFP-Gen trugen (Abb. 27A und M&M). Für die Transformation in FB2 wurden die

Plasmide jeweils in der *cbx*-Resistenzkassette linearisiert. Erfolgt eine homologe Rekombination am endogenen *cbx*-Locus, so sollten sich alle Konstrukte im selben genomischen Kontext befinden. Dies erlaubt eine vergleichende Expressionsanalyse (Abb. 27A und M&M). Singuläre, homologe Integrationen wurden durch Southernanalysen bestätigt (nicht gezeigt). In den so selektierten Reporterstämmen CA304 (P₁₀₇₇), CA305 (P₄₈₀) und CA306 (P₂₆₂) wurde die Aktivität der jeweiligen Promotorfragmente über die GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch und in Northernanalysen bestimmt (Abb. 27B).

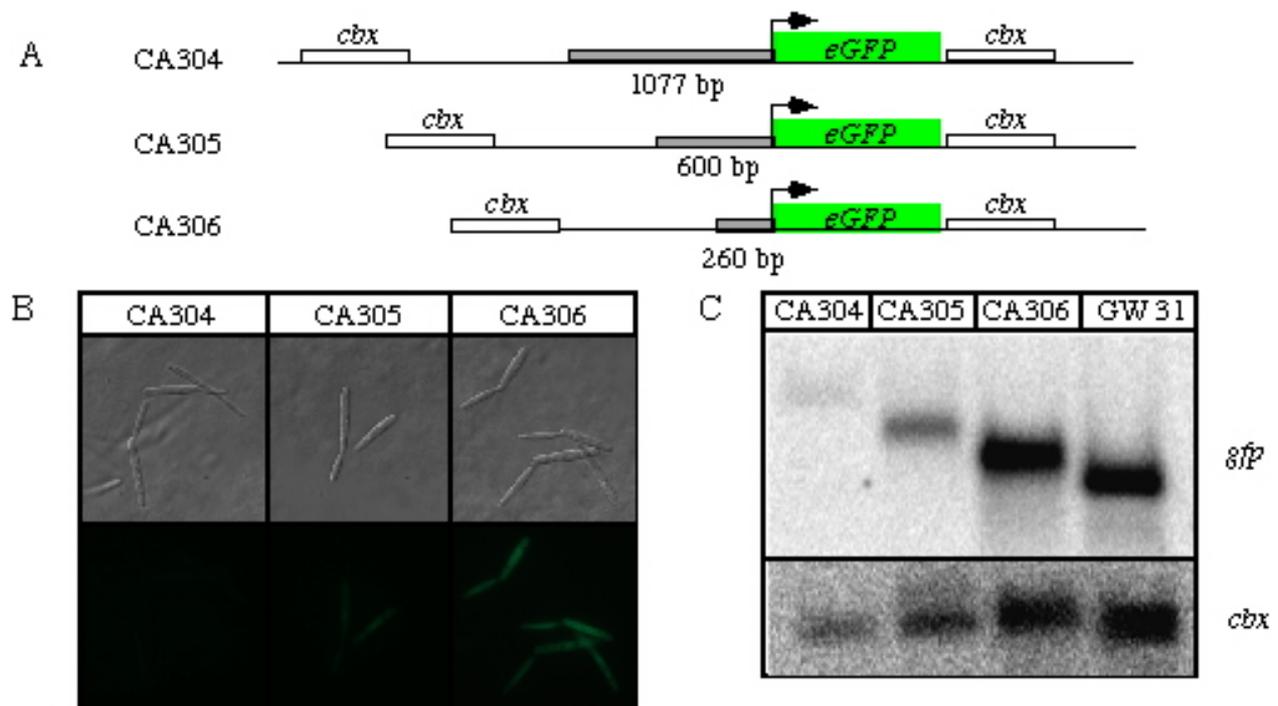


Abbildung. 27: *pig3* ist negativ reguliert. **A:** Schematische Darstellung der jeweiligen Promotor-GFP-Fusionen in den Stämmen CA304, CA305 und CA306. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der GFP-Fluoreszenz in den Reporterstämmen CA304, CA305 und CA306. Die Reporterstämmen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 in PD-Medium inkubiert und anschließend licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die jeweils verwendeten Stämme sind angegeben. **C:** Northernanalyse für die Reporterstämmen CA304, CA305 und CA306. Die Stämme wurden in PD-Flüssigmedium angezogen und die RNA anschließend bei einer OD₆₀₀ von 0,8 isoliert. Als Kontrolle für konstitutive GFP-Expression wurde RNA aus dem Stamm GW31 (*a2b2* P_{otef}GFP, G. Weinzierl, nicht publiziert) extrahiert. Es sind je 10 µg RNA pro Spur geladen. Zur Detektion von GFP wurde ein 723 bp langes *NcoI/NotI*-Fragment aus pCA125 verwendet (M&M). Als Ladekontrolle wurde mit einem 1700 bp *EcoRV/SmaI*-Fragment aus dem *cbx*-Gen hybridisiert.

Im Stamm CA304 war nur geringe GFP-Fluoreszenz zu beobachten, während in CA305 leichte und in CA306 starke GFP-Expression zu sehen war (Abb. 27B). Ein vergleichbares Expressionsmuster ergab sich auch in Northernanalysen (Abb. 27C). Diese Daten ließen darauf schließen, daß der

pig3-Promotor negativ reguliert war und sich zwischen Position -1077 und -262 *cis*-Elemente befinden müssen, die für die Regulation wichtig sind. Auffallend war, daß mit der Verkürzung der Promotorfragmente auch eine Verkürzung der Transkriptlänge einherging. Daraus ließe sich ableiten, daß möglicherweise die Transkriptionsinitiation vom *cbx*-Locus ausgehend erfolgt. Es ist jedoch anzumerken, daß in verschiedenen Deletionsanalysen von Promotoren im *cbx*-Locus bislang keine Verkürzungen der mRNA-Längen beobachtet wurden (G. Weinzierl, C. Basse, A. Brachmann, persönliche Mitteilung). Des weiteren wurden die Deletionskonstrukte von *pig3* in verschiedenen Orientierungen in den *cbx*-Locus integriert, wobei in allen Fällen die Verkürzungen beobachtet wurde (nicht gezeigt). Deshalb wurde vermutet, daß an kryptischen Initiationsstellen im Promotor von *pig3* diese Transkripte initiiert werden.

Diese Daten zeigten für *pig3* negative Regulation. Es kann deshalb angenommen werden, daß die Faktoren, die *pig3* regulieren, eine Derepression vermitteln.

2.3.4.3.2 Versuch zur Isolierung von Mutanten, die in der Regulation von *pig3* gestört sind

Um Mutanten zu erzeugen, die in der negativen Regulation von *pig3* gestört sind, wurde ein UV-Mutagenesansatz gewählt. Die Experimente mit den GFP-Reporterkonstrukten hatten gezeigt, daß die negative Regulation über die Region -1077 bis -262 im *pig3*-Promotor erfolgt, während das 262 bp-Promotorfragment keine Repression vermittelt. Für die Mutagenese wurden Stämme hergestellt, die unter der Kontrolle beider Promotorfragmente das dominante Markergen *hph* exprimierten, dessen Expression Wachstum auf Hygromycin B-haltigen Medien erlaubt.

Hierfür wurden die beiden Plasmide pCA317 und pCA318 konstruiert, die unter der Kontrolle des 262 bp- bzw. 1077 bp-Fragmentes *hph* als translationale Fusion exprimieren. Beide Plasmide wurden in FB2 transformiert. Anhand einer Southernanalyse wurden Stämme ausgewählt, die singuläre Insertionen im *cbx*-Locus trugen (nicht gezeigt). Die Stämme CA317-2 und -4 tragen die *hph*-Fusion mit dem 262 bp Promotor-Fragment von *pig3*, die Stämme 318-6 und 318-8 tragen das entsprechende 1077 bp-Fragment. Die endogene Kopie von *pig3* blieb dabei erhalten. Zur Bestimmung der wachstumslimitierenden Hygromycin B-Konzentration wurden die Stämme auf PD-Platten ausgestrichen, denen 0, 50, 200 und 300 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B zugesetzt waren. Nach 4 Tagen Inkubation wurde das Wachstum dieser Stämme in Abhängigkeit von der Hygromycin B-Konzentration untersucht und mit dem Wachstum von FB1 und FB2 unter den gleichen Bedingungen verglichen (Abb. 28).

Die Wildtypstämme zeigten bereits bei Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B kein Wachstum mehr. Die Stämme CA317-2 und CA317-4 zeigten Wachstum bei allen getesteten Hygromycin B-Konzentrationen, wobei aber bei 300 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B nur geringes

Wachstum zu erkennen ist. Das Wachstum der Stämme CA318-6 und CA318-8 war bis zu einer Hygromycin B-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dem der CA317-Stämme vergleichbar. Bei Konzentrationen von 200 $\mu\text{g/ml}$ war aber deutlich reduziertes und bei 300 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B nur noch geringes Wachstum zu erkennen. Durch diese Experimente wird die basale Expression von *pig3*, ausgehend vom 1077 bp Promotorfragment deutlich, da bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B Wachstum aller Transformanden zu beobachten war. Bei höheren Hygromycin B-Konzentrationen wuchsen CA318-Stämme besser als CA317-Stämme. Die Selektion nach der Mutagenese erfolgte deshalb bei einer Hygromycin B Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$. In einem Vorexperiment wurde die UV-Dosis für die Mutagenese im Stamm CA318-6 so eingestellt, daß

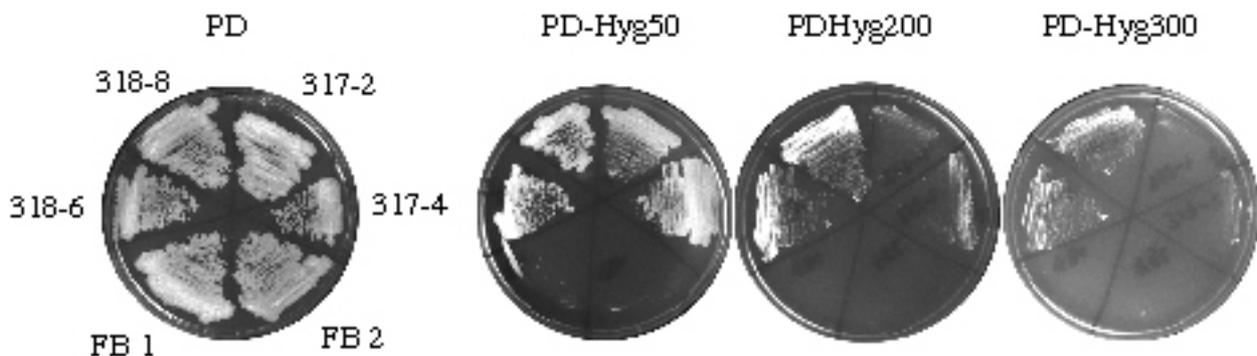


Abbildung 28: Expressionsanalyse in den *pig3hyg*-Reporterstämmen. Die Stämme FB1, FB2, CA318-6 und -8, sowie CA317-2 und -4 wurden auf PD-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Hygromycin B (0, 50, 200 und 300 $\mu\text{g/ml}$) ausgestrichen. Anschließend wurden die Stämme 4 Tage bei 28°C inkubiert. Die Platten wurden mit einem GelDoc-Imager (Biorad) fotografiert.

0,1 - 1 % der Zellen überlebten (M&M). Dies sollte zu etwa einer Mutation pro Zelle führen (Holliday, 1954). Es wurden insgesamt 10^9 CA318-6-Zellen mutagenisiert. Zwei Stämme, CAP1 und CAP2 zeigten Wachstum bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B (nicht gezeigt). Für beide Mutanten wurde die Expression des endogenen *pig3*-Gens in PD-Flüssigmedium untersucht. Dabei konnte kein Expressionsunterschied im Vergleich zum Ausgangsstamm CA318-6 festgestellt werden (nicht gezeigt). Diese Mutanten haben vermutlich spontan Hygromycin B-Resistenz erlangt, die somit nicht auf eine Mutation in einem Regulator der *pig3*-Expression zurückzuführen waren.

3 Diskussion

3.1 Tumorspezifische Expression der Gene der *a*- und *b*-Paarungstyploci

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Regulation der Gene, *mfa1*, *pra1*, *bE1* und *lga2* aus den Paarungstyploci *a* und *b* nicht nur während der Kreuzung haploider Sporidien (Hartmann *et al.*, 1996; Romeis *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 1996), sondern auch während des Wachstums in der Pflanze einer komplexen Kontrolle unterliegt. In Northernanalysen aus Tumorgewebe, das aus Infektionen mit Mischungen aus FB1 und FB2 hervorging, wurde im Vergleich zu filamentösen Dikarien Induktion von *mfa1* und *pra1* bzw. Repression von *lga2* und *bE1* beobachtet. Für die unter Pheromonstimulation bzw. durch ein aktives b-Heterodimer stark induzierten Gene *mfa1* und *lga2* waren die Expressionsunterschiede leicht festzustellen und dadurch das Expressionsmuster sicher zu bestimmen. Dagegen blieb aufgrund der geringen Menge an pilzlicher RNA in Tumorgewebe der Nachweis schwach exprimierter RNAs schwierig. Für *prf1*, *bE1* und *lga2* war damit zunächst nicht klar, ob es zu einer vollständigen Repression kommt oder diese Gene nur wesentlich schwächer exprimiert werden. In Tumorgewebe konnte allerdings keine *b*-abhängige Regulation von *mfa/pra* bzw. von *lga2* beobachtet werden. Dies steht in Einklang mit einer Repression des *bE1*-Gens. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß in Tumorgewebe kein aktives bE/bW-Heterodimer vorhanden ist. Darüber hinaus ist ein weiteres Gen, *dik6*, das wie *lga2* durch das aktive b-Heterodimer auf Plattenmedien aktiviert wird, in Tumoren nicht exprimiert (G. Weinzierl, persönliche Mitteilung). In diesem Zusammenhang war besonders erstaunlich, daß selbst eine konstitutive Expression des aktiven bE/bW-Heterodimers in Tumorgewebe nicht zur Repression von *mfa1* führte. Im Tumorgewebe müssen demnach Bedingungen vorliegen, die die regulatorische Funktion des aktiven b-Komplexes unterdrücken oder überlagern. Die Daten zeigen zudem, daß der Schlüsselregulator der pathogenen Entwicklung, das aktive bE/bW-Heterodimer, in der frühen Phase dieser Entwicklung hauptsächlich in Filamenten auf der Pflanzenoberfläche benötigt wird. In späteren Phasen, während des Wachstums in der Pflanze, scheint dieser Komplex nicht mehr notwendig zu sein.

Es war bekannt, daß für die Transkription von *mfa1* auf Plattenmedien der Transkriptionsfaktor Prf1 benötigt wird (Hartmann *et al.*, 1996). Wie die Experimente mit einem solopathogenen, haploiden Stamm, in dem *prf1* deletiert ist (HA108), gezeigt haben, wird *prf1* auch für die Transkription von *mfa1* in Tumorgewebe benötigt. Die Expression der Pheromon- und Pheromonrezeptorgene könnte beim Wachstum in der Pflanze darüber hinaus zu einem autokrinen Stimulus führen, der die Transkription von *mfa1* weiter antreibt (Abb. 29).

Für eine differenziertere Expressionsanalyse und um die Regulation zeitlich einzugrenzen, wurde die Expression von *mfa1* und *lga2* über den gesamten Lebenszyklus hinweg in Reporterstämmen, die GFP unter der Kontrolle der jeweiligen Promotoren exprimierten, untersucht. *mfa1* war in etwa 30% der haploiden Sporidien in Kreuzungen auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien exprimiert. In Konjugationshyphen kam es zur Induktion von *mfa1*. Das heterogene Bild der *mfa1*-Expression in den Sporidien spiegelt dabei vermutlich die Rezeption der eingehenden Signale wieder. Je nach Signalstärke bzw. Aufnahme der Signale wird dann die Paarungsbereitschaft durch die Bildung von Konjugationshyphen ausgelöst, die mit einer erhöhten Pheromongenexpression einhergeht. In filamentösen Dikarien auf der Blattoberfläche war 24 h nach der Infektion nur noch schwache GFP-Fluoreszenz zu erkennen, in appressorienartigen Strukturen wurde in einzelnen Fällen noch geringfügig GFP-Fluoreszenz beobachtet, in anderen war keine Fluoreszenz mehr zu erkennen. Die Restfluoreszenz in diesen Zellen reflektiert vermutlich die hohe Stabilität des GFP-Proteins, da zu erwarten ist, daß die *mfa1*-Expression durch das b-Heterodimer reprimiert wird (Urban *et al.*, 1996). Die Fluoreszenz in diesen GFP-Reporterstämmen ist demnach davon abhängig, wieviel GFP-Protein zu Beginn der Repression in einer Zelle vorhanden ist.

Eine erneute Induktion von *mfa1* war in den frühen biotrophen Stadien etwa einen Tag nach der Infektion in den dikaryotischen Filamenten zu beobachten. In der späteren Entwicklung, nachdem sich bereits Tumore gebildet hatten, wurde für *mfa1* in morphologisch gleichen Stadien sowohl hohe Expression als auch nahezu vollständige Repression festgestellt. Wie dieses Expressionsmuster mit einer möglichen Funktion von *mfa1* zusammenhängt, wird später diskutiert. Reporterstämmen, die GFP unter der Kontrolle des *lga2*-Promotors exprimierten, ließen in haploiden Sporidien keine GFP-Fluoreszenz erkennen. In Paarungsstrukturen, also kurz nach der Fusion, wurde aber bereits *lga2*-Expression nachgewiesen. Wie in Spellig *et al.*, (1996) bereits beschrieben, kann GFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Transkriptionsrate bereits innerhalb weniger Stunden beobachtet werden. Nach der Penetration wurde zu keinem Zeitpunkt *lga2*-Expression festgestellt. *lga2* wird demnach unmittelbar nach der Penetration reprimiert. Da der *b*-Locus sowohl die *mfa1*- als auch *lga2*-Expression reguliert, könnte dies bedeuten, daß die *b*-Proteine zu einem frühen Zeitpunkt, d. h. kurz nach der Penetration, nicht mehr aktiv sind. Die Aktivität der *b*-Proteine wäre damit auf die kurze Phase des dikaryotischen Wachstums auf der Pflanzenoberfläche beschränkt, eine Schlußfolgerung, die auch schon die Transkriptionsanalysen nahelegten.

Die durchgeführten Expressionsanalysen haben gezeigt, daß auch komplexe Expressionsmuster während der biotrophen Phase von *U. maydis* detailliert darstellbar sind. Eine Voraussetzung für die Analyse von GFP war dabei eine relativ hohe Expression der Gene unter induzierenden Bedingungen und ein relativ "dichter" Promotor während der Repression. Schwach exprimierte Gene können vermutlich nur schlecht nachgewiesen werden. Dadurch bleibt der Einsatz von GFP

als Reporter genen auf mittelstark und stark exprimierte Gene beschränkt. Sowohl die Northernanalyse als auch die Expressionsanalyse mittels GFP-Reporterstämme wurden im Laufe der Arbeit durch den Einsatz von PolyA⁺-RNA für die Northernanalyse bzw. ein sensitiveres GFP-Derivat (EGFP) für die Fluoreszenzmikroskopie weiter verbessert (siehe unten).

Bereits in früheren Arbeiten wurden Hinweise gefunden, daß die Aktivierung von Prf1 durch Pflanzensignale erfolgt, wobei die Weiterleitung dieser Signale auf Prf1 über Komponenten des Pheromonsignalwegs vermittelt wird (Hartmann *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1999 und Abb. 29).

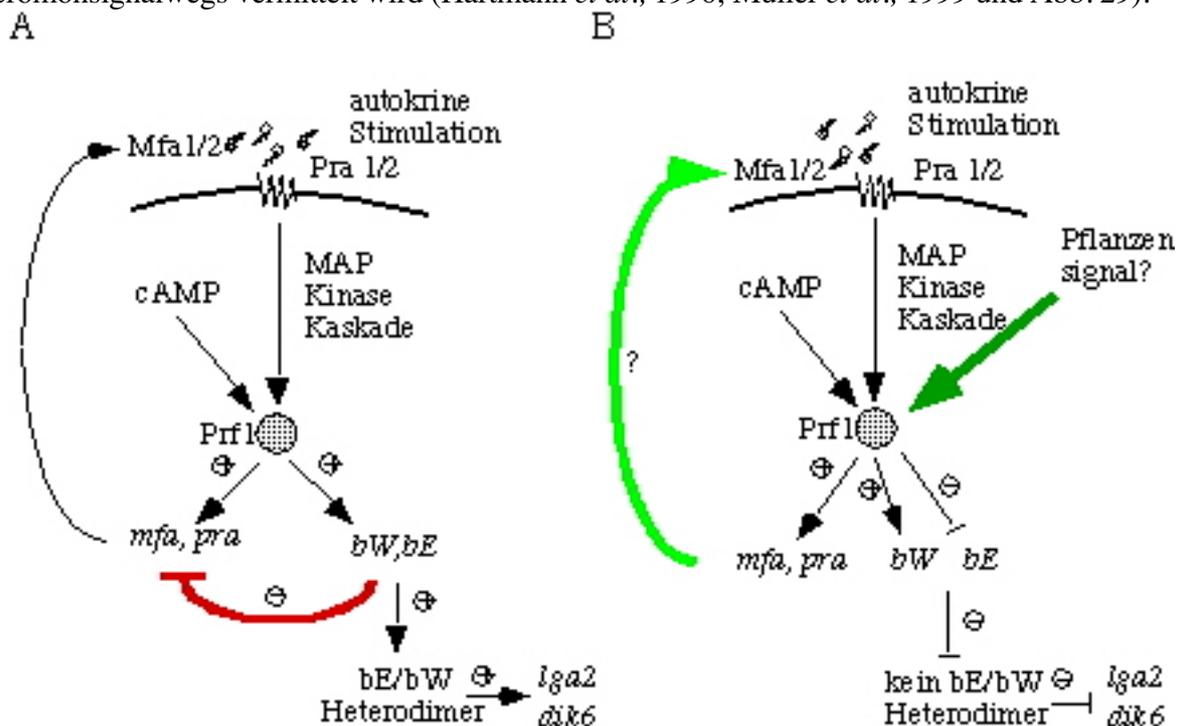


Abbildung 29: Der Pheromonsignaltransduktionsweg in dikaryotischen Zellen und während der biotrophen Phase. Aktivierende und inhibierende Interaktionen sind durch entsprechende Pfeile dargestellt. Weitere Erläuterungen siehe Text. A: Regulation des Pheromonsignalwegs während der Paarung. B: Regulation des Pheromonsignalwegs beim Wachstum innerhalb der Wirtspflanze.

Die differentielle Expression der Paarungstypgene in Tumorgewebe zeigt diese Verbindung zum ersten Mal auf molekularer Ebene. Die Funktion dieser Gene in Tumorgewebe ist zwar nicht geklärt (siehe unten), trotzdem können diese Gene als Marker für die biotrophe Entwicklung dienen, da sich das Expressionsmuster im Tumorgewebe von anderen bekannten Situationen (Sporidien, dikaryotisches Filament) unterscheidet. Die Signale, die zur Induktion des pflanzenspezifischen Expressionsmusters führen, stellen vermutlich Schlüsselkomponenten der Wirtsspezifität und der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* dar (Müller *et al.*, 1999). Die Natur potentieller Signalstoffe und die Möglichkeit, solche Substanzen zu isolieren, wird in Kapitel 3.3.6 diskutiert.

Die Expression von *mfal* und *pral* beim Wachstum in der Pflanze deutete darauf hin, daß in diesem Stadium ein funktionelles Pheromon/Rezeptorsystem exprimiert wird. Da aber Stämme ohne Pheromonrezeptor bzw. ohne Pheromonstimulation den Lebenszyklus vollenden können, ist die Expression dieser Gene während der biotrophen Entwicklung nicht essentiell (Regenfelder *et al.*, 1997; Spellig *et al.*, 1994). Es stellt sich deshalb die Frage, welche Funktion ein aktives Pheromon/Rezeptorsystem in Tumorgewebe erfüllen könnte. In dikaryotischen Filamenten, die heterozygot für *b* sind, dient es über den autokrinen Stimulus zur Aufrechterhaltung der *b*-Genexpression und ermöglicht so filamentöses Wachstum. Diese Funktion bedarf aber nur geringer Expression der *mfa*- und *pra*-Gene (Bölker *et al.*, 1992). In *Schizophyllum commune* und *Coprinus cinereus* wird das Pheromon/Rezeptorsystem für die Kernwanderung nach der Fusion kompatibler Monokarien benötigt (Wendland *et al.*, 1995, Kronstad und Staben, 1997; Kues, 2000). Dabei werden die Septen aufgelöst und die Kerne des Partners wandern in das Filament ein. Nach der Ausbildung des Heterokaryons vermittelt das Pheromon/Rezeptor-System die Fusion der Schnallen nach der mitotischen Teilung (Kues, 2000). Beide Mechanismen stellen sicher, daß jede Zelle im Heterokaryon ein Paar unterschiedliche Kerne enthält. *U. maydis* bildet keine Schnallen aus. Auch ist bislang unklar, wie gewährleistet wird, daß Tochterzellen zwei unterschiedliche Kerne erhalten. Ein Erkennungssystem wie das Pheromon/Rezeptorsystem könnte solch eine Aufgabe möglicherweise auch hier vermitteln. Dies stände im Einklang mit dem Befund, daß die Expression von *mfal* in proliferierenden, dikaryotischen Zellen induziert und in der späten Tumorphase, in der die Kernfusion vermutlich abgeschlossen ist, reprimiert wird. Interessanterweise wurde im Tumorgewebe des diploiden Stamms FBD11 nur geringe Expression des Pheromon/Rezeptor-System nachgewiesen, während bei Dikarien hohe Expression zu beobachten war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß in diploiden Stämmen wegen der bereits erfolgten Kernfusion das Pheromon/Rezeptorsystem nicht benötigt und deshalb auch nicht exprimiert wird.

3.3 Identifizierung pflanzeninduzierter Gene in *U. maydis* durch REMI-"enhancer Trap"-Mutagenese

In dieser Arbeit wurde durch die Kombination der REMI-Mutagenese mit einem Reporterkonstrukt, das unter der Kontrolle eines Basalpromotors stand, ein "enhancer trap"-Verfahren entwickelt. Dieses erlaubte die Isolierung von Genen, die früh während der biotrophen Phase induziert werden. Nach der Mutagenese wurden in einem Vortest zunächst alle Transformanten aussortiert, die GFP unter verschiedenen artifiziellen Bedingungen exprimierten. Wurde dabei SGFP als Reporter gen verwendet, traf dies auf 14% der Transformanten zu. Mit dem EGFP-Gen konnte dagegen in 42%

der Stämme Fluoreszenz beobachtet werden. Dies zeigt zum einen, daß EGFP aufgrund der höheren Sensitivität die Detektion schwächer exprimierter Gene erlaubt. Darüber hinaus läßt die hohe Zahl an markierten Stämmen auf eine hohe Gendichte im Genom von *U. maydis* schließen. Mit den Stämmen, die im Vortest kein GFP exprimierten, wurden Pflanzen infiziert. Es wurden solche Mutanten isoliert, die nach Kontakt mit der Wirtspflanze GFP exprimierten. Aus insgesamt 2350 Transformanten wurden so zunächst elf Stämme isoliert (#114, #219, #271, #424, #480, #500, 624, #698, #704, #727 und #1685), die diese Eigenschaft aufwiesen. In den Mutanten, #114 und #219 konnte GFP ausschließlich nach Inokulation von Pflanzen beobachtet werden. Sie waren die einzigen Mutanten, die ausschließlich pflanzenabhängige GFP-Expression zeigten. In den restlichen Mutanten (#271, #424, #480, #500, 624, #698, #704, #727 und #1685) konnte in Flüssigmedien und auf Plattenmedien geringe GFP-Expression festgestellt werden. Aus dieser Gruppe wurde nur die Mutante #1685 weiterbearbeitet, da hier ein sehr großer Unterschied in der Fluoreszenz zwischen Sporidien in axenischer Kultur und solchen, die sich auf der Blattoberfläche befanden, zu erkennen war. Die übrigen Mutanten aus dieser Gruppe wurden nicht weiter bearbeitet, da angenommen wurde, daß hier konstitutiv exprimierte Gene markiert wurden. Die Mutante #1486 war nicht aufgrund pflanzenabhängiger GFP-Expression ausgewählt worden, sondern wegen der spezifischen Induktion in dikaryotischen Filamenten auf aktivkohlehaltigen Plattenmedien. Hier bestand die Aussicht, das entsprechende Gen zügig charakterisieren zu können, da in den zu vergleichenden Stadien Expressionsunterschiede leicht festzustellen sind.

Bei der Analyse der Insertionsereignisse stellte sich heraus, daß das Mutageneseplasmid in den weiter untersuchten Mutanten bis auf die Mutante #114 an einer *Bam*HI-Schnittstelle inseriert war. Da die REMI-Mutagenese mit *Bam*HI durchgeführt wurde, liegen höchstwahrscheinlich REMI-Ereignisse vor. Die Insertionsstellen befanden sich in einem maximalen Abstand von 2509 bp vom nächstliegenden ORF entfernt. Die bisher kartierten "enhancer"-Elemente weisen einen Abstand von maximal 1600 bp vom Genstart auf (Hartmann *et al.*, 1996), d. h. die erhobenen Distanzen liegen in etwa in diesem Bereich.

Aus den Mutanten, #114, #219 und #1685 konnte in unmittelbarer Umgebung der Insertionsstelle je ein Gen isoliert werden (*mfal*, *pig2* und *pig3*), dessen Expression mit der GFP-Expression der zugehörigen Mutante korrelierte. Dies bedeutet, daß nicht nur in Mutanten, die GFP ausschließlich während der biotrophen Phase exprimierten, sondern auch in solchen mit großen Fluoreszenzunterschieden, wie die Mutanten #1685, entsprechend regulierte Gene isoliert werden konnten.

Aufgrund der divergenten Transkriptionsrichtung von *pig2* bzw. *pig3* relativ zum GFP-Gen ist davon auszugehen, daß die regulatorischen Elemente dieser Gene orientierungsunabhängig die GFP-Expression in den Mutanten steuern und demnach "enhancer"-Elemente darstellen. Somit ist eine "enhancer trap"-Mutagenese erstmals erfolgreich in Pilzen angewandt worden.

Wenn eine derartige Methode etabliert wird, stellt sich die Frage, wieviele differentiell exprimierte Gene bei den untersuchten Bedingungen zu erwarten sind. Durch genomische Ansätze wie "micro-arrays" in *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß z. B. bei der Sporulation rund tausend Gene (16%) differentiell exprimiert werden (Chu *et al.*, 1998). Dabei war etwa die Hälfte der Gene induziert, die andere Hälfte reprimiert. Als reguliert exprimiert galten dabei alle Gene, die einen mehr als zweifachen Expressionsunterschied zeigten (Chu *et al.*, 1998). In einem Ansatz zur Isolierung *b*-abhängig regulierter Gene in *U. maydis* waren 2% aller untersuchten mRNAs *b*-abhängig induziert. Dabei galten Expressionsunterschiede größer Faktor vier als signifikant (A. Brachmann, persönliche Mitteilung). Bei der Isolierung von Genen, die früh in der biotrophen Phase induziert werden, ist die Situation komplexer, da hier mit unterschiedlichen Entwicklungsprozessen gekoppelte Stadien untersucht werden. Zudem hatten Expressionsanalysen der Gene in den Paarungstyploci gezeigt, daß mit GFP als Marker im Reportersystem und durch die Hintergrundfluoreszenz in der Pflanze nur mittelstark bis stark exprimierte Gene beobachtet werden können. Die Gesamtzahl der somit in Frage kommenden Gene ist aufgrund dieser Unwägbarkeiten nicht im Voraus zu berechnen. Grundsätzlich wurde aber mit einer ähnlichen Größenordnung an differentiell exprimierte Gene gerechnet, wie sie in den oben erwähnten Systemen bestimmt wurde.

Es konnten aus insgesamt 2350 Transformanten nur drei Mutanten isoliert werden, die pflanzenspezifisch regulierte GFP-Expression zeigten. Auffallend war zunächst, daß mit EGFP im Vergleich zu SGFP als Reportergen wesentlich mehr Transformanten im Vortest aussortiert werden konnten und gleichzeitig kein Stamm als falsch positiv identifiziert wurde. Dies zeigt den Einfluß, den die Sensitivität der Expressionsanalyse auf das System hatte und, daß hier durch verbesserte Reportersysteme noch Spielraum für eine Optimierung bleibt. Daß von ursprünglich 987 Stämmen (mit pCA104 bzw. pCA125 erzeugt), die keine Expression auf Plattenmedien zeigten nur drei pflanzenspezifische GFP-Expression zeigten, könnte aber neben der geringen Sensitivität des Reportergens noch an folgenden weiteren Faktoren liegen: (i) Es könnte bei REMI-Insertionen, ähnlich der Integration von T-DNA aus *A. tumofaciens* in Pflanzen, eine Präferenz der Integrationsstelle für transkribierte Regionen bestehen (Koncz *et al.*, 1992). Diese Möglichkeit wird im Zusammenhang mit dem Auftreten von unabhängigen Integrationsereignissen an der selben Stelle im Genom diskutiert (Lu *et al.*, 1994; Sweigard *et al.*, 1998, Maier und Schäfer, 1999). Als Folge würden REMI-Integrationen in der Nähe von Genen, die zum Zeitpunkt der Transformation nicht exprimiert werden seltener stattfinden als bei solchen die basal exprimiert werden. Dafür spricht, daß alle durch REMI-"enhancer trapping" isolierten Gene (*mfa1*, *pig2* und *pig3*) eine basale Transkription aufweisen. (ii) In verschiedenen phytopathogenen Organismen wurde gezeigt, daß Gene, die nach Kontakt mit der Wirtspflanze induziert werden, auch in axenischer Kultur unter Mangelbedingungen exprimiert werden (Coleman *et al.*, 1997; Pieterse *et al.*, 1994). Solche Gene

konnten in diesem Mutageneseansatz nicht isoliert werden, da entsprechende Mutanten vorher aussortiert wurden.

Unter den gegebenen Bedingungen könnte die Gesamtzahl an unterschiedlichen Mutanten durch Verwendung von verschiedenen Restriktionsenzymen gesteigert werden. Der Gebrauch von nur drei weiteren Enzymen, die eine Hexanucleotidsequenz erkennen, könnte im Schnitt alle 1024 bp eine Integration ermöglichen. Dies käme bei der oben angenommenen "Reichweite" von *cis*-Elementen fast einer gesättigten Mutagenese gleich. Ein Hauptproblem bei dieser REMI-"enhancer trap"-Mutagenese war, daß die GFP-Expression auf Plattenmedien mit der GFP-Expression beim Wachstum in der Pflanze verglichen werden mußte. Dabei war die, von der Pflanze ausgehende Autofluoreszenz, für die Expressionsanalyse während der biotrophen Phase, gerade bei geringer GFP-Fluoreszenz störend. Eine Möglichkeit, diese Einflüsse zu umgehen, wäre die Schaffung von Wachstumsbedingungen in Kulturmedien, die eine Vollendung des Lebenszyklus von *U. maydis* erlauben (Ruiz-Herrera *et al.*, 1999). Die von Ruiz-Herrera *et al.* (1999) beschriebenen Experimente, die eine rein morphologisch Grundlage haben, müßten hierfür durch Verwendung der bekannten pflanzenregulierten Gene als molekulare Marker zunächst verifiziert werden. Alternativ wäre auch denkbar, die Induktion von Genen durch unterschiedliche Pflanzenextrakte oder verschiedener Einzelsubstanzen einer Bibliothek, z. B. in einem automatisierten Testverfahren zu erreichen und so aktivierende Substanzen zu isolieren (s. 3.3.6).

Für die Gene *pig6* und *lga2* konnte Expression nur in Filamenten außerhalb der Pflanze, nicht jedoch während der biotrophen Phase beobachtet werden. Auch die Expression von *mfa1* und *pig3* war in bestimmten Stadien der biotrophen Phase reprimiert. Prinzipiell ist dies nicht ungewöhnlich, da viele Entwicklungsprozesse mit der Repression von Genen einhergehen. So werden z. B. in *S. cerevisiae* von den etwa 1000 Genen, die während der Sporulation differentiell exprimiert werden, etwa 50% reprimiert (Chu *et al.*, 1998). Aufgrund der experimentellen Bedingungen war aber in *U. maydis* bisher eine gezielte Isolierung reprimierter Gene schwierig, da sich für PCR-abhängige Methoden die Mengenverhältnisse von Pilz zu Pflanze noch ungünstiger auf den Nachweis auswirkt, als dies bei der Suche nach induzierten Genen der Fall ist (T. Spellig, persönliche Mitteilung). Die REMI-"enhancer trap"-Mutagenese böte prinzipiell die Möglichkeit, auch solche Gene zu isolieren.

3.3.1 Pig2: Eine ungewöhnliche Protein-Disulfid-Isomerase?

In dieser Arbeit wurde bei der Suche nach pflanzeninduzierten Genen ein Transkript, *pig2*, identifiziert, das in haploiden Sporidien ein basales Expressionsniveau zeigt, in dikaryotischen

Filamenten leicht und im Vergleich dazu in der Pflanze etwa 10-fach induziert war. Das putative 551 aa lange Polypeptid weist 16% Identität und 32% Ähnlichkeit zu der Protein-Disulfid-Isomerase *PDI1* aus *S. cerevisiae* auf (Robinson *et al.*, 1994). PDI-Proteine oder auch Foldasen genannt, bewirken im endoplasmatischen Reticulum die Bildung von Disulfid-Brücken sekretierter Proteine (Braakman *et al.*, 1992; Huppa und Ploegh, 1998). PDI-Proteine können in vier Klassen eingeteilt werden, PDI, ERp72, ERp60 und ERp5, die sich alle dadurch auszeichnen, daß sie entweder zwei oder drei konservierte Thioreduktase-Domänen (APWCxHCK) besitzen (Freedman, 1994). Fig2

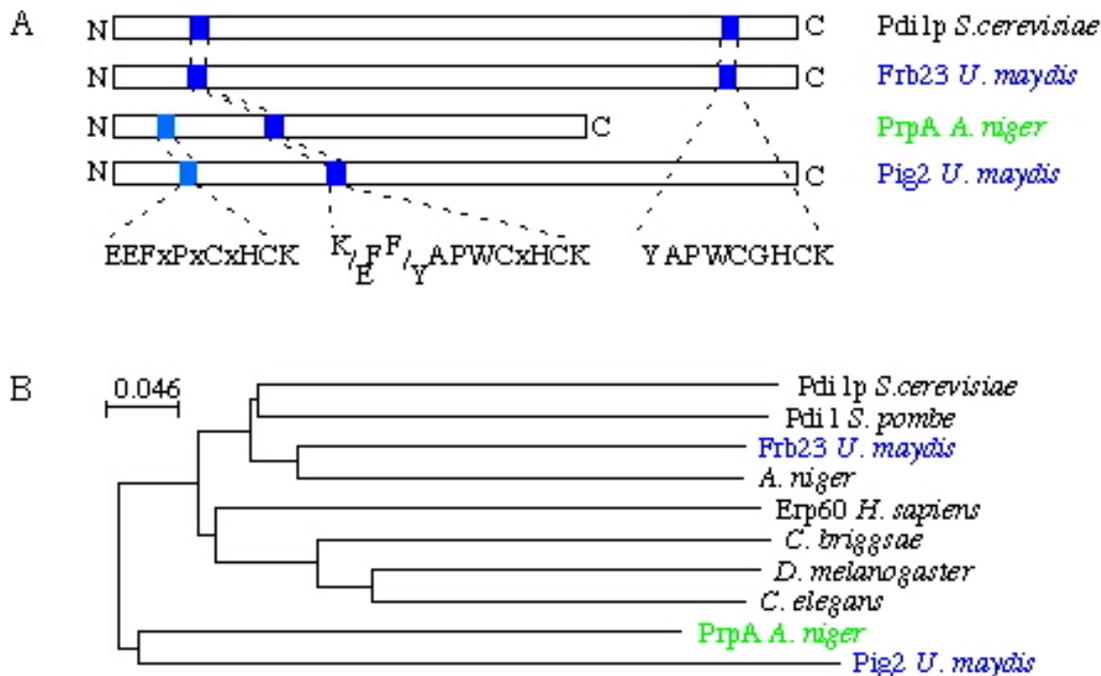


Abbildung 30 A: Die Domänenstruktur von Fig2 im Vergleich zu bekannten Foldasen. Thioreduktasezentren sind als dunkelblaue Kästen dargestellt, Sequenzmotive mit Ähnlichkeit zu Thioreduktasezentren sind hellblau hervorgehoben. Die Aminosäurekonsensussequenz der Thioreduktasezentren ist angegeben. **B: Dendrogramm eines Sequenzvergleichs von PDI-Proteinen.** Sequenzvergleich von PDI-Proteinen aus verschiedenen Organismen mit Fig2. Der Stammbaum wurde mit dem Programm CLUSTAL PPC erstellt. Fig2 und PrpA bilden eine Außengruppe gegenüber den übrigen PDI-Proteinen. Die Proteine wurden anhand eines BLAST-Proteinvergleichs ausgesucht (Altschul *et al.*, 1997).

hingegen besitzt nur eine dieser konservierten APWCxHCK-Domänen und eine weitere Domäne, die zwar Thioreduktasezentren ähnlich, aber nicht dazu identisch ist (Abb. 30A). Im Sequenzvergleich von PDI-Proteinen untereinander stellt Fig2 daher eine Außengruppe dar (Abb. 30B). Kürzlich wurde aus *A. niger* ein Protein, PrpA isoliert, das ebenfalls nur entfernte Verwandtschaft zu anderen PDI-Proteinen aufweist (Abb. 33B). Ähnlich wie bei Fig2 ist nur ein Thioreduktase-Zentrum und ein Thioreduktase ähnliches Motiv vorhanden (EEFxPxCHCK, s. auch Abb. 30A). PrpA besitzt aber *in vivo* Foldaseaktivität (Wang und Ward, 2000). Daher wäre es

möglich, daß auch *pig2* für eine funktionelle Protein-Disulfid-Isomerasen kodiert. Durch Komplementation des letalen Phänotyps von *PDII*-Nullmutanten in *S. cerevisiae* oder den Nachweis von Disulfid-Isomerase-Aktivität *in vitro* könnte diese Annahme experimentell unterstützt werden (Tachikawa *et al.*, 1991).

Für Pdi1p aus Hefe wurde gezeigt, daß die Expression induziert wird, sobald nicht modifizierte, sekretorische Proteine im ER akkumulieren (Robinson *et al.*, 1994). Die gegenüber Sporidien in dikaryotischen Filamenten erhöhte Expression von *pig2* könnte deshalb mit einem höheren Anteil an sekretierten Proteinen zusammenhängen, die während des filamentösen Wachstums als Adaption an veränderte Umweltbedingungen benötigt werden. Da in Tumorgewebe eine weitere Induktion von *pig2* zu beobachten war, könnte dies bedeuten, daß in diesem Stadium ebenfalls vermehrt Proteine sekretiert werden. Für eine ganze Reihe lytischer Enzyme konnte eine erhöhte spezifische Aktivität beobachtet werden, nachdem Maispflanzen mit Mischungen kompatibler *U. maydis*-Stämme infiziert wurden (Cano-Canchola *et al.*, 2000). Die stadienspezifische Sekretion von Proteinen könnte deshalb für eine Adaption an die Lebensbedingungen innerhalb der Pflanze wichtig sein.

Demnach sollten *pig2*-Deletionsmutanten in dieser Umwelthanpassung gestört sein. *pig2*-Nullmutanten zeigen aber keinen offensichtlichen Phänotyp. In *U. maydis* wie auch in der Bäckerhefe existiert mindestens ein weiteres PDI-homologes Gen, *frb23* (A. Brachmann persönliche Mitteilung) bzw. *EUG1* (Holst *et al.*, 1997). Das *EUG1*-Gen aus *S. cerevisiae* kann die Funktion von *PDII* zumindest partiell übernehmen. Eine ähnliche Situation könnte auch in *U. maydis* vorliegen. Deshalb wäre eine Analyse von *pig2*- und *frb23*-Doppelmutanten aufschlußreich. In *U. maydis* ist ein Gen bekannt, *mig1*, das während der biotrophen Phase induziert wird und dessen Produkt sekretiert wird (Basse *et al.*, 2000). Interessant wäre deshalb auch zu untersuchen, ob und wie sich die *mig1*-Sekretion in *frb23/pig2*-Doppelmutanten verändert.

3.3.2 #1486: Die Deletion einer GA-Region führt zu reduzierter *mfa1*-Expression und vermindertem filamentösen Wachstum

Die Mutante #1486 wurde ausgewählt, weil spezifische GFP-Expression in filamentösen Dikarien zu beobachten war. Expressionsanalysen mit den die Insertionsstelle flankierenden Sequenzen als Sonden, führten aber nicht zur Identifizierung eines Gens, dessen Expressionsmuster dem der GFP-Expression in der Mutante #1486 entspricht. Die Deletion einer polymorphen GA-Region im 3'-Bereich der Insertion hatte einen Kreuzungsdefekt haploider Sporidien zur Folge. Durch Northernanalysen konnte gezeigt werden, daß in Δ GA-Mutanten sowohl die basale als auch die induzierte Pheromongenexpression verringert ist, während die Expression von *bE* und *bW*

gegenüber der Wildtypsituation unbeeinflusst blieb. Dieser Phänotyp konnte weder komplementiert noch in einer Insertionsmutagenese wiederhergestellt werden. Auch zeigten Stämme, die durch Segregation der Originalmutante hervorgegangen waren, keinen Δ GA-Phänotyp.

Über eine Ursache für den Phänotyp der GA-Mutanten kann anhand der vorliegenden Daten nur spekuliert werden. Es könnte sein, daß durch die GA-Deletion ein regulatorisches *cis*-Element für ein Gen, das an der Regulation von *mfa1* beteiligt ist, deletiert wurde. Es besteht aufgrund des Induktionszeitpunktes von GFP in der Originalmutante die Möglichkeit, daß dieses Element auch die GFP-Expression in der Mutante reguliert. Ein entsprechendes *cis*-Element müßte dann aber über eine größere Entfernung, d. h. >5,5 kb hinweg aktiv sein, da es sich 3' zum GFP-Gen befinden müßte. Für eine regulatorische Aktivität über größere Distanz würde auch sprechen, daß in Northernexperimenten selbst mit Cosmiden als DNA-Sonde keine differentiell exprimierte mRNA in der Umgebung der Insertionsstelle nachgewiesen werden konnte.

In Pilzen ist eine derartige Regulation über so große Distanz bislang nicht beschrieben. In höheren Organismen hingegen können *cis*-Elemente über viele Kilobasen hinweg Gene regulieren (Kornberg, 2000). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die dreidimensionale Struktur des Chromatins Einfluß auf die Genregulation besitzt (Cremer *et al.*, 1996; Dietzel *et al.*, 1999). So wäre es auch denkbar, daß das regulatorische *cis*-Element erst durch die Fusion kompatibler Sporidien entsteht.

Ein Grund für den Fehlschlag der Komplementation könnte sein, daß das entsprechende Gen auf dem, für die Komplementation eingesetzten Fragment nicht exprimiert wird. Dies ließe sich in Zukunft durch die Verwendung einer Expressionsbibliothek umgehen (G. Weinzierl, persönliche Mitteilung). In dieser Bank sollte der Regulator durch einen konstitutiven Promotor unabhängig von seinen *cis*-Elementen exprimiert sein. Alternativ könnten auch Faktoren isoliert werden, die an die GA-Region binden. Deren DNA-Bindung könnte dann genutzt werden, um diese Faktoren dann anzureichern.

3.3.3 Die Mutante #1685: eine Insel differentiell exprimierter Gene?

In der Mutante #1685 befand sich die Insertion des REMI-Plasmids in einer intergenischen Region zwischen dem *pig3*- und *pig4*-Gen. Beide Gene waren pflanzenspezifisch reguliert, aber nur die Expression von *pig3* entsprach der GFP-Expression in der Mutante #1685. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß in der Mutante vermutlich ein *cis*-Element von *pig3* die Expression von GFP reguliert. In der weiteren Umgebung von *pig3* und *pig4* wurden auf insgesamt etwa 20 kb noch zwei weitere differentiell exprimierte Gene, *pig5* und *pig6*, sowie drei konstitutiv exprimierte Gene, *npi1*, *npi2* und *npi3* identifiziert. In Northernexperimenten konnte mit einem großen,

stromaufwärts der Insertionsstelle gelegenen Fragment (1685n) als DNA-Sonde ein weiteres konstitutives und zwei zusätzliche tumorspezifisch induzierte Transkripte identifiziert werden (K. Hansson, persönliche Mitteilung). Insgesamt wurden in dieser, als *p*-Locus bezeichneten Region, bislang zehn Gene nachgewiesen, wovon sechs differentiell exprimiert waren.

In den übrigen Mutanten waren bis auf die markierten, differentiell exprimierten Gene *mfa1* und *pig2*, alle weiteren Gene, die in der Nähe lagen, konstitutiv exprimiert (*uat1*, *abp1*, *ldp1*, *npi5*, *npi6*). Berücksichtigt man zudem, daß gegenüber insgesamt 987 Mutanten, in denen Gene mit konstitutiver Expression markiert wurden, nur in drei Fällen pflanzenspezifische Expression nachgewiesen wurden, so stellt der *p*-Locus eine Anhäufung differentiell exprimierter Gene dar.

3.3.4 Die *pig3*-Expression ist negativ reguliert

Die Promotorcharakterisierung von *pig3* ergab, daß dieses Gen negativ reguliert war. Erstaunlicherweise ging die Deletion potentieller Repressorbindestellen nicht nur mit einer erhöhten Transkription von *pig3* einher sondern es wurde auch eine Verkürzung der Transkriptlängen beobachtet. Solche Reduzierungen in der Transkriptlänge konnten in verschiedenen Deletionsanalysen von Promotoren, die im selben genomischen Kontext des *cbx*-Locus durchgeführt wurden, bislang nicht beobachtet werden (C. Basse, G. Weinzierl, J. Kämper, persönliche Mitteilungen). Deshalb wurde angenommen, daß die Verkürzungen der Transkripte mit den Eigenschaften des putativen Repressors zusammenhängt. In parallel durchgeführten Experimenten wurde für *pig4* ebenfalls negative Regulation nachgewiesen, die mit einer spezifischen Verkürzung der Transkripte einherging (K. Hansson, persönliche Mitteilung). Diese Daten und die Beobachtung, daß in regulatorischen Mutanten von *pig4* auch erhöhte Expression von *pig3* zu beobachtet war (K. Hansson, persönliche Mitteilung), läßt vermuten, daß an der Repression beider Gene gleiche Faktoren beteiligt sind. Möglicherweise führt das Fehlen der Repressorbindestellen in den Deletionskonstrukten zu einer Änderung in der DNA-Struktur, die einerseits die Derepression der Promotoren zur Folge hat und auch die Transkriptionsinitiation an kryptischen Initiationsstellen erlaubt. Solch eine Dekondensation des Chromatins könnte auch eine Voraussetzung für die Initiation der Transkription der beiden kürzeren pflanzenspezifisch exprimierten mRNAs von *pig3* sein. Diese Regulation würde die Vermutung nahelegen, daß der Repressor von *pig3* Bestandteil eines chromatinmodulierenden Komplexes ist. In *U. maydis* wurde bereits mit dem Korepressor Hda1 eine Komponente solch eines Komplexes isoliert. Hda1 zeigt eine signifikante Homologie zu Histondeacetylasen (M. Reichmann, persönliche Mitteilung). Histondeacetylasen reprimieren Gene durch Deacetylierung der Histone, der eine Kondensation des Chromatins folgt (Carmen *et al.*, 1996). Die Deletion von *hda1* in *U. maydis* führt unter anderem zur Veränderung der

Nucleosomenpositionierung am Promotor des *egl1*-Gens und dadurch zur Derepression von *egl1* (M. Reichmann, persönliche Mitteilung; Schauwecker *et al.*, 1995). Hda1 ist aber nicht nur an der Repression von *egl1* beteiligt, sondern reprimiert auch pflanzenregulierte Gene (C. Basse, S. Huber, persönliche Mitteilung). Für *pig3*, *pig4*, und *pig6* konnte jedoch keine Hda1-abhängige Regulation beobachtet werden (nicht gezeigt). Damit fallen diese Gene vermutlich in eine andere Klasse pflanzenregulierter Gene. Ähnlich wie bei Hda1 könnten diese jedoch ebenfalls durch einen chromatinmodulierenden Repressorkomplex kontrolliert werden. Solche Komplexe könnten wie bei den Hda1 regulierten Genen eine Histondeacetylase enthalten, oder ähnlich wie andere Repressorkomplex, wie z. B. NURF in *D. melanogaster* oder der SWI/SNF-Komplex in *S. cerevisiae*, aufgebaut sein (Cairns *et al.*, 1998; Wittschieben *et al.*, 2000). Die Komplementation der regulatorischen Mutanten von *pig3* und *pig4* und die Charakterisierung der involvierten Gene sollte erste Komponenten des Systems aufdecken.

Die Derepression des *pig3*-Promotors führte zu einer erhöhten Expression der größten *pig3*-mRNA Spezies, nicht aber zur Expression der beiden kürzeren, pflanzenspezifischen Transkripte. Letztere könnten durch einen weiteren Regulator gesteuert werden. Dabei wäre sowohl ein zweites reprimierendes System, wie auch eine Transkriptionsaktivierung vorstellbar. Für das *mig1*-Gen aus *U. maydis* wurde bereits ein derartiges Regulationssystem beschrieben (Basse *et al.*, 2000). Der Promotor von *mig1* ist sowohl negativ als auch positiv reguliert (Basse *et al.*, 2000). Ähnlich könnte auch die Expression von *pig3* und *pig4* erfolgen. Zunächst wäre eine Derepression der Promotoren notwendig, die hier vermutlich durch die gleichen Faktoren vermittelt wird. Anschließend kommt es zu einer individuellen Induktion der Gene, die bei *pig3* auf der Blattoberfläche und bei *pig4* im Tumor stattfindet. Übereinstimmend damit ist die Beobachtung, daß in den regulatorischen Mutanten von *pig4* die *pig4*-Expression durch Wachstum auf Inositol spezifisch induziert werden kann, die *pig3*-Expression aber nicht beeinflusst wird (K. Hansson, persönliche Mitteilung). Ein regulatorisches Prinzip für pflanzenspezifische Expression in *U. maydis* könnte demnach die Derepression einer ganzen Gruppe von Genen durch Pflanzenkomponenten, Oberflächenbeschaffenheit oder Mangelbedingungen sein. Die Induktion würde dann zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung durch genspezifische Aktivatoren in der Pflanze erfolgen.

3.3.5 Die Rolle des *p*-Locus in der pathogenen Entwicklung

Im *p*-Locus wurden für sechs ORFs Polypeptide abgeleitet. Nur für Pig4 und Pig6 wurde eine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen festgestellt. Npi2 hat Ähnlichkeit zu einem Protein unbekannter Funktion aus *S. cerevisiae*. In Pig3, Npi1 und Npi3 konnten auch keine Sequenzmotive mit

Ähnlichkeit zu bekannten Proteindomänen identifiziert werden. Diese Proteine sind deshalb vermutlich spezifisch für *U. maydis* oder dazu verwandten Organismen. Diese Gene des *p*-Locus könnten daher eher Funktionen erfüllen, die speziell für die Interaktion von *U. maydis* mit seiner Wirtspflanze benötigt werden.

Das Pig6 Polypeptid zeigt signifikante Homologie zu Proteinen der "multiple drug resistance transporter"-Familie (MDR) (Abb. 31). In *M. grisea* konnte für einen ABC-Transporter, *ABC1*, eine Beteiligung an der pathogenen Entwicklung nachgewiesen werden (Urban *et al.*, 1999). ABC-Transporter vermitteln den Transport von toxischen Substanzen aus den Zellen heraus (Balzi *et al.*, 1994). *ABC1* vermittelt deshalb vermutlich den Efflux von Pflanzensubstanzen mit fungizider Wirkung (Urban *et al.*, 1999). Eine ähnliche Funktion wäre auch für Pig6 denkbar. *pig6*-Nullmutanten zeigten aber keinen Phänotyp. Interessanterweise wurden bei der Suche nach Pig6-homologen Proteinen in der *U. maydis*-Sequenzdatenbank weitere MDR-Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit entdeckt (J. Kämper, persönliche Mitteilung). Eine funktionelle Redundanz dieser Proteine ist daher nicht ausgeschlossen. Interessant wäre zu untersuchen, wie diese Gene reguliert werden.

pig6 wird in dikaryotischen Filamenten, d. h. auf der Pflanzenoberfläche, jedoch nicht im Tumorgewebe exprimiert. Der Zeitpunkt der Expression ließe vorhersagen, daß eine Detoxifizierung bereits auf der Blattoberfläche von Maispflanzen notwendig wird.

Die Zusammensetzung der Toxine auf der Oberfläche und die für das Wachstum notwendigen Detoxifizierungssysteme könnten in einem Ausschlußprinzip eine spezifische Kolonisierung des Pathogens auf seiner Wirtspflanze ermöglichen. Dies wäre ein erster Schritt in der Wirtsspezifität der Pathogene.

Der ORF von *pig4* kodiert für ein Polypeptid mit 22 % Identität zu einem Hexosetransporter aus dem Bakterium *D. radiodurans* (Abb. 32). Insbesondere besitzt Pig4 12 Transmembrandomänen, die für diese Klasse von Transportern charakteristisch sind. Deshalb wird davon ausgegangen, daß es sich bei Pig4 um einen Hexosetransporter mit noch zu bestimmender Spezifität handelt. Hexosetransporter dienen der Aufnahme von Zuckermolekülen aus der Umgebung. Dabei regulieren Konzentration und Art des Zuckermoleküle die Expression der jeweiligen Hexosetransporter-Gene (Ozcan und Johnston, 1999). Organismen können sich durch die Aufnahme bestimmter Zucker an Veränderungen des Metabolitenangebots in der Umwelt anpassen. Für *pig4* war keine Induktion zu beobachten, wenn Wildtypzellen verschiedene C-Quellen angeboten wurden. Die Expression von *pig4* konnte allerdings in regulatorischen Mutanten durch Inositol oder Arabinose stimuliert werden (K. Hansson, persönliche Mitteilung). Daher ist es denkbar, daß Pig4 einen Hexosetransporter für Inositol bzw. Arabinose darstellt. Die Deletion von

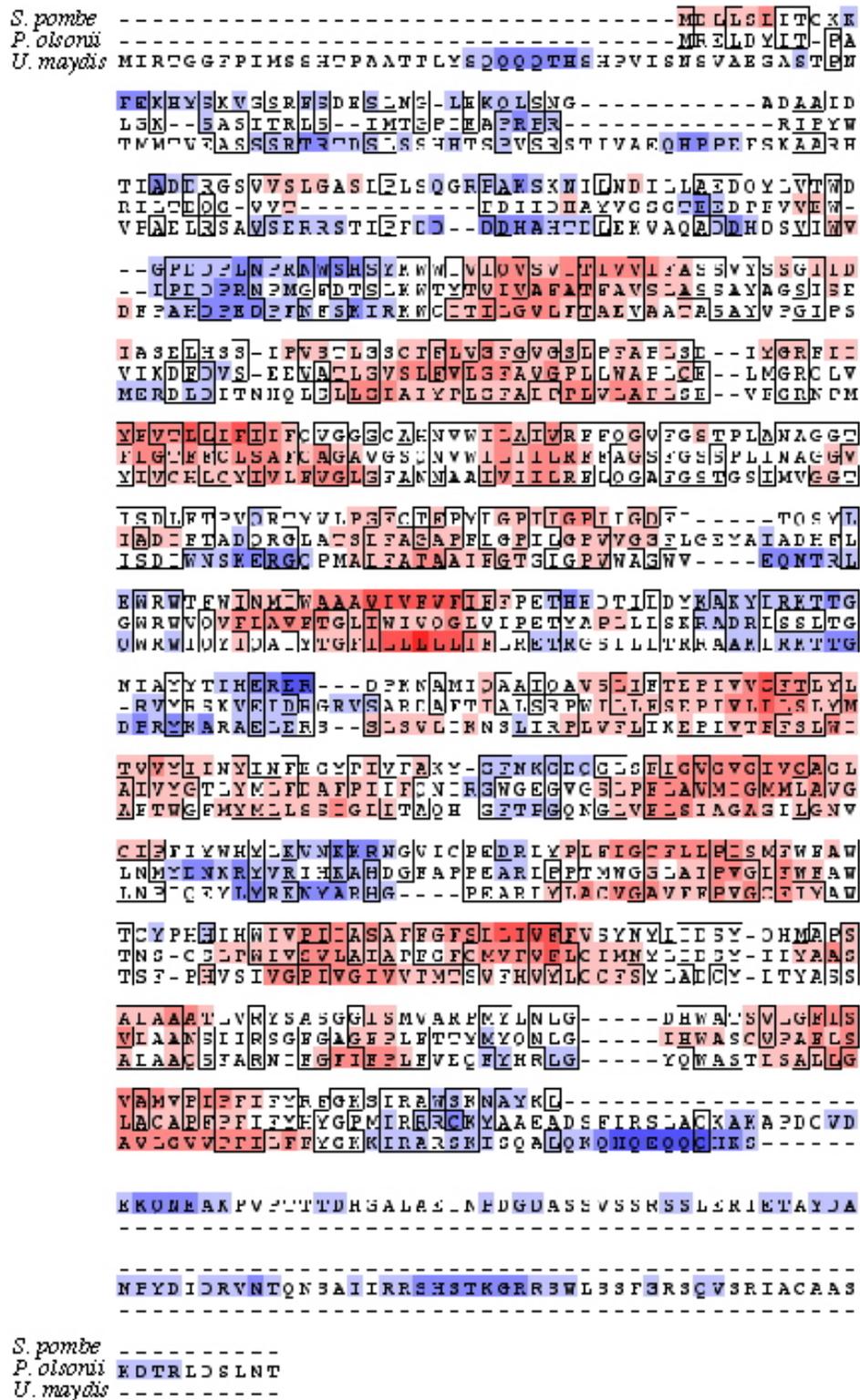


Abbildung 31: Sequenzvergleich von Pig6 zu "multiple drug resistance transportern" aus *P. oisonii* und *S. pombe*. Der Vergleich der Polypeptide wurde mit dem Programm CLUSTAL W durchgeführt. Hydrophobe Bereiche sind rot markiert, hydrophile blau. Identische aa sind eingerahmt.

pig4 führt in *U. maydis* nicht zu einer Reduktion des Wachstums, wenn bestimmte Zucker als alleinige C-Quellen angeboten werden. In *U. maydis* existieren aber mindestens ein weiterer ORF, dessen abgeleitete Proteinsequenz signifikante Ähnlichkeit zu Pig4 aufweist (J. Kämper, persönliche Mitteilung). Dieses Protein könnte zu Pig4 funktionell redundant sein. In der Bäckerhefe ist so ein Fall beschrieben (Ozcan und Johnston, 1999). Dort sind mehr als 20 Hexosetransporter bekannt, wobei allein sieben davon Glukose transportieren (MIPS-Databse). Nur die gleichzeitige Deletion aller sieben Glukosetransporter führt hier zu einem Wachstumsdefekt in glukosehaltigem Medium (Ozcan und Johnston, 1999).

Das *pig4*-Gen wird erst spät in der biotrophen Phase induziert. Zu diesem Zeitpunkt haben sich schon Tumore gebildet. Diese stellen "sink" Organe dar, in die Assimilate der Pflanze transportiert werden (Billett und Bournett, 1978). Hexosen als Bestandteil der Assimilatenströme werden dabei durch Hexosetransporter aufgenommen (Truernit *et al.*, 1996). Pig4 könnte deshalb ein Protein sein, das speziell an der Aufnahme von Inositol und Arabinose in der späten Tumorentwicklung beteiligt ist.

Um die Rolle der tumorspezifischen Hexoseaufnahme und deren Rolle in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* näher zu untersuchen, wäre es interessant, Mehrfachmutanten für die Pig4-ähnlichen Hexosetransporter herzustellen. Interessanterweise ist in *S. pombe* Inositol nicht nur C-Quelle im Primärmetabolismus, sondern dient auch als Signalmolekül für die Induktion der Paarung und Sporulation. Entsprechend sind Mutanten, die kein Inositol aufnehmen können, in diesen Funktionen gestört (Niederberger *et al.*, 1998). Da *pig4* in sporogenen Hyphen induziert wird, wäre durchaus eine Funktion denkbar, die neben der Zuckeraufnahme auch signalgebende Wirkung und die Induktion der Sporenbildung beinhaltet.

Trotz der Häufung pflanzenregulierter Gene führten Einzeldelationen von *pig3*, *pig4*, *pig5*, *pig6*, bzw. *npi1*, *npi2* oder *npi3* zu keiner Beeinträchtigung der Entwicklungsfähigkeit von *U. maydis* (K. Hansson, persönliche Mitteilung und diese Arbeit). Dies bedeutet, daß die untersuchten Gene für die sexuelle und pathogene Entwicklung nicht essentiell sind. Alternativ könnte die Aufgabe dieser Proteine von anderen Proteinen, wie dies für *pig4* und *pig6* wahrscheinlich ist, übernommen werden. Interessant wäre herauszufinden, ob in einer Mutante, in der alle Gene gleichzeitig ausgeschaltet sind, die pathogene Entwicklung beeinträchtigt ist. Bemühungen, die Gene *pig3*, *pig4*, *pig5*, *pig6* und *npi1* gleichzeitig zu deletieren, waren jedoch bislang erfolglos (K. Hansson, persönliche Mitteilung). In phytopathogenen Bakterien sind differentiell exprimierte Gene, die als "cluster" vorliegen und eine Funktion in der pathogenen Entwicklung haben, schon lange bekannt und sehr gut untersucht (Baron und Zambryski, 1995). In bakteriellen Systemen erfolgt die initiale Erkennung des Wirtes und die Expression der für die biotrophe Phase essentiellen Gene durch Pflanzenkomponenten (Baron und Zambryski, 1995). Dieser Erkennungsprozeß löst in beiden

<i>D. radiodurans</i>	1	-----MLISATTTTIRSSSSSSPPTSATLQAPLRSPPDRFRFYOSHGSTPRT-----
<i>U. maydis</i>	1	MLISATTTTIRSSSSSSPPTSATLQAPLRSPPDRFRFYOSHGSTPRT
<i>S. cerevisiae</i>	1	-----MLISATTTTIRSSSSSSPPTSATLQAPLRSPPDRFRFYOSHGSTPRT-----
<i>D. radiodurans</i>	1	-----SVSOSROILGOTRALSOFRYAEPPEODLTLTDDFYDODDDDDDRD-----
<i>U. maydis</i>	46	SVSOSROILGOTRALSOFRYAEPPEODLTLTDDFYDODDDDDDRD
<i>S. cerevisiae</i>	1	-----SVSOSROILGOTRALSOFRYAEPPEODLTLTDDFYDODDDDDDRD-----
<i>D. radiodurans</i>	1	-----HJVRKPFLLPRRNSASSSVRKSWEVNSRPLVKRSNSIO LKRSHPHKM-----
<i>U. maydis</i>	91	HJVRKPFLLPRRNSASSSVRKSWEVNSRPLVKRSNSIO LKRSHPHKM
<i>S. cerevisiae</i>	1	-----HJVRKPFLLPRRNSASSSVRKSWEVNSRPLVKRSNSIO LKRSHPHKM-----
<i>D. radiodurans</i>	1	-----VJOKRRNETAAKSGGTDEDGSRSSSSSSCGDGNASNGGVGLASRGP-----
<i>U. maydis</i>	136	VJOKRRNETAAKSGGTDEDGSRSSSSSSCGDGNASNGGVGLASRGP
<i>S. cerevisiae</i>	1	-----MSEFATSRVESGSSSSTSIHSTPIVOKLEITDESPE-----
<i>D. radiodurans</i>	1	-----MSIQSFEEKSVPMIVDRVLELDLGLGRFOWKLLAICGL-----
<i>U. maydis</i>	181	GJVSFIDIFDVTKTLRENOSMMISAFFLRMGMGEYOICINVLCGC
<i>S. cerevisiae</i>	34	IO TKSEYINAE LPAKPIAAYWTVICLC LMIAFGGFVFGWDTGTIS
<i>D. radiodurans</i>	38	TWAA DAMEVLLMGFALPGISAAFEIIPKCS PAATMLLTATFAGMIF
<i>U. maydis</i>	226	GYFIDILLWAOALGLVTOVAFEFADEICGKKTGEPLOT-AFSTGLIV
<i>S. cerevisiae</i>	79	G FVNQ TDFERRFGQMKSDGTYYSLVV---RTGLIVG-IFNIGCAF
<i>D. radiodurans</i>	63	GAWFWCYLADRVRRRSVFLLTVAALGVVFGLLAGALAPLTW---IV
<i>U. maydis</i>	270	GAWFWCYLADRVRRRSVFLLTVAALGVVFGLLAGALAPLTW---IV
<i>S. cerevisiae</i>	120	GGITLGRLDGDMYGRRIIGTMCVVLVYLVGIVIQIASSDKNYQYFT
<i>D. radiodurans</i>	126	ARFELTCEFAIGGTLPVDYSMMAEFVFTAWRGRFLVYLESFNAVGIIV
<i>U. maydis</i>	313	LSAFICFSIGGNIPDATTITLLEFLFTNRRLFLVAAALS LFOHLGLV
<i>S. cerevisiae</i>	164	GR IISGMGVGGIAVLSPTLISETAFKHIRGETCVS FYQLMITLGI F
<i>D. radiodurans</i>	171	VVAALAWWVS-----TAFAPAE CWRWLLGLAALPGLVGI I
<i>U. maydis</i>	357	VCSGISYGLIPKYACESAETCTRSNNMCWRVYTLYTLGCITWLI FV
<i>S. cerevisiae</i>	209	LG YCTNYG TK-----DYSNSVQWRVPLGLNFAFAIFMIA
<i>D. radiodurans</i>	206	ARIGIIP---DSPRSL LARGEEAQAARAAQOKVVAOANGGTLPAAP IA
<i>U. maydis</i>	402	ARFPIESFR ESPQYLLARGKEARALQIIRQILHTNKKSKMFPVFO
<i>S. cerevisiae</i>	243	GMIMVLP---ESPRFLVEKGRYEDAKRS LAKSNKVT--EDPSIVAE
<i>D. radiodurans</i>	248	HPEO-----
<i>U. maydis</i>	447	ADFOKARRIAEHQGG EYLVEFEERLHGGALMSRWETAKKSA
<i>S. cerevisiae</i>	284	MDTIMAN-----VETERLAGMASWGE LFS--N---
<i>D. radiodurans</i>	252	----PFRVSPAQLFR-GV LARRTPILMVTFWFGLSLGY YGIFSWIP
<i>U. maydis</i>	492	KEMASLFLNAKT LFRNKTMARVTIILWLTFIADFWGFTLAGEYIP
<i>S. cerevisiae</i>	309	KGAILPRVIMGIMIQ--S LQQILTGN NYFFYYGTTTFNAVG MKDSF
<i>D. radiodurans</i>	292	SFLIRACG-----DLGAVYRSTLL LALAOVPGYLAA YIV
<i>U. maydis</i>	537	OILIRAKG-----AEODTSISTTYRNYMLVYFPGIFAVLGAAMI
<i>S. cerevisiae</i>	352	QTSIVIG-----IVNFASTFVALYTVDFEGRRKCLLGGGAS M
<i>D. radiodurans</i>	327	EK--ICRRVTLVGFLLTLGAVGAYLFLLAHDANTVLLCSALLSFAL
<i>U. maydis</i>	516	EAFKVGROWAMVSSG-LMAVSEFLFTIAKDOTGSSVVLNAV EYFFO
<i>S. cerevisiae</i>	389	AICFVIFSTVGV TSL-YPNGKDQPS SKAAGNVMI VFCCLFIFFEA
<i>D. radiodurans</i>	370	LGAWGS LYAYTPELFP TPLR---TTGMGLVSGVARLASVVSPSI
<i>U. maydis</i>	620	SLFNSILYAFVPEIYPSOVR---GTASGLASTLGRAGIIAPIA
<i>S. cerevisiae</i>	433	ISWAP IAYVIVAESYPLR VKNRAMAIAVGANWIWGF LIGFTTFTFI
<i>D. radiodurans</i>	411	G-AMLLTGN-LTLALTVAFCFALAA LAA-WGIGVEFRGOALAE T
<i>U. maydis</i>	661	A-DPLFADQTEOAKHVLYLAGGVILLCP-IALLLPYDTRGMRV
<i>S. cerevisiae</i>	478	TSAGIFSYGYVFMGCLVPSFFYVFFVFCETEG L TLEEVNEMYVEG
<i>D. radiodurans</i>	453	AE-----454
<i>U. maydis</i>	704	Y-----704
<i>S. cerevisiae</i>	523	VKFWKSGSWISKEKRVSEE 541

Abbildung 32: Sequenzvergleich von Pig4 zu bekannten Hexosetransportern aus *D. radiodurans* und *S. cerevisiae*. Der Vergleich der Polypeptide wurde mit dem Programm CLUSTAL W durchgeführt. Rote Kästen markieren hydrophobe, blaue hydrophile Bereiche. Identische aa sind eingerahmt.

Partnern eine signalvermittelte Genregulation aus. Auf der Pflanzenseite werden in der Folge Gene induziert, die an der Abwehrreaktion beteiligt sind. In Bakterien werden Pathogenitätsgene exprimiert, die z. B. Phytotoxine produzieren oder für die Kolonisierung nötig sind (Baron und Zambryski, 1995; Bender *et al.*, 1999; Mahato und Nandy, 1991). Diese Gene liegen häufig als "cluster" auf Plasmiden vor, können aber auch im Genom lokalisiert sein. Die "cluster" umfassen eine Größe von 10 - 200 kb und werden als Pathogenitätsinseln (PAI) bezeichnet. Diese PAIs sind essentiell für die pathogene Entwicklung (Groisman und Ochman, 1996). Im Vergleich zum restlichen Genom kann in diesen DNA-Abschnitten häufig ein unterschiedlicher G/C-Gehalt festgestellt werden (Groisman und Ochman, 1996).

Die wichtige Frage, wie groß der *p*-Locus von *U. maydis* ist und wie viele Gene er umfaßt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht bestimmt werden. Da PAIs aber mehr als 100 kb umfassen können und zumindest stromaufwärts des sequenzierten Bereichs weitere pflanzeninduzierte Gene identifiziert wurden, besteht durchaus die Möglichkeit, daß sich der *p*-Locus über einen größeren Bereich erstreckt.

In phytopathogenen Vertretern der verschiedenen *Pseudomonas*- oder *Xanthomonas*-Spezies wird nach Kontakt mit der Wirtspflanze das sogenannte Hrp-TypIII-Sekretionssystem induziert (Galan und Collmer, 1999; Hueck, 1998; Van Gijsegem *et al.*, 1995). Die Induktion der *hrp*-Gene erfolgt über einen gemeinsamen Regulator, der an die sogenannten *hrp*-Boxen in den Promotoren der *hrp*-Gene binden kann (Genin *et al.*, 1992; Marena *et al.*, 1998). In der Folge kommt es zur Ausbildung von Pili, über die vermutlich Pathogenitätsfaktoren in die Wirtspflanze eingeschleust werden (Aldon *et al.*, 2000; Van den Ackerveken *et al.*, 1996). In Bakterien führt somit die konzertierte Expression von Genen zur Ausbildung ganz spezifischer und für die pathogene Interaktion spezialisierter Proteine, die gemeinsam eine Funktion, hier den Transfer von Proteinen, ausführen. Die Gene des *p*-Locus zeigen jedoch keinerlei Ähnlichkeit zu diesem spezifischen Sekretionssystem. Außerdem war kein Unterschied im G/C-Gehalt im Vergleich zu DNA-Abschnitten aus anderen Regionen im Genom zu erkennen (nicht gezeigt). Da die Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der biotrophen Entwicklung induziert bzw. reprimiert werden, ist eine Interaktion der Genprodukte und eine daraus resultierende gemeinsame Funktion wenig wahrscheinlich. Daß die derzeit bekannten Gene des *p*-Locus eine Aufgabe analog denen des *hrp*-Gen-"clusters" erfüllen, ist deshalb auszuschließen.

In Bakterien ist eine weitere Gruppe von Pathogenitätsdeterminanten bekannt, die nicht mit den *hrp*-Genen kolokalisieren, aber ebenfalls als PAIs gelten. Ein Beispiel dafür ist eine Gruppe von Genen, die für die Produktion von Tabtoxin in *P. syringae* benötigt wird (Kinscherf *et al.*, 1991). Auch in phytopathogenen Pilzen wird darüber spekuliert, daß Gene, die für die Pathogenität wichtig sind, in bestimmten Chromosomenabschnitten gehäuft auftreten. So konnte für den *Tox1*-Locus in

Cochliobolus heterostrophus ein vom restlichen Genom abweichender G/C-Gehalt festgestellt werden (Kodama *et al.*, 1999). Kleine Chromosomen in *Nectria haematococca* tragen Gene, die für die pathogene Entwicklung nötig sind. Diese Chromosomen ("dispensable chromosomes") können verloren gehen, ohne daß das Wachstum beeinträchtigt ist. Der Pilz verliert aber seine Virulenz (VanEtten *et al.*, 1994). Der *p*-Locus von *U. maydis* liegt auf den Chromosomen XV oder XVI von etwa 21 Chromosomen (nicht gezeigt) und somit nicht auf den kleinsten Chromosomen. Des weiteren ist die Existenz von "dispensable chromosomes" für *U. maydis* bislang nicht beschrieben. Da Gene, die an der Synthese von Toxinen beteiligt sind, in der Regel bekannt sind und solche auf dem *p*-Locus nicht identifiziert wurden ist es eher unwahrscheinlich, daß ein, den oben beschriebenen Szenarien ähnliches Prinzip vorliegt.

Die Anhäufung pflanzenregulierter Gene mit einer partiellen Koregulation könnte aber trotzdem ein Hinweis darauf sein, daß hier eine Insel von Genen identifiziert wurde, deren Produkte zur pathogenen Entwicklung von *U. maydis* beitragen. Der Mechanismus sollte sich aber von bekannten Systemen unterscheiden. Für die Etablierung biotrophen Wachstums bedarf es neben Genen, welche die Pflanzenabwehr verhindern oder Genen, die essentiell an der Etablierung des pathogenen Stadiums in der Pflanze beteiligt sind, vermutlich einer Reihe von Genen, die eine Versorgung durch Pflanzenmetabolite gewährleisten. Solche Gene könnten wie für *pig4* oben diskutiert an der Aufnahme von Metaboliten in Tumoren beteiligt sein. Darüber hinaus kommen für das Wachstum in der Pflanze weitere Faktoren in Frage, die z. B. die Tumorentwicklung einleiten, ein Prozeß, der im Zusammenhang mit einer erhöhten Sekretion von Phytohormonen diskutiert wird (Basse *et al.*, 1996). Auffällig ist bei *U. maydis* auch, daß die Pflanzenabwehr unterlaufen wird und es erst spät in der Entwicklung zu Nekrosen kommt. Besonders in diesem Prozeß ist gut vorstellbar, daß Stadienabhängig verschiedene Abwehrmechanismen unterlaufen werden müssen. Die regulierte Expression bestimmter Proteine könnte eine Adaption der jeweiligen morphologischen Stadien an die Pflanze ermöglichen und so die Erkennung durch den Wirt verhindern. Für die Gene des *p*-Locus wäre es denkbar, daß sie an solchen Adaptionen beteiligt sind.

3.3.6 Signale zur Induktion der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

In dieser Arbeit konnte für sieben Gene, *mfa1*, *lga2*, *pig2*, *pig3*, *pig4*, *pig5* und *pig6* differentielle Genexpression während der biotrophen Phase von *U. maydis* nachgewiesen werden. Dabei war auffällig, daß die einzelnen Gene mitunter sehr unterschiedliche Expressionsmuster aufwiesen, d. h. zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung induziert bzw. reprimiert wurden. Dies läßt vermuten, daß der Pilz durch eine Vielzahl unterschiedlicher Signale in dauernder Kommunikation

mit seiner Wirtspflanze stehen könnte. Die einzelnen Stadien würden demnach durch die Regulation stadienspezifischer Expression der jeweiligen Gene eingeleitet. Dies könnte auch bedeuten, daß die Gene, die für abgeschlossene Phasen nicht mehr benötigt werden, abgeschaltet werden. Die einzelnen Signale und die dadurch regulierten Gene könnten eine andauernde Adaption an das sich ändernde Pflanzenumfeld oder die sich ändernden Bedürfnisse der einzelnen Entwicklungsstadien vermitteln.

Eine der spannendsten Fragen ist natürlich, welche Signale die Expression pflanzeninduzierter Gene regulieren. Im folgenden wird exemplarisch anhand der Expression von *pig3* diskutiert, wie frühe signalvermittelte Kommunikation in *U. maydis* erfolgen und welche Signale involviert sein könnten. Die Induktion von *pig3* erfolgt in Sporidien auf der Pflanzenoberfläche. Da dies auch in haploiden Sporidien ohne einen Kreuzungspartner der Fall ist (nicht gezeigt), d. h. zum Zeitpunkt der Induktion von *pig3* noch keine Zelldifferenzierungen stattgefunden haben, können entsprechende Signale als Induktoren von *pig3* vermutlich ausgeschlossen werden. Des Weiteren hat *U. maydis* zu diesem Zeitpunkt keinen direkten Kontakt mit den Pflanzenzellen oder mit intrazellulären Pflanzenstoffen. Das Signal, das *pig3* induziert, sollte deshalb auf der Pflanzenoberfläche zu finden sein. Dabei sind sowohl abiotische als auch biotische Signale denkbar.

In der pathogenen Interaktion von *Magnaporthe grisea*, dem Erreger der Reisbräune, und seiner Wirtspflanze Reis, erkennt das Pathogen die Oberfläche seiner Wirtspflanze anhand der Textur und Hydrophobizität (Howard *et al.*, 1991). Durch angerauhte, hydrophobe Kunststoffolien läßt sich dieses Signal simulieren und bei Kontakt werden in *M. grisea* Appressorien induziert und Penetrationshyphen gebildet (Howard und Valent, 1996). In *U. maydis* können durch solche Kunststoffolien ebenfalls Erweiterungen an den Enden dikaryotischer Filamente induziert werden, die aber morphologische Unterschiede zu appressorienartigen Strukturen aufweisen (J. Krüger, persönliche Mitteilung). Es ließ sich zwar auf solchen Oberflächen keine *pig3*-Expression in den GFP-Reporterstämmen induzieren (nicht gezeigt), trotzdem sind Oberflächentextur und Hydrophobizität als mögliche Signalfaktoren denkbar. Eine zweite Möglichkeit der Interspezieskommunikation zwischen *U. maydis* und *Z. mays* stellt der Austausch molekularer Signale dar. Einige solcher Signalstoffe, die sich auf der Pflanzenoberfläche befinden, sind in anderen Organismen beschrieben. So werden von *Colletotrichum*-Arten Bestandteile der Oberflächenwachsschicht erkannt. Längerkettige Fettsäuren (> C₂₄) können die Sporenkeimung induzieren, andere, in den Wachsen enthaltene Substanzen werden als Inhibitoren der Sporenkeimung diskutiert (Hwang *et al.*, 1995). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß mit *pig6* ein putatives MDR-Protein auf der Pflanzenoberfläche exprimiert wird, das potentiell inhibierende Substanzen aus den Pilzzellen transportieren könnte. Des Weiteren werden auch Cutin-Monomere, die Hauptbestandteil der pflanzlichen Cuticula sind, in *Fusarium solani pisi* als

induzierende Substanzen beschrieben (Rogers *et al.*, 1994). In diesem System kommt es zur Induktion von Cutinase-Genen. Möglicherweise entstehen durch eine basale Aktivität der Cutinasen erst die entsprechenden Derivate der Monomere, die für die spezifische Erkennung nötig sind. Solche Cutin-Monomere werden auch als Signale für Transduktionskaskaden diskutiert, die an der Wirtserkennung beteiligt sein könnten (Kolattukudy *et al.*, 1995; Rogers *et al.*, 1994).

Eine Möglichkeit, den Stoff zu isolieren, der zur Induktion von *pig3* führt, wäre die Inkubation von *pig3*-Reporterstämmen mit den verschiedenen Monomeren dieser Substanzen bzw. die Reinigung von Substanzen ausgehend von Polymergemischen oder Pflanzenextrakten, in denen Oberflächenbestandteile angereichert sind. Alternativ könnten Maiszellkulturen eine Quelle induzierender Moleküle darstellen. Hier wären vor allem sekretierte Stoffe von Interesse, wie sie für die Induktion von *Cladosporium fulvum*-Genen isoliert wurden (Wubben *et al.*, 1994). Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß Zellkulturen nicht die natürliche Umgebung von *U. maydis* widerspiegeln und die entsprechenden Signalstoffe in dieser artifiziellen Situation eventuell nicht gebildet werden.

Interessant wäre natürlich auch, weitere Gene zu isolieren, die zum gleichen Zeitpunkt wie *pig3* induziert werden, da diese Einblicke in das involvierte System und dessen Funktion geben könnten. Da *U. maydis* zum Induktionszeitpunkt dieser Gene saprophytisch lebt, wäre es möglich, den Pilz von der Pflanze, z.B. durch abwaschen, zu trennen. Daraus präparierte RNA könnte dann in eine "representational difference analysis" (RDA) auf der Basis von cDNAs eingesetzt werden (Geng *et al.*, 1998).

4 Zusammenfassung

Die genetische Kontrolle der Fusion haploider Sporidien, des filamentösen Wachstums und der pathogenen Entwicklung wird von einem Pheromon/Rezeptorsystem (*mfa* und *pra*) und dem aktiven bE/bW-Heterodimer vermittelt. Darüber hinaus ist *U. maydis* für die Vollendung des Lebenszyklus auf seine Wirtspflanzen *Z. mays* und *E. mexicana* angewiesen. Für diese sexuelle Entwicklung sind somit geeignete Umweltbedingungen, Intraspezieskommunikation und Erkennung bzw. Wachstum in der Wirtspflanze notwendig. Über letztere Prozesse ist, bis auf Hinweise, daß die frühe Phase wichtig für die pathogene Entwicklung ist, nur wenig bekannt.

In Northernanalysen wurde eine pflanzenpezifische Expression der Paarungstypgene in Tumorgewebe beobachtet. *lga2* und *bE1* waren im Vergleich zu filamentösen Dikarien reprimiert, während *mfa1* und *pra1* induziert waren. Die Transkription von *mfa/pra* benötigt dabei zwar Prf1 als Aktivator, wird aber nicht durch das bE/bW-Heterodimer beeinflusst. Diese Regulation greift, wie Reporterstämme zeigten, die das "Grün Fluoreszierende Protein" (GFP) unter der Kontrolle des *mfa1*- bzw. *lga2*-Promotors exprimierten, schon innerhalb von 24 h nach der Penetration.

Durch die Kombination von GFP als Reportergen mit der Restriction Enzyme Mediated Integration (REMI)-Mutagenese wurde eine "enhancer trap"-Mutagenese für *U. maydis* etabliert, um früh in der biotrophen Phase induzierten Gene zu isolieren. Es wurden 2350 Mutanten hergestellt. Mit der verbesserten GFP-Variante EGFP als Reportergen exprimierten 42% der Stämme GFP in axenischer Kultur. Nach Pflanzeninfektionen mit den übrigen Mutanten wurden drei Stämme isoliert, die pflanzenabhängig GFP exprimierten. In den Mutanten war jeweils ein differentiell exprimiertes Gen markiert worden. *mfa1* war bereits als pflanzenabhängig reguliertes Gen bekannt (s. oben). *pig2* ist in Sporidien gering exprimiert und wird in filamentösen Dikarien leicht induziert. Höchste Expression war im Tumor zu beobachten. *pig3* war in Sporidien auf der Blattoberfläche und in sporogenen Hyphen exprimiert. In unmittelbarer Nähe von *pig3* befinden sich fünf weitere pflanzenregulierte (*pig4*, *pig5*, *pig6*, *pig7*, *pig8*) und drei konstitutiv exprimierte Gene (*npi1*, *npi2*, *npi3*). Die Gene dieser *p*-Locus genannten Region zeigten teilweise sehr unterschiedliche Expressionsmuster. So wird *pig6* beim Wachstum in der Pflanze reprimiert, *pig5* wird in frühen Tumorstadien und *pig4*, *pig7* und *pig8* in sporogenen Hyphen induziert. Wie Promotoranalysen zeigten, werden *pig3* und *pig4* negativ reguliert. Zudem war in regulatorischen Mutanten von *pig4* auch erhöhte Transkription von *pig3* zu erkennen. *pig3* und *pig4* sind somit bezüglich der Repression koreguliert, werden aber von unterschiedlichen Faktoren induziert.

Die Rolle der pflanzeninduzierten Gene und des *p*-Locus in der pathogenen Entwicklung und darin vorkommende Signale werden diskutiert.

5. Materialien und Methoden

5.1 Materialien und Bezugsquellen

5.1.1 Escherichia coli-Stämme

Für sämtliche Klonierungen ohne nähere Angaben wurde der Stamm DH5 α (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ* λ M15. Für PCR-Klonierungen mit dem Kit TOPO TA Cloning[®] von Invitrogen wurde der *E. coli*-Stamm TOP10 verwendet: F', *mcrA*, λ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), λ 80*lacZ* λ M15, λ *lacX74*, *recA1*, *deoR*, *araD139*, λ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^R), *endA1*, *nupG*. Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach Demerec, 1966.

5.1.2 Ustilago maydis-Stämme

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *U. maydis*-Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	Resistenz-	Referenz-
		marker	marker
FB1	<i>a1 b1</i>	keine	(Banuett <i>et al.</i> , 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	keine	(Banuett <i>et al.</i> , 1989)
FBD11	<i>a1a2b1b2</i>	keine	(Banuett <i>et al.</i> , 1989)
SG200	<i>1 bE1bW2::mfa2</i>	ble	S. Genin, nicht publiziert
HA103	<i>a1 bE1bW2^{con}</i>	Hyg	(Hartmann <i>et al.</i> , 1996)
HA 108	<i>a1 bE1bW2^{con}Δprf1</i>	Hyg/cbx	(Hartmann <i>et al.</i> , 1996)

Tabelle 3: In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis*-Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	Ausgangs-	transformiertes	Resistenz
		stamm	Plasmid	
CA2	<i>a1b1Pmfa1sGFP</i>	FB1	pCA72	Hyg
CA7	<i>a2b2Plga2sGFP</i>	FB2	pCA68	cbx
#114	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#219	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#213	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#220	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#271	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#427	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#430	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#461	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg

#480	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#500	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#624	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#698	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#704	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#727	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA104	Hyg
#1486	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA125	Hyg
#1685	<i>a1a2b1b2</i>	FBD11	pCA125	Hyg
FB1 Δ uat1	<i>a1b1Δuat1</i>	FB1	pCA240	NAT
FB2 Δ uat1	<i>a2b2Δuat1</i>	FB2	pCA240	NAT
FB1 Δ GA	<i>a1b1ΔGA</i>	FB1	pCA248	NAT
FB2 Δ GA	<i>a2b2ΔGA</i>	FB2	pCA248	NAT
SG200 Δ GA	<i>a1b1::mfa2ΔGA</i>	SG200	pCA248	NAT
CA107	<i>a1b1ΔGApSC4</i>	FB1	pSC4	Hyg, NAT
CA108	<i>a2b2ΔGApSC4</i>	FB1	pSC4	Hyg, NAT
FB1-8H11	<i>a1b1</i>	FB1	8H11	cbx, NAT
FB2-8H11	<i>a2b2</i>	FB1	8H11	cbx, NAT
FB1-9A1	<i>a1b1</i>	FB1	9A1	cbx, NAT
FB2-9A1	<i>a2b2</i>	FB1	9A1	cbx, NAT
FB1SC5	<i>a1b1</i>	FB1	pSC5	Hyg, NAT
FB2SC5	<i>a2b2</i>	FB2	pSC5	Hyg, NAT
FB1SC6	<i>a1b1</i>	FB1	pSC6	Hyg, NAT
FB2SC6	<i>a2b2</i>	FB2	pSC6	Hyg, NAT
FB1SC7	<i>a1b1</i>	FB1	pSC7	Hyg, NAT
FB2SC7	<i>a2b2</i>	FB2	pSC7	Hyg, NAT
FB1 Δ pig2	<i>a1b1Δpig2</i>	FB1	pKH222	Hyg
FB2 Δ pig2	<i>a2b2Δpig2</i>	FB2	pKH222	Hyg
FB1 Δ pig3	<i>a1b1pig3::eGFP</i>	FB1	pCA307	cbx
CA307	<i>a2b2pig3::eGFP</i>	FB2	pCA307	cbx
FB1 Δ pig5	<i>a1b1Δpig5</i>	FB1	pCA310	cbx
FB2 Δ pig5	<i>a2b2Δpig5</i>	FB2	pCa310	cbx
CA304	<i>a2b2</i>	FB2	pCA304	cbx
CA305	<i>a2b2</i>	FB2	pCA305	cbx
CA306	<i>a2b2</i>	FB2	pCA306	cbx
CA308	<i>a2b2</i>	FB2	pCA308	cbx
CA317	<i>a2b2cbx::P_{pig3}-262hygc</i>	FB2	pCA317	cbx, Hyg
CA318	<i>a2b2cbx::P_{pig311077}hygc</i>	FB2	pCA318	cbx, Hyg
CAP1	<i>a2b2cbx::P_{pig311077}hygc</i>	CA318	UV-Mutante	cbx, Hyg
CAP2	<i>a2b2cbx::P_{pig311077}hygc</i>	CA318	UV-Mutante	cbx, Hyg

5.1.3 Verwendete Kits

TOPO TA Cloning® (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, JETSORB® (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETSTAR® (Genomed) zur Plasmid-Maxipräparation, JETQUICK (Genomed) für die Reinigung von Plasmiden zur Sequenzierung und Megaprime® DNA Labeling System (Amersham) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten.

5.1.4 Chemikalien, Proteine und Enzyme

Die in dieser Arbeit bezogenen Chemikalien wurden bei folgenden Firmen bezogen: Amersham, Baker, BioRad, Boehringer, BRL, Difco, Mallinckrodt (Phenol), Merck, Pharmacia, Piedad-de Haen, Roth, SeaKem, Serva und Sigma. Enzyme und bioaktive Substanzen stammen von Boehringer, New England Biolabs und Pharmacia. Für Standard PCR wurde ein Laborpräparat verwendet (J. Kämper).

5.1.5 Nukleinsäuren

10 mg/ml Lachssperma-DNA in TE-Puffer, ultrabeschallt und gekocht (Laborpräparat). Für die Herstellung von CM-Medium (siehe 5.1.1.10) wurde Heringssperma-DNA (Sigma) verwendet.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz (5' nach 3')	Zweck
CA5	CGC TGC CAT GGT GAT AGA AGT AAG GTA GTT G	PCR
CA6	GCG AAG TCC ATC TTC TGC	PCR
CA7	AGC ATG CCA TGG TTC AGA GGA AAG GGA TTG CT	PCR
CA8	TCT GGT GGG ACC CAG ACG	PCR
REMI5'	TGA GAG TGG ATG AGG TTT GGC	PCR, SEQ
HYG3'	GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG	PCR, SEQ
UAT1	ATT TTC GAG AAC GGA CAT GTA GCC	SEQ
UAT2	AAC AAC GAC GGC AAC ACG GTC ATC	SEQ
pig3 5'	CAG CCA TGG CTT CTG CGC CAA CAC	SEQ
pig3 3'	TAG CGG CCG CTC GAG CTA GAC TCA ATA C	SEQ
pig3-1	CAT GCC ATG GTA TAT CCG CGG GCC GGAC	PCR
pig3-2	TACAAG CTT GTC TAG CTC GAA TGG CGG TG	PCR
CA30		
CA32		
CA33		
Universal	ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG	PCR, SEQ
Reverse	TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC	PCR, SEQ
<i>Bam</i> HI-Linker	P-CGGGATCCCG-P	Klonierung

Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Verwendung: PCR: PCR-Amplifikation; SEQ: Sequenzierung. Die Basen sind nach der offiziellen Nomenklatur abgekürzt. P = Phosphatrest

Als DNA-Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese dienten λ -DNA *Pst*I-Fragmente (Laborpräparate):

λ -DNA <i>Pst</i> I-Fragmente:	11509 bp	1700 bp	216 bp
	5077 bp	1159 bp	211 bp

4749 bp	1093 bp	200 bp
4507 bp	805 bp	164 bp
2838 bp	514 bp	150 bp
2560 bp	468 bp	94 bp
2459 bp	458 bp	87 bp
2443 bp	339 bp	72 bp
2130 bp	264 bp	15 bp
1936 bp	249 bp	

5.1.6 Sonstige Materialien

Dialysefilter VSPW 0,025 μm (Millipore), Elektroporationsküvetten 0,2 cm (BioRad), Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 Microns (Sigma), MobiSpin[®] S-300 Säulen (MoBiTec), Nylonfilter[®] Biodyne B (Pall), Papierfilter (S&S 595), Petrischalen (Greiner), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Sarstedt), JETSTAR[®]-Säulen (Genomed), Sigmacote[®] (Sigma), Sterilfilter 0,20 μm (Sartorius), Thermalpapier (Hitachi).

5.1.7 Plasmide

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Selektionsmarker	Referenz	Herkunft/Anmerkungen
Standardplasmide für <i>U. maydis</i>			
pTZHyg	Amp ^R , Hyg ^R	F. Schauwecker, pers. Mitteilung	Laborsammlung Das Hygromycin B-Resistenzgen wurde als 3 kb <i>PvuII</i> -Fragment aus pHLN, mit <i>BamHI</i> -Linkern versehen, in pTZ18 R kloniert.
pSLHyg (-)	Amp ^R , Hyg ^R	A. Brachmann unveröffentlicht	Enthält die Hyg-Resistenzkassette aus pTZHyg mit zwei <i>NotI</i> -Linkern in pSL1180
pSLCbx(-)	Amp ^R , Hyg ^R	A. Brachmann unveröffentlicht	Enthält die Cbx-Resistenzkassette aus pCbx122 mit zwei <i>NotI</i> -Linkern in pSL1180
pCBX122	Amp ^R , Cbx ^R	(Keon <i>et al.</i> , 1991)	Laborsammlung
pSL Nat(+)	Amp ^R , Nat ^R	A. Brachmann unveröffentlicht	Enthält die Nat-Resistenzkassette mit zwei <i>NotI</i> -Linkern in der <i>NotI</i> -Schnittstelle von pSL1180 Fragment aus pCM54 (Tsukuda <i>et al.</i> , 1988) und einem 3,2 kb <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment einer Untereinheit der Succinatdehydrogenase aus einem Carboxin resistenten <i>U. maydis</i> -Stamm
pSMUT	Amp ^R , Hyg ^R	(Bölker <i>et al.</i> , 1995)	Enthält <i>hph</i> -Gen unter der Kontrolle eines 600bp <i>RsaI</i> -Fragmentes aus <i>S. cerevisiae</i> in pSP72.
pOTEF-SG	Amp ^R , Hyg ^R	(Spellig <i>et al.</i> , 1996)	Laborsammlung enthält das SGFP-Gen unter der Kontrolle des <i>otef</i> -Promotors

verwendete Cosmide

Cosmidbank pUMcos ^X	Amp ^R , Cbx ^R (Bölker <i>et al.</i> , 1995)	Cosmidbank des <i>U. maydis</i> -Stammes FBD11, erzeugt durch Ligation partiell restringierter <i>MboI</i> -Fragmente in die <i>BamHI</i> -Schnittstelle des Vektors pUMcos. pUMcos ist ein Derivat des Vektors pScos1 (Stratagene), in dem ein <i>BglIII-HindIII</i> -Fragment, das die Neomycin-Resistenz-Kassette enthielt, durch ein <i>EcoRV-SmaI</i> -Fragment aus dem Vektor pCBX122 (s. o.), das Resistenz gegen Carboxin in <i>U. maydis</i> vermittelt, ausgetauscht.
9H2	Amp ^R , Cbx ^R	Enthält die flankierende Region der Insertion im Plasmid 219-13 der Mutante #219
9A1	Amp ^R , Cbx ^R	enthält die flankierenden Sequenzen der Insertion in der Mutante #1486
10E1 und 21A2	Amp ^R , Cbx ^R	enthält die flankierenden Sequenzen der Insertionsstelle in der Mutante #1685

Standardplasmide und Subklone zur Klonierung

pTZ19R/18R	Amp ^R (Mead <i>et al.</i> , 1984)	Pharmacia
pCR [®] 2.1-TOPO	Amp ^R , Kan ^R (Shuman, 1994)	Invitrogen Dieses Plasmid wurde zur Zwischenklonierung von, mit PCR amplifizierten Fragmenten benutzt
pSL1180	Amp ^R	Pharmacia
pSP72	Amp ^R (Krieg und Melton, 1987)	Promega
pEGFP-N1	Amp ^R , Kan ^R	Clontech, EGFP-Gen
pBSKsGFP-tygnos	Amp ^R (Spellig <i>et al.</i> , 1996)	SGFP-Gen
pKH518	Amp ^R Karin Hansson (nicht publiziert)	enthält ein 2,7 kb <i>SphI</i> -Fragment aus 10E1 in pTZ19R
pKH541	Amp ^R Karin Hansson (nicht publiziert)	enthält das <i>pig3</i> -Gen als 5,5 kb <i>HindIII</i> -Fragment in pTZ19R
pKH548	Amp ^R Karin Hansson (nicht publiziert)	enthält das <i>pig3</i> -Gen als 5,5 kb <i>HindIII</i> -Fragment in pTZ19R
pKH550	Amp ^R Karin Hansson (nicht publiziert)	enthält das <i>npi2</i> -Gen als 3 kb <i>NcoI</i> -Fragment in pTZ19R
pKH551	Amp ^R Karin Hansson (nicht publiziert)	enthält ein 7 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus 21A2 in pTZ19R
pCA64	Amp ^R	Aus pTZ 6,5 <i>BamHI</i> a2 (Bölker <i>et al.</i> , 1992) wurde ein 2,5 kb <i>PstI</i> -Fragment in pTZ 18R kloniert.
pCA205	Amp ^R ,	8 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus dem Cosmid 9H2 in pTZ18R
pCA234	Amp ^R ,	Aus dem Cosmid 9A1 wurde ein 5,5 kb <i>HindIII</i> -Fragment in pTZ18R kloniert daß, das Insert aus pCA233 umfaßt.

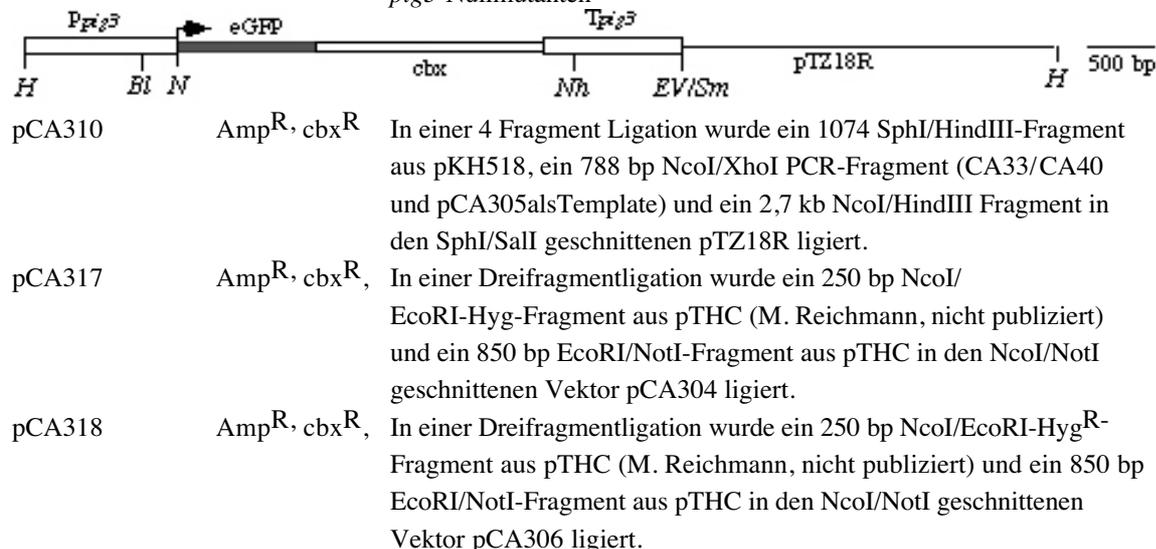
5.2 Plasmidkonstruktionen

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Name	Selektions- marker	Klonierungsstrategie
pCA2	Amp ^R , Hyg ^R	Mit den Oligonukleotiden CA5 und CA6 und DNA aus FB1 wurde ein 250 bp Fragment aus dem <i>mfa1</i> Promotor amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>NcoI</i> und <i>KpnI</i> geschnitten und in einer 5 Fragment Ligation mit einem 1020 bp <i>NcoI/XbaI</i> -Fragment aus pBKSsGFP-Tyg-nos, 760 bp <i>KpnI/PstI</i> Fragment aus pTZBm 10,0a1 und einem 935 bp <i>NheI/BamHI</i> Fragment in pTZ18R (<i>BamHI/PstI</i>) ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit <i>SmaI</i> geschnitten und die Hygromycin-Kassette aus pCM54 als <i>PvuII</i> -Fragment eingesetzt.
pCA7	Amp ^R , cbx ^R	Mit den Oligonukleotiden CA7 und CA8 wurde ein 250 bp langes Fragment aus dem <i>lga2</i> -Promotor amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>NcoI</i> und <i>XhoI</i> /blunt geschnitten und zusammen mit dem 1020 bp <i>XbaI</i> blunt/ <i>NcoI</i> Fragment aus in den <i>MunI/XhoI</i> geschnittenen pCA64 kloniert. Dieses Konstrukt wurde <i>SpeI</i> geschnitten, mit Klenov-Polymerase aufgefüllt und die 1,7 kb <i>cbx</i> -Resistenzkassette als <i>EcoV/SmaI</i> Fragment eingesetzt
pCA104	Hyg ^R	Ausgehend von pHA390 (Hartmann, 1997) wurde ein 240 bp <i>EcoRV</i> -Fragment deletiert, der Vektoranteil dephosphoriliert und gleichzeitig <i>BamHI</i> -Linker inseriert. Aus dem daraus resultierenden Plasmid wurde die Hygromycin-Resistenzkassette durch <i>PvuII/EcoRI</i> herausgeschnitten und durch die <i>EcoRI/SmaI</i> Hygromycin-Resistenzkassette aus pSMUT ersetzt. Vektor für die REMI-Transformation.
pCA125	Hyg ^R	Aus peGFP-N1 wurde das 723 bp EGFP-Gen als <i>NcoI/NotI</i> -Fragment ausgeschnitten und in einer Dreifragmentligation mit dem 2 kb <i>NotI/ClaI</i> und dem 2,4 kb <i>ClaI/NcoI</i> -Fragmenten aus pCA104 ligiert. Das resultierende Plasmid pCA125 ist bis auf eine Punktmutation im GFP-Gen zu pCA104 identisch.
pCA114-3	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #114
pCA219-13	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #219
pCA219-15	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #219

pCA424	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #424
pCA500-3	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #500
pCA624-13	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #624
pCA698-2	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #698
pCA704-15	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #704
pCA727-10	Amp ^R , Hyg ^R	"plasmid rescue" mit <i>MluI</i> aus der Mutante #727
pCA213	Amp ^R , NAT ^R	In einer 5-Fragment Ligation wurden folgende Fragmente ligiert. 8,2 kb <i>BglII/XhoI</i> aus pCA205, 1,5 kb <i>MunI/XhoI</i> -Fragment aus pSLNAT, 1020 bp <i>NcoI/EcoRV</i> -Fragment aus pCA125, 300 bp <i>BglII/NcoI</i> -PCR-Produkt aus LIM-ATG/LIM5' und ein 300bp <i>EcoRI/BglII</i> PCR-Produkt LIM Stop/LIM3'. Dadurch wurde der ORF von <i>ldp1</i> durch eine EGFPNAT-Resistenzkassette ersetzt und am Startkodon eine <i>NcoI</i> , bzw., am Stopkodon eine <i>EcoRI</i> -Schnittstelle eingeführt.
pCA233	Amp ^R ,	Die DNA der Mutante #1486 wurde mit <i>SphI</i> geschnitten und ligiert. Diese DNA diente als Matrize für die Amplifikation eines 1750 bp PCR-Produkts durch die Oligonukleotide Hyg3'/5'REMI. Das Produkt wurde in pCR [®] 2.1-TOPO ligiert. "plasmid rescue" der Mutante #1486.
pCA240	Amp ^R , Hyg ^R	Aus pCA234 wurde ein 550 bp <i>EcoRI/BamHI</i> durch die entsprechend geschnittene Hyg-Resistenzkassette aus pSMUT ersetzt. <i>Δuat1</i> -Konstrukt.
pCA242	Amp ^R ,	0,8 kb genomisches <i>NcoI</i> -Fragment in pSL1180 aus der Mutante #1685
pCA248	Amp ^R , NAT ^R	Aus pCA234 wurde ein 600 bp <i>EcoRI/BglII</i> -Fragment deletiert und durch die NAT-Resistenzkassette ersetzt. <i>ΔGA</i> -Deletionskonstrukt.
pSC4	Amp ^R , cbx ^R	pSC4 enthält ein 5,5 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pCA234 und eine <i>cbx</i> -Resistenzkassette aus pSLCbx in der <i>BamHI</i> -Schnittstelle von pCA234 (S. Cubasch, persönliche Mitteilung).
pSC5	Amp ^R , Hyg ^R	Enthält das 2750 bp <i>BamHI/ClaI</i> -Fragment aus pCA125 als Insertion an der Stelle -100 bezüglich der GA-Dinukleotidsequenz aus pCA234 (S. Cubasch, persönliche Mitteilung).
pSC6	Amp ^R , Hyg ^R	Enthält das 2750 bp <i>BamHI/ClaI</i> -Fragment aus pCA125 als Insertion an der Stelle -300 bezüglich der GA-Dinukleotidsequenz aus pCA234 (S. Cubasch, persönliche Mitteilung).
pSC7	Amp ^R , Hyg ^R	Enthält das 2750 bp <i>BamHI/ClaI</i> -Fragment aus pCA125 als Insertion an der Stelle -700 bezüglich der GA-Dinukleotidsequenz aus pCA234 (S. Cubasch, persönliche Mitteilung).
pCA304	Amp ^R , cbx ^R	3,8 kb <i>HindIII/NcoI</i> -Fragment aus pCA307 wurde in die entsprechenden Schnittstellen von pTZ19R kloniert.
pCA305	Amp ^R , cbx ^R	3,3 kb <i>StuI/HindIII</i> -Fragment aus pCA307 wurde in den <i>HindIII/HincII</i> geschnittenen pTZ19R ligiert
pCA306	Amp ^R , cbx ^R	pCA307 wurde mit <i>BspI</i> geschnitten, mit Klenov-Polymerase aufgefüllt und nach Restriktion mit <i>HindIII</i> konnte ein 3,1 kb Fragment isoliert werden, das in einen <i>SmaI/HindIII</i> geschnittenen pTZ19R ligiert wurde.
pCA307	Amp ^R , cbx ^R	PCR-Amplifikation der 5' und 3' Bereiche von <i>pig3</i> durch die Primerkombinationen <i>pig3-1/rev</i> bzw. <i>pig3-2/uni</i> mit pKH548 als Matrize. Verdau der Amplikons mit <i>BspI/NcoI</i> bzw. <i>NheI/HindIII</i> . 4-

Fragment-Ligation mit pKH548 *NheI/BlpI* geschnitten, dem 2,9 kb *NcoI/HindIII*-EGFP-cbx Fragment aus potefegfcbx (A. Brachmann, persönliche Mitteilung). Konstrukt für GFP-Reporterstämme und *pig3*-Nullmutanten



5.3 Mikrobiologische und genetische Methoden

5.3.1 Bestimmung der Zelldichte von *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Lambda Bio-UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer) bei 600 nm bestimmt. Um im linearen Bereich zu messen, wurden die Kulturen so verdünnt, daß eine Messung im linearen Bereich möglich war. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 je nach verwendetem Stamm und Wachstumsstadium in etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml Kultur.

5.3.2 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden aus bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen bzw. direkt von YT-Amp-Transformationsplatten angeimpft.

5.3.3 Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert. Als Nährmedien dienten YEPS (Tsukuda *et al.*, 1988), CM, PD und MM mit 1% Glukose (Holliday, 1974). Zur Selektion von Resistenzen wurde Hygromycin (100-200 µg/ml), Carboxin (2µg/ml) oder Nourseothrizin (200 µg/ml) zugesetzt. Andere Zusätze werden gesondert angegeben. Übernachtkulturen wurden entweder aus bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen Platten, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft.

5.3.4 CaCl₂-Transformation von *E. coli* (Cohen *et al.*, 1972)

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 200 ml dYT-Medium 1/200 mit einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5-0,8 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus® Varifuge 3.0R) pelletiert und in 100 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus® Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung, die 15% (v/v) Glycerin enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 200µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁷ Transformanden pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

5.3.5 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Zur Herstellung Transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 200 ml dYT-Medium 1/200 mit einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5-0,8 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus® Varifuge 3.0R) pelletiert und zweimal in 100 ml H₂O resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus® Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen in 2 ml eiskaltem Wasser, das 10% (v/v) Glycerin enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 40 µl mit 2,5 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 50 sec auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in Elektroporationskvetten (BioRad) überführt. Bei einer Spannung von 2,5 kV wird die DNA in die Zellen transformiert (Elektroporator, BioRad). Beste Effizienzen ergaben sich bei einer Zeitkonstanten von 4,7 ms. Zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz wurden die Zellen mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10¹⁰ Transformanden pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

5.3.6 Transformation von *U. maydis* (Schulz *et al.*, 1989)

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal $OD_{600} = 1,0$) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus® Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 12,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (10-45 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10 minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus® Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang noch dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 μ l Protoplasten mit 1-5 μ l linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 μ g) und 1 μ l Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz vorher mit Top-Agar überschichteten cbx-, Nat- bzw. Hyg-Bottom-Agarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf frische PD-Platten, die Phleomycin bzw. Hygromycin enthielten, vereinzelt.

5.3.7 Test auf filamentöses Wachstum bei *U. maydis* (Puhalla, 1968)

Um *U. maydis*-Stämme auf ihre Fähigkeit, filamentös zu wachsen, zu testen, wurden logarithmisch wachsende Kulturen in PD-Medium verwendet. 1-4 μ l dieser Kulturen wurden auf PD-Aktivkohle-Platten, die entweder kein cAMP oder 6 mM cAMP enthielten, getropft. Sollten Kreuzungen auf filamentöses Wachstum untersucht werden, wurde zuerst die optische Dichte der zu kreuzenden Kulturen bestimmt, einander angeglichen und gleiche Volumina miteinander gemischt, bevor die Kulturen auf Aktivkohleplatten getropft wurden. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert. Nach 24 - 48 h ist der Fuz⁺-Phänotyp filamentös wachsender Stämme gut zu erkennen und vom glatten Fuz⁻-Phänotyp nicht filamentös wachsender Stämme klar zu unterscheiden.

5.3.8 Test auf Pathogenität (Gillissen *et al.*, 1992)

Um *U. maydis*-Stämme auf Pathogenität zu testen, wurden mit in Flüssigkultur über Nacht angezogenen Zellen in 7-8 Tage alte Maispflanzen (Varietät Early Golden Bantam) bzw. 14-15 Tage alte Maispflanzen (Varietät Gaspar Flint) inokuliert. Die Maispflanzen wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (14 h bei 28°C, 10 h bei 18°C) gezüchtet. Die Bonitur erfolgte nach 7 und 21 Tagen oder wie im Ergebnisteil angegeben.

5.3.9 REMI-Mutagenese (Bölker *et al.*, 1995)

Pro 50 μ l Protoplasten des Stammes FBD11 wurden 5 μ g DNA (pCA104 oder CA125) und 1 μ l Heparin-Lösung mit 50 U *Bam*HI gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend wie bei der Transformation linearisierter DNA in *U. maydis* weiterbehandelt.

5.3.10 Selektion von Mutanten anhand der GFP-Expression in axenischer Kultur

FBD11 REMI-Transformanden wurden in 2 ml YEPS-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Hyg angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 200rpm inkubiert. Die Kulturen wurden bei einer OD 600 von 0,8 - 1,3 geerntet, nach ihrer OD sortiert und anschließend zu je 100 μl in Mikrotiterplatten überführt. Von dort wurden die Kolonien mit einem Mehrfachaluminiumstempel und einer Stempeloberfläche von 0,25 cm^2 auf CM, MM, PD, PD-Hyg und PD-CC-Platten gestempelt. Die PD-Hyg-Platten dienten der Konservierung. Den Kulturen in den Mikrotiterplatten wurden je 100 μl NSY-Glycerin zugegeben, gemischt und bei -80 °C aufbewahrt. Die gestempelten wurden bei 28 °C inkubiert. Nach etwa 36 h wurden die Expression in den Mutanten anhand der GFP-Fluoreszenz der Kolonien bestimmt. Dazu wurden die Platten in einem "eagle eye" (Stratagene) mit einer Blaulichtquelle bestrahlt. Die grüne Fluoreszenz wurde mit einer CCD-Kamera, der ein Filter (HQ525/50m Filter; Chroma Technology) vorgeschaltet war, welches nur Licht einer Wellenlänge von 505 nm - 525 nm durchläßt erfaßt. Die GFP Fluoreszenz kann dann auf einem Monitor betrachtet oder das Bild mit einem Thermodrucker ausgedruckt werden. Durch den Vergleich der Intensität des emittierten Lichtes kann die Expressionsstärke abgeschätzt werden.

5.4 Molekularbiologische Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989)

5.4.1 Handhabung von Nukleinsäuren

5.4.1.1 Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (15.000 Upm, RT, Heraeus® Biofuge 15) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneutem kurzem Zentrifugieren wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ oder TE-Puffer gelöst.

5.4.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wäßrigen DNA-Lösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit gleichem Volumen PC kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (15.000 Upm, 5 min, Heraeus® Biofuge 15) und die obere wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert (s. o.).

5.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren

5.4.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook, et al. (1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 30 sec bei 14.000 Upm (RT, Heraeus® Biofuge 15) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 350 μl STET resuspendiert, nach Zugabe von 25 μl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 45 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus® Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wäßrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 μl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 μl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm

(Heraeus Biofuge® 15). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 200 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

5.4.2.2 "plasmid rescue"

10 µg genomischer DNA der REMI-Mutanten wurde mit 10 U *Mlu*I geschnitten. Nach Ligation in insgesamt 20 µl wurden je 4 µl DNA (2,5 µg) in 40 µl elektrokompente DH5α-Stämme transformiert.

5.4.2.3 Maxipräparation von Cosmid- bzw. Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Maxicosmid- bzw. Maxiplasmidpräparation wurde mit dem JETSTAR®-Kit von Genomed durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

5.4.2.4 DNA-Isolierung aus *U. maydis* (Hoffmann und Winston, 1987)

15 ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Es wurden 200 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl Phenol/Chloroform und 0,3 g Glasperlen zugegeben. Die Proben wurden für 3,5 min gevortext. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 Upm. 400 µl des Überstands wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 15.000 Upm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 400 µl TE + 3 µl RNase A (10 mg/ml) bei 37°C resuspendiert. Nach einer weiteren Extraktion mit 1 Vol. Phenol/Chloroform wurde der Überstand mit 5,5 µl 7,5 M Ammoniumacetat versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Fällung, Waschen und Trocknung wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

5.4.2.5 RNA-Isolierung aus *U. maydis*

a. Isolierung nach der alkalischen Phenol-Methode (Timberlake *et al.*, 1986)

Diese Methode diente zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die für 48 h auf CM-Charcoal-Festmedien gewachsen waren. Dazu wurde das Pilzmaterial von 3 Platten abgekratzt, in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Das gefrorene Pulver wurde mit 5 ml RNA-Lysepuffer durchmischt und durch Zugabe von flüssigem Stickstoff erneut eingefroren. Die Mischung wurde zu einem feinen Pulver gemörsert, in 10 ml TE-Phenol überführt, in diesem bei RT aufgetaut und anschließend mit 0,5 ml Glasperlen für 4 min in 50 ml PPN-Röhrchen heftig geschüttelt. Dem Ansatz wurden 10 ml Chloroform zugesetzt, nach Zentrifugation (15 min, 10.000 Upm, 4°C, Beckman Avanti®30 Zentrifuge) und Phasentrennung die wässrige Phase in neue Gefäße überführt, dreimal mit dem gleichen Volumen PC ausgeschüttelt, die RNA anschließend durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Li-Acetat für 2 h bei 0°C gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 10.000 Upm, 4°C, Beckman Avanti®30 Zentrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal in RNA-Waschpuffer gewaschen, nach Trocknung in H₂O_{bid.} aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1%-igen TAE-Agarosegel analysiert.

b. Isolierung nach der sauren Phenol-Methode (Schmitt *et al.*, 1990)

Diese Methode diente zur Präparation von Gesamt-RNA aus Flüssigkulturen, die für 10 h in PD-Medium mit 0 mM, 6 mM bzw. 15 mM cAMP bis zu einer OD₆₀₀ von maximal 0,8 propagiert wurden. 10 ml einer solchen *U. maydis*-Kultur wurden abzentrifugiert (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 400 µl AE-Puffer

und 40 μl 10% (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 440 μl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec gevortext. Der Zellausfluß erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf-Thermomixer). Im Anschluß daran wurde die Probe bei -80°C gelagert, bis sich Phenolkristalle gebildet hatten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (22.000 Upm, 5 min, 4°C, Beckman Avanti®30 Zentrifuge) wurde die obere wäßrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 400 μl AE-PC. Die wäßrige RNA-Lösung wurde danach mit 40 μl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20min, 4°C, Beckman Avanti®30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 μl H₂O_{bid.} aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 μl auf einem 1%-igen TAE-Agarosegel analysiert.

c. Isolierung von PolyA⁺RNA aus gesamt-RNA-Präparationen mit Hilfe von Dynabeads (Dynal)

Für die Isolierung von PolyA⁺-RNA wurde gesamt RNA mit Wasser auf eine Konzentration von 75 $\mu\text{g}/100$ μl eingestellt und 2 min bei 65 °C denaturiert. Währenddessen wurden 200 μl Dynabeads Oligo (dT)₂₅ laut Herstellerangabe 2x in Lösung D gewaschen und anschließend in 100 μl Lösung D aufgenommen. Anschließend wurde die RNA hinzugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die entstandene Lösung wurde entfernt und die Beads 2x mit LösungE gewaschen und schließlich in 10 μl Lösung F aufgenommen, 2min bei 65 °C inkubiert und dadurch eluiert. Die Probe wurde von den Beads abgetrennt und in ein neues Gefäß überführt.

5.4.3 *in vitro*-Modifikationen von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

5.4.3.1 Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Ein analytischer Ansatz enthielt:

0,5 μg	DNA
10 μg	Albumin (falls empfohlen)
1-2 U	Restriktionsenzym
in 20 μl	Restriktionspuffer

Nach Inkubation für 1 h bei 37°C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 μl nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert.

5.4.3.2 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 μg	Plasmid-DNA
1 U	Alkalische Phosphatase
in 100 μl	Alkalische Phosphatase-Puffer

Der Ansatz wurde 2 x 15 min bei 55°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Extraktion mit 100 μl PC durchgeführt. Die wässrige Phase wurde direkt auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA mit JETSORB® (Genomed) isoliert.

5.4.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in fünffach molarem Überschuß gegenüber der dephosphorylierten, linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

100 ng linearisierten, dephosphorylierten Vektor
 fünffach molaren Überschuß an linearem Fragment
 1 U T4 DNA-Ligase
 in 10 μ l Ligase-Puffer

Der Ansatz wurde entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14°C inkubiert. Für Ligationen von nicht-überhängenden Enden wurde generell über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

5.4.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

5.4.4.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989). In der Regel wurden Gele mit 1% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1 x TAE- oder 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 μ g/ml) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1 x AE- bzw. 0,5 x TBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 10:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (304 nm) mit einer "eagle eye"-Apparatur (Stratagene) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden.

5.4.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der JETSORB®-Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen freizuwaschen und schließlich unter Niedersalzbbedingungen die DNA von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80-90 % isoliert werden.

5.4.4.3 Denaturierende Formamid/Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA

Da RNA-Fragmente, insbesondere solche mit hohem Molekulargewicht, partiell Sekundärstrukturen ausbilden, die das Laufverhalten im Agarosegel beeinflussen können, muß eine Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Die RNA-Probe (10-30 ng) wurde in 20 μ l MOPS-Puffer mit 2,2 M Formaldehyd und 50% Formamid (deionisiert) für 15 min bei 65°C denaturiert, mit 2 μ l denaturierendem Auftragspuffer und Ethidiumbromid (0,05 μ g/ml Endkonzentration) versetzt und auf Eis gestellt. Für das Gel wurden 2 g Agarose in 145 ml H₂O_{bid.} aufgekocht und auf etwa 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 20 ml 10 x MOPS-Puffer und 36 ml Formaldehyd (37%, filtriert) wurde die Agaroselösung gut gemischt und in Elektrophoreseschlitten gegossen.

Das erstarrte Gel wurde mit MOPS-Puffer überschichtet und 5 min bei 8 V/cm vorelektrophoretisiert. Die aufgetragenen Proben wurden bei 5-7 V/cm 2,5 h aufgetrennt. Die 18S- und 28S-rRNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (302 nm) mit einer "eagle eye"-Apparatur (Stratagene) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden.

5.4.4.4 Denaturierende Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA kann ebenfalls durch eine Glyoxal/DMSO-Behandlung der Proben erreicht werden. Diese Methode hat den Vorteil, schärfere Banden nach der Northern-Hybridisierung zu erzeugen. Die RNA-Probe (5-15 μg) wurde dazu in 16 μl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50% DMSO für 30 min bei 50°C denaturiert, mit 2 μl denaturierendem Auftragspuffer und Ethidiumbromid (0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) versetzt und auf Eis gestellt. Für das Gel wurden 2 g Agarose in 200 ml 1 x MOPS-Puffer aufgekocht und auf etwa 60°C abkühlen gelassen und in Elektrophoreseschlitten gegossen.

Das erstarrte Gel wurde mit MOPS-Puffer überschichtet und 5 min bei 8 V/cm vorelektrophoretisiert. Die aufgetragenen Proben wurden bei 5-7 V/cm 2 h aufgetrennt, das Gel wurde alle 60 min im Puffer umgedreht. Die 18S- und 28S-rRNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (302 nm) mit einer "eagle eye"-Apparatur (Stratagene) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden.

5.4.5 Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren auf Membranen

5.4.5.1 Transfer von DNA (Southern-Blot; Southern, 1975)

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT inkubiert.

Aufbau des Blots von unten nach oben:

- Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir
- Agarosegel
- Nylonmembran (Biodyne® B)
- 2 Lagen Whatman 3MM
- Stapel Papierhandtücher
- Glasplatte
- Gewicht (ca. 500 g)

Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde der Filter getrocknet und die DNA-Moleküle durch UV-Behandlung (280 nm) für 2 min kovalent mit der Membran verknüpft.

5.4.5.2 Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Biodyne B, 0,45 μm , PALL) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20_{SSC} über Nacht (Aufbau wie für Southern-Blot beschrieben). Anschließend wurde der Filter getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (2 min, 280 nm) kovalent mit der Membran verknüpft. Der Transfer wurde durch Anfärben der Membran in 0.1% Methylenblau in 0.3M NaAc nachgewiesen.

5.4.5.3 Herstellung einer DNA-Hybridisierungssonde (Feinberg und Vogelstein, 1984)

Die Herstellung von Hybridisierungssonden mit sehr hoher spezifischer Aktivität erfolgte durch "Primer Extension" mit Hilfe des Megaprime® DNA Labeling System-Kits (Amersham).

5.4.5.4 Spezifischer Nachweis von an Membranen gebundener DNA

Die Biodyne® B-Membranen wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 65°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte, radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 65°C mit Southern-Waschpuffer gewaschen. Die Detektion erfolgte in Kassetten für den Phosphoimager Image Quant STORM840® (Molecular Dynamics). Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphoimager eingelesen und mit dem dazugehörigen Computerprogramm Image Quant® bearbeitet.

5.4.5.5 Spezifischer Nachweis von an Membranen gebundener RNA

Nach einer 30-minütigen Präinkubation der Membranen bei 60°C in Hybridisierungspuffer wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde zugegeben und über Nacht hybridisiert. Die Filter wurden anschließend zweimal für 20 min bei 60°C gewaschen und in Kassetten für den Phosphoimager Image Quant STORM840® (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 h wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphoimager eingelesen und mit dem dazugehörigen Computerprogramm Image Quant bearbeitet.

Als Sonden für die Northernanalyse wurden folgende Fragmente verwendet:

<i>mfa1</i>	Ein 0.7kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pUMa1 (Bölker <i>et al.</i> , 1992)
<i>mfa2</i>	Ein 0.3kb <i>PstI-SpeI</i> -Fragment aus pUMa2 (Bölker <i>et al.</i> , 1992)
<i>pra1</i>	Ein 1,3 kb <i>EcoRI/EcoRV</i> -Fragment aus pUma1 (Urban <i>et al.</i> , 1996)
<i>lga2</i>	Ein 0,8 kb <i>EcoRI</i> cDNA-Fragment aus pMU152 (Urban <i>et al.</i> , 1996)
<i>bE1</i>	Ein 1,4 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pUb1 (Schulz <i>et al.</i> , 1990)
<i>bW2</i>	Ein 1,9 kb <i>NdeI</i> -Fragment aus pJBbW2 (J. Bergemann, 1993)
<i>prf1</i>	Ein 1,5 kb <i>Sall/BglII</i> -Fragment aus pSP-4,7H (A. Hartmann, 1997)
<i>ppi1</i>	Ein 150 bp <i>Sall/PstI</i> -Fragment aus ppi1 (R. Bohlmann, 1996)
<i>pig2</i>	219-15a Ein 1,8 kb <i>MluI/BamHI</i> -Fragment aus pCA219-15
<i>npi4</i>	219-15b Ein 2,5 <i>BamHI</i> -Fragment aus pCA219-15
<i>npi5</i>	1486c Ein 3 kb <i>MluI/HindIII</i> -Fragment aus pCA234 1486d Ein 1 kb <i>SphI/HindIII</i> -Fragment aus pCA234
<i>npi8</i>	Ein 1,2 kb <i>MluI/BamHI</i> -Fragment aus pCA500
<i>npi9</i>	Ein 2 kb <i>MluI/BamHI</i> -Fragment aus pCA624
<i>npi9</i>	Ein 0,7 kb <i>MluI/BamHI</i> -Fragment aus pCA624
<i>abp1</i>	219-13a Ein 750 bp <i>BamHI/MluI</i> -Fragment aus pCA219-13
<i>ldp1</i>	219-13c Ein 1 kb <i>HindIII/BamHI</i> -Fragment aus pCA219-13
<i>uat1</i>	1486b Ein 1,9 kb <i>HindIII/MluI</i> -Fragment aus pCA234
<i>cbx</i>	Ein 1.7kb <i>EcoRI-EcoRV</i> Fragment aus pCbx122 (Keon <i>et al.</i> , 1991)
GFP	Ein 1020 bp <i>NcoI/NotI</i> -Fragment aus pCA104

Sonden für den *p*-Locus

<i>pig3</i>	1685e Ein 480 bp <i>HindIII/StuI</i> -Fragment aus pKH541 1685f Ein 1,2 kb <i>SphI/StuI</i> -Fragment aus pKH541 1685g Ein 0,6 kb <i>SphI/XhoI</i> -Fragment aus pKH541 <u>1685h Ein 2,1 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pKH541</u>
<i>pig4</i>	<u>1685d Ein 1,6 kb <i>NcoI/XbaI</i>-Fragment aus pKH519</u>
<i>pig5</i>	<u>1685e Ein 480 bp <i>HindIII/StuI</i>-Fragment aus pKH541</u>
<i>pig6</i>	<u>1685b Ein 2,3 kb <i>BamHI/EcoRI</i>-Fragment aus KH551</u>
<i>npi1</i>	<u>1685c Ein 850 bp <i>NcoI/SphI</i>-Fragment aus KH551</u>

<i>npi2</i>	<u>1685j Ein 900bp <i>SphI</i>-Fragment aus KH550</u>
<i>npi3</i>	<u>1685a Ein 600 bp <i>PstI/SacI</i>-Fragment aus KH570</u>
5,8s rRNA	1685i Ein 1,3 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pKH541
<i>pig4, pig6,</i> <i>npi1</i>	1685k Ein 9 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus KH551
<i>pig7, pig8, npi2</i>	1685l Ein 7 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pKH551

Sonden, die in der Abbildung 24 verwendet wurden sind unterstrichen

5.4.5.6 Koloniehybridisierung

Nach der Transformation partieller DNA-Banken in *E. coli* wurden die Transformanten 30 min bei 4°C gekühlt. Anschließend wurde eine ungeladene Nylonmembran (PALLA) für etwa 30 sec auf die Bakterien gelegt, mit einer Spritzenadel an drei Stellen so markiert, daß die Filter später den Platten zugeordnet werden konnten. Anschließend wurden die Filter vorsichtig abgezogen, und für 5 min auf, mit DENAT getränkte Whatman Papiere gelegt. Danach wurden die Filter für weitere 5 min in RENAT inkubiert, getrocknet und für 2 h bei 60°C gebacken. Der Nachweis von DNA erfolgte wie in 5.4.5.3 beschrieben.

5.4.6 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Plasmid-DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA mit dem JETQUICK®-Kit (Genomed) aufgereinigt.

Die Sequenzreaktion wurde mit 30 Zyklen nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Dideoxy-Methode nach Sanger *et al.*, (1977). In den Reaktionsansatz wurden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert.

Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid/25 mM EDTA (4:1)-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 6 µl Auftragspuffer wurde die Probe 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Ein 2 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen.

Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software des ABI 377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet.

5.4.7 Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse und für Homologievergleiche wurden folgende Programme benutzt: DNA-Strider 1.2, SequenceNavigator, BLAST, CLUSTAL W, SeqVu, Prosite, SWISS-Prot.

5.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden. Man benötigt hierzu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Omni Gene-Gerät (Hybaid) oder einem Robocycler Gradient® (Stratagene) durchgeführt.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt:

100 ng	DNA
5 μ l	Primer 1 (10 pmol/_l)
5 μ l	Primer 2 (10 pmol/_l)
1 μ l	dNTPs (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
1 μ l	Taq DNA-Polymerase (1 U/_l)
6 μ l	25 mM MgCl ₂
10 μ l	10_PCR-Puffer

in 50 μ l H₂O_{bid}
überschichtet mit 50 μ l Paraffin, falls Reaktion ohne Heizdeckel.

Die Reaktionszeiten waren wie folgt:

1 Zyklus Denaturierung bei 94°C 1 Minuten
25 - 33 Zyklen Amplifikation
20" Denaturierung bei 94°C
30" Binden der Primer bei 55-62°C
pro 800 bp 1' Polymerisation durch Taq bei 72°C
1 Zyklus Verlängerung bei 72°C 5 Minuten
ist nötig um nicht vollständig synthetisierte Fragmente zu komplettieren

5.4.9 Anchor-PCR (REMI-"rescue")

10 μ g genomische DNA wurde mit 10 U Restriktionsenzym verdaut und in 20 μ l ligiert. Für die PCR-Reaktion wurden 2 μ l Ligationsansatz verwendet. Amplifikation erfolgte nach dem Standardprotokoll bei einer Annealingtemperatur von 60°C.

5.5 Zellbiologische Methoden

5.5.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopische Analysen wurden an einem Zeiss Axiophot durchgeführt. Für "Differential Interference Contrast" (DIC)-Mikroskopie wurde ein 100x, 1,4 numerische Apartur Plan-APOCHROMAT® Objektiv (Zeiss) verwendet. Für digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742, Hamamatsu) wurde ein 4-fach-Tubus in den Lichtgang eingesetzt, die Bilder mit dem Programm HiPic 4.2.0® (Hamamatsu) bearbeitet und als "tif-image" gespeichert. Für die Fluoreszenzmikroskopische Analyse von GFP wurde der FITC-Filtersatz (Zeiss) verwendet, dem ein LP520 Filter vorgeschaltet war.

5.5.2 Mikroskopische Analyse der Reporterstämme auf der Oberfläche von Maisblättern und während der biotrophen Phase

Zur mikroskopischen Analyse wurden 0,5 cm² große Quadrate aus Maisblätter 1, 2, 4 und 6 Tage nach der Infektion mit den REMI-Mutanten unweit der Infektionsstelle entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, daß keine nekrotischen Bereiche mitausgeschnitten wurden, da dort Hintergrundfluoreszenz auftritt. Die Quadrate wurden in einem Tropfen Wasser auf Objektträger gelegt und analysiert. Um Reporterstämme beim Wachstum innerhalb der Pflanze und in Tumorgewebe zu untersuchen, wurden mit der Hand Querschnitte angefertigt und für die Analyse Stellen ausgewählt, die 3 - 6 Zellschichten dick waren.

5.5.3 Bildverarbeitung

Zur Kontrastverstärkung und zur Skalierung der Maßstäbe wurden die digitalen Bilder im Programm Image Proplus® bearbeitet. Im TIFF-Format konnten sie anschließend in Adobe Photoshop® (Adobe Systems, Inc.) exportiert werden und wurden in diesem Programm bei gleichbleibender Auflösung auf die nötige Größe reduziert. Zur Komprimierung der Daten wurden die Bilder anschließend im JPEG Format gespeichert und konnten daraufhin im Programm Canvas6™ (Deneba) geöffnet und dort beschriftet werden.

Zur Kontrastverstärkung und zur Skalierung der Maßstäbe wurden die digitalen Bilder im Programm Image Proplus® bearbeitet. Im TIFF-Format konnten sie anschließend in Adobe Photoshop® (Adobe Systems, Inc.) exportiert werden und wurden in diesem Programm bei gleichbleibender Auflösung auf die nötige Größe reduziert. Zur Komprimierung der Daten wurden die Bilder anschließend im JPEG-Format gespeichert und konnten daraufhin im Programm Canvas6™ (Deneba) geöffnet und dort beschriftet werden.

Literaturverzeichnis

- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C. and Genin, S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* **19**, 2304-14.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-402.
- Aziz, N. H., Farag, S. E., Mousa, L. A. and Abo-Zaid, M. A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* **93**, 43-54.
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L. and Goffeau, A. (1994). *PDR5*, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator *PDR1*. *J Biol. Chem.* **269**, 2206-14.
- Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 179-208.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1989). Different 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. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-76.
- Baron, C. and Zambryski, P. C. (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annu Rev. Genet.* **29**, 107-29.
- Basse, C. W., Lottspeich, F., Steglich, W. and Kahmann, R. (1996). Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Europ. J. Biochem.* **242**, 648-56.
- Basse, C., W., Stumpferl, S., and Kahmann, R., (2000). Charakterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 329-39
- Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K. and Gehring, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**, 1288-300.
- Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F. and Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 266-92.
- Billett, E. E., and J. H. Bournett (1978). The host-parasite physiology of the maize smut fungus *Ustilago maydis*: II Transmission of ¹⁴C labeled assimilates in smutted maize plants. *Phys. Plant Path.* **12**, 103-112.
- Bölker, M., Bohnert, H. U., Braun, K. H., Gorl, J. and Kahmann, R. (1995). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol. Gen. Genet.* **248**, 547-52.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-50.
- Bohlmann, R. (1996). Dissertation

- Braakman, I., Helenius, J. and Helenius, A. (1992).** Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **11**, 1717-22.
- Cairns, B. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Winston, F. and Kornberg, R. D. (1998).** Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol. Cell* **2**, 639-51.
- Cano-Canchola, C., Acevedo, L., Ponce-Noyola, P., Flores-Martinez, A., Flores-Carreón, A. and Leal-Morales, C. A. (2000).** Induction of lytic enzymes by the interaction of *Ustilago maydis* with *zea mays* tissues [In Process Citation]. *Fungal Genet. Biol.* **29**, 145-51.
- Carmen, A. A., Rundlett, S. E. and Grunstein, M. (1996).** HDA1 and HDA3 are components of a yeast histone deacetylase (HDA) complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 15837-44.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994).** Green fluorescent protein as marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805
- Christensen, J. J. (1963).** Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am. Phytopathol. Soc. Monogram* **2**.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O. and Herskowitz, I. (1998).** The transcriptional program of sporulation in budding yeast [published erratum appears in *Science* 1998 Nov 20;282(5393):1421]. *Science* **282**, 699-705.
- 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.
- Coleman, M., Henricot, B., Arnau, J. and Oliver, R. P. (1997).** Starvation-induced genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are also induced during growth in planta. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 1106-9.
- Cooley, L., Kelley, R. and Spradling, A. (1988).** Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* **239**, 1121-1128.
- Cremer, C., Munkel, C., Granzow, M., Jauch, A., Dietzel, S., Eils, R., Guan, X. Y., Meltzer, P. S., Trent, J. M., Langowski, J. and Cremer, T. (1996).** Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* **366**, 97-116.
- Day, P. R., Anagnostakis, S. L. and Puhalla, J. E. (1971).** Pathogenicity resulting from mutation at the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **68**, 533-5.
- Dietzel, S., Schiebel, K., Little, G., Edelmann, P., Rappold, G. A., Eils, R., Cremer, C. and Cremer, T. (1999).** The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity. *Exp. Cell. Res.* **252**, 363-75.
- Doebley, J. (1992).** Mapping the genes that made maize. *Trends in Genetics* **8**, 302-7.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984).** "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* **137**, 266-7.
- Freedman, R. B. (1994).** Protein folding. Folding helpers and unhelpful folders. *Curr. Biol.* **4**, 933-5.
- Galan, J. E. and Collmer, A. (1999).** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-8.

- Geng, M., Wallrapp, C., Müller-Pillasch, F., Frohme, M., Hoheisel, J. D. and Gress, T. M. (1998).** Isolation of differentially expressed genes by combining representational difference analysis (RDA) and cDNA library arrays. *Biotechniques* **25**, 434-8.
- Genin, S., Gough, C. L., Zischek, C. and Boucher, C. A. (1992).** Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **6**, 3065-76.
- 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**, 647-57.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. and Kronstad, J. (1994).** cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev.* **8**, 2805-16.
- Gold, S. E., Brogdon, S. M., Mayorga, M. E. and Kronstad, J. W. (1997).** The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* **9**, 1585-94.
- Groisman, E. A. and Ochman, H. (1996).** Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**, 791-4.
- Hahn, M. and Mendgen, K. (1997).** Characterization of in planta-induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 427-37.
- Hanahan, D. (1985).** *Techniques for transformation of E.coli*: IRL Press.
- Hartmann, H. A., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996).** The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **15**, 1632-41.
- Hartmann, H.A. (1997).** Dissertation
- 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. (1961).** The genetics of *U. maydis*. *Genet.Res.Comb.* **2**, 204-230.
- Holliday, R. (1974).** *Ustilago maydis*. New York: Plenum Press.
- Holst, B., Tachibana, C. and Winther, J. R. (1997).** Active site mutations in yeast protein disulfide isomerase cause dithiothreitol sensitivity and a reduced rate of protein folding in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **138**, 1229-38.
- Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H. and Money, N. P. (1991).** Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 11281-4.
- Howard, R. J. and Valent, B. (1996).** Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev. Microbiol.* **50**, 491-512.
- Hueck, C. J. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **62**, 379-433.
- Huppa, J. B. and Ploegh, H. L. (1998).** The eS-Sence of -SH in the ER. *Cell* **92**, 145-8.
- Hwang, C. S., Flaishman, M. A. and Kolattukudy, P. E. (1995).** Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *Plant Cell* **7**, 183-93.

- Joyner, A. L. (1991).** Gene targeting and gene trap screens using embryonic stem cells: new approaches to mammalian development. *Bioessays* **13**, 649-56.
- 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.
- Keon, J. P., White, G. A. and 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.
- Kinscherf, T. G., Coleman, R. H., Barta, T. M. and Willis, D. K. (1991).** Cloning and expression of the tabtoxin biosynthetic region from *Pseudomonas syringae*. *J. Bact.* **173**, 4124-32.
- Kodama, M., Rose, M. S., Yang, G., Yun, S. H., Yoder, O. C. and Turgeon, B. G. (1999).** The translocation-associated tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* is two genetic elements on two different chromosomes. *Genetics* **151**, 585-96.
- Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. S. and Flaishman, M. A. (1995).** Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 4080-7.
- Koncz, C., Nemeth, K., Redei, G. P. and Schell, J. (1992).** T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **20**, 963-76.
- Krieg, P. and Melton, D. (1987).** *In vitro* synthesis with SP6 RNA-Polymerase.
- Kronstad, J. W. and Staben, C. (1997).** Mating type in filamentous fungi. *Annu. Rev. Genet.* **31**, 245-76.
- Kronstad, J. W., Wang, J., Covert, S. F., Holden, D. W., McKnight, G. L. and Leong, S. A. (1989).** Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene* **79**, 97-106.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A. and Kahmann, R. (1998).** Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 193-8.
- Kues, U. (2000).** Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 316-53.
- W. F. (1992).** Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 8803-7.
- Lis, J. T., Simon, J. A. and Sutton, C. A. (1983).** New heat shock puffs and beta-galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an hsp70-lacZ hybrid gene. *Cell* **35**, 403-10.
- Lu, S., Lyngholm, L., Yang, G., Bronson, C., Yoder, O. C. and Turgeon, B. G. (1994).** Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 12649-53.
- Mahato, S. B. and Nandy, A. K. (1991).** Triterpenoid saponins discovered between 1987 and 1989. *Phytochemistry* **30**, 1357-90.
- Maier, F. J. and Schäfer, W. (1999).** Mutagenesis via insertional- or restriction enzyme-mediated-integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. *Biological Chemistry* **380**, 855-64.

- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C. and Arlat, M. (1998). PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* hrp genes in the presence of plant cells. *Mol. Microbiol.* **27**, 437-53.
- Mead, D. A., Szczesna-Skorupa, E. and Kemper, B. Singlestrand DNA .
- Müller, L., Xu, G., Wells, R., Hollenberg, C. P. and Piepersberg, W. (1994). LRG1 is expressed during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* and contains motifs similar to LIM and rho/racGAP domains. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3151-4.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrugge, M. and Kahmann, R. (1999). The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **34**, 1007-17.
- Niederberger, C., Graub, R., Schweingruber, A. M., Fankhauser, H., Rusu, M., Poitelea, M., Edenharter, L. and Schweingruber, M. E. (1998). Exogenous inositol and genes responsible for inositol transport are required for mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **33**, 255-61.
- Ozcan, S. and Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 554-69.
- Pieterse, C. M., Derksen, A. M., Folders, J. and Govers, F. (1994). Expression of the Phytophthora infestans ipiB and ipiO genes in planta and in vitro. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 269-77.
- Pieterse, C. M., Risseuw, E. P. and Davidse, L. C. (1991). An in planta induced gene of *Phytophthora infestans* codes for ubiquitin. *Plant Mol. Biol.* **17**, 799-811.
- Puhalla, J. E. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-74.
- Puhalla, J. E. (1969). The formation of diploids of *Ustilago maydis* on agar medium. *Phytopathology* **59**, 1771-2.
- 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.
- Robinson, A. S., Hines, V. and Wittrup, K. D. (1994). Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (N Y)* **12**, 381-4.
- Rogers, L. M., Flaishman, M. A. and Kolattukudy, P. E. (1994). Cutinase gene disruption in *Fusarium solani* f sp pisi decreases its virulence on pea. *Plant Cell* **6**, 935-45.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R. and Kämper, J. (2000). Identification of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *ustilago maydis* [In Process Citation]. *Mol. Microbiol.* **37**, 54-66.
- Rowell, J. B. and DeVay, J. E. (1954). Genetics of *Ustilago zae* 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*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.
- Sanchez-Garcia, I. and Rabbitts, T. H. (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet.* **10**, 315-20.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

- Schauwecker, F., Wanner, G. and Kahmann, R. (1995).** Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **376**, 617-25.
- Schiestl, R. H. and Petes, T. D. (1991).** Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 7585-9.
- Schmitt, M. E., Brown, T. A. and Trumpower, B. L. (1990).** A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3091-3102.
- 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 [published erratum appears in *Cell* 1990 Feb 9;60(3):following 520]. *Cell* **60**, 295-306.
- Seshachalam, D. (1974).** A protein-nucleic acid complex in teliospores of *Ustilago maydis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **40**, 265-74.
- Shuman, S. (1994).** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**, 32678-84.
- Smith, C. J. and Parker, A. C. (1993).** Identification of a circular intermediate in the transfer and transposition of Tn4555, a mobilizable transposon from *Bacteroides* spp. *J. Bact.* **175**, 2682-91.
- Snetselaar, K. M. (1993).** Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp. Mycol.* **17**, 345-355.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1993).** Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**, 347-355.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W. and Kahmann, R. (1994).** Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **13**, 1620-7.
- 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**, 503-9.
- Spellig, T., Regenfelder, E., Reichmann, M., Schauwecker, F., Bohlmann, R., Urban, M., Bölker, M., Kämper, J. and Kahmann, R. (1994).** Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 191-7.
- Spellig, T. (1996).** Dissertation
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R. (1995).** Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.* **9**, 1797-810.
- Sweigard, J. A., Carroll, A. M., Farrall, L., Chumley, F. G. and Valent, B. (1998).** *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 404-12.
- Tachikawa, H., Miura, T., Katakura, Y. and Mizunaga, T. (1991).** Molecular structure of a yeast gene, *PDII*, encoding protein disulfide isomerase that is essential for cell growth. *J. Biochem. (Tokyo)* **110**, 306-13.

- Talbot, N. J., Ebbole, D. J. and 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., McCafferty, H. R. K., Ma, M., Moore, K. and Hamer, J. E. (1997).** Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. *Phys. Mol. Plant Pathology* **50**, 179-95.
- Trueheart, J. and Herskowitz, I. (1992).** The *a* locus governs cytoduction in *Ustilago maydis*. *J. Bact.* **174**, 7831-3.
- Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J. and Sauer, N. (1996).** The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis *STP4* gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell* **8**, 2169-82.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. and Holloman, W. K. (1988).** Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3703-9.
- Urban, M., Bhargava, T. and Hamer, J. E. (1999).** An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* **18**, 512-21.
- Urban, M., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996).** Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 31-7.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E. and Bonas, U. (1996).** Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**, 1307-16.
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P. and Boucher, C. (1995).** The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol. Microbiol.* **15**, 1095-114.
- VanEtten, H., Funnell-Baerg, D., Wasmann, C. and McCluskey, K. (1994).** Location of pathogenicity genes on dispensable chromosomes in *Nectria haematococca* MPVI. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 263-7.
- Wang, H. and Ward, M. (2000).** Molecular characterization of a PDI-related gene *prpA* in *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Curr. Genet.* **37**, 57-64.
- Wang, R. L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L. and Doebley, J. (1999).** The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**, 236-9.
- Wubben, J. P., Joosten, M. H. and De Wit, P. J. (1994).** Expression and localization of two *in planta* induced extracellular proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**, 516-24.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Regine Kahmann, die zu jeder Zeit an meiner Arbeit interessiert war und meine persönlichen Interessen gefördert hat. Besonders dankbar bin ich ihr für die wissenschaftliche Freiheit, die sie mir immer gewährt hat.

Meinen Eltern möchte ich danken für die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums, für aufmunternde Worte und viele schöne Urlaube.

Jörg, Tina und Georgi möchte ich für den wissenschaftlichen und philosophischen Austausch danken.

Der Gruppe kann ich nicht genug danken für das alles was ich gelernt, erlebt und erfahren habe, und was mich geprägt und verändert hat. Danke euch allen. Einige von euch sind mir über die Zeit besonders an Herz gewachsen. Allen voran mein lieber Philip, der mir ein Freund geworden ist. Julia, danke für viele Einsichten, spannenden Diskussionen, viel Spaß und Billard. Gerhard, Siegi, Mic, Olli, Alex, Andreas und Abram, es war mir immer eine Freude. Schade, daß wir als Team nicht zusammen bleiben können. Bedanken möchte ich mich auch bei Goran Matic, Marc Leibundgut, Steffi Grüneis, Steffi Cubasch und natürlich bei Karin Hansson, die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte hier die Gelegenheit nutzen, mich auch bei meinen Freunden zu bedanken, die mir all die Jahre zur Seite standen, obwohl für die meisten meine Arbeit immer reichlich obskur blieb. Die Wissenschaft fordert viel, und ich bin froh, Euch zu haben. Flo möchte ich besonders für die vielen gemeinsamen Urlaube, tolles Chaos und das "Gartenhaus" danken. Alex, Helge, Annette und Susanne: Danke für eine gute Zeit, offene Worte und viel Spaß. Das Leben als Wissenschaftler kann sehr einsam sein, ihr wart immer für mich da. Danke!! Ein Freund sollte noch besondere Erwähnung finden, meine Frau Sandra, der ich mehr verdanke als ich hier zusammenfassen kann. Du bist ein seltener Glücksfall im Leben.

Lebenslauf

Personalien

Christian Andreas Aichinger
geboren am 26. Dezember 1969 in Landsberg am Lech
verheiratet seit dem 12. Juni 1999

Schulbildung

1976 - 1980	Grundschule in München
1976 - 1979	Leon-Feuchtwanger Gymnasium, München
1979 - 1989	Graf-Rasso Gymnasium, Fürstenfeldbruck
1989	Abitur
1989 - 1990	Wehrdienst

Studium

1990 - 1995	Studium der Biologie an der LMU-München
1994 - 1995	Diplomarbeit bei Prof. R. Kahmann über "Anreicherung von Umc1-Bindesequenzen in <i>Ustilago maydis</i> "
1995	Diplom in Biologie

Promotion

1995 - 2000	Arbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie an der LMU-München Promotion zum Thema: Identifizierung pflanzenabhängig-regulierter Gene in <i>Ustilago maydis</i>
-------------	---

Anhang

Die ORFs der angegebenen Gene wurden in putative Polypeptide übersetzt. Wichtige Restriktionschnittstellen sind angegeben.

Mutante #1685

npi3

```

-210                                     ggtccccccg -201
-200 cagcatgagtcggtcaccaaacacacagccaaattcagtttgaagaactccgaaaagaccttcaaagaagagcagcagccgtccgagaccgagatca -101
-100 gcgcacctgtttatcggaacctccccatcgaggcggtcagtcgcttccctgcagcgaagctcatctctttcctcgagtccttctcgcctatccc -1
  1 ATG ATC ACC AAA GCC CAT GGC CTC CGC TTC CGT TCG GTA GCT TTC TCC GTA CCC ACA GTT CAT CCC GAC CAA GTC 75
  1 M I T K A H G L R F R S V A F S V P T V H P D Q V 25
  76 AAC GAC GAA GAT GAG GAC GCT GAC AAG AAG AAA AAG AAG AAG GGC AAG GCC AAA GAA CGA AGC CAG AAC TAC CGC 150
  26 N D E D E D A D K K K K K K K G K A K E R S Q N Y R 50
  151 GAA GCT GTC GCT GCC GTC GAA GGT GGA GAC AAT GCA CAA GCT CCA TTG ACA GCT CAA CAG AAG CGC AAA ATT GCC 225
  51 E A V A A V E G G D N A Q A P L T A Q Q K R K I A 75
  226 TTC ATC AAC AAG GAC TTT AAC GAA AAG GCC AAG ACG GTC TCT GCA TAC GTT ACC ATT GCC CAT CCC AAA GCA GTG 300
  76 F I N K D F N E K A K T V S A Y V T I A H P K A V 100
  301 CTC GAT CAC CTG TAC GAC ATT GCA CCA CGC CAG TCC AAG CCC AAG AGT GCT GCC AAG ACC CCA ACA CAA CTC ATT 375
  101 L D H L Y D I A P R Q S K P K S A A K T P T Q L I 125
  376 CAG ATC GAC CCA CGA CTC ACG GGC TCC GTT CTT GCT GCT CTG ATC GCC TCG TTC GCC GAC GGT CAA GAC TTC CTA 450
  126 Q I D P R L T G S V L A A L I A S F A D G Q D F L 150
  451 GGC CGT CAT CTG CGT GTC GAC CTG GTC AAA TCC ATA TCG CCC GCT GAG GTG CTC TCC TCC GGT CTG GAA AAG GTC 525
  151 G R H L R V D L V K S I S P A E V L S S G L E K V 175
  526 AAG ACC TTC GAT GCC ACG CTC ACC GGC TCT ACG AGC TCC AAT ACG GAC CTC AAG AGT ACA CTC TTC GCC GGC GGA 600
  176 K T F D A T L T G S T S N T D L K S T L F A G G 200
  601 CTC GAT TTT GAG GTG GAC GAG GAG GAA GTT CGT GCA TTC TTC GAA GCG CTA CTC GTC GAG CTT GGC TCG GCC 675
  201 L D F E V D E E E V R A F F E A L L V E E L G S A 225
  676 GGC GAC GCC GTT ACC ATT CCC ATA ACC GGT CTC GAT GGT GAG CCA GCA TCC AAA CAG CTG CTC GAA TCA TTG TCG 750
  226 G D A V T I P I T G L D G E P A S K Q L L E S L S 250
  751 CGC GAG TTC CCC TTC ATC CTA CCA GAG AAG CGT AAG GCA CGC GAG ACG GTC ACA CGC AAT GCC GAG TAC GTC CGT 825
  251 R E F P F I L P E K R K A R E T V T R N A E Y V R 275
  826 TCG GTG CGC CTC ATT CGC GAT GCA GCT ACC CAA ATG GGC AAA GGT TTC GGC TAC GTC CGC TTT GTC TCG CAG CAG 900
  276 S V R L I R D A A T Q M G K G F G Y V R F V S Q Q 300
  901 TGC GTT GAT GAA GTC ATG GCC ATC TAC AAC GCC GAG CAG GCG TTC TTG GAA TCC GTC AAG GGC GTT AAA GGC AGT 975
  301 C V D E V M A I Y N A E Q A F L E S V K G V K G S 325
  976 CTG GGT GCC TCT GCT GCT ATT GCT GCC GGT GGA AAA GAG TTC AAA CGT CGA CTC AAG CTC AAA GGG CGA CCG ATC 1050
  326 L G A S A A I A A G G K E F K R R L K L K G R P I 350
  1051 CGT GTA TCC TAC TGC AAG TCT CAG ACC AAG ACT GGG ACG CCT GCG AAC CGC AAG AAT CGA GGT GTT GCT GCT AAA 1125
  351 R V S Y C K S Q T K T G T P A N R K N R G V A A K 375
  1126 GAC GAC GCT GGA CAA CAG GAG CCC TCG ACG CCT CAG CGC AAG TCG CCT CGC TAC GAG CGC TCG AGT GGC GCA CCC 1200
  376 D D A G Q Q E P S T P Q R K S P R Y E R S S G A P 400
  1201 ACA CCC AAC GGC ACA TCG CCT CAT GCG ATT GGA AAG CGT CAA AGT ATG CTT CCT GGA GCA AAC AAG ATC GTG CCT 1275
  401 T P N G T S P H A I G K R Q S M L P G A N K I V P 425
  1276 GGC AGT CCT AGC TCT TTG CGC GCG GCT GGC GAC CCG GCT GAG ATT GCC AAA AAG GCA GAG CTC TAC GCC ACG CTC 1350
  426 G S P S S L R A A G D P A E I A K K A E L Y A T L 450
  1351 ACA AAG CAA CAG CGC AAG CAG ATG AAA AAG GAC GAT GCC GAC AGA GTC AAC CGT CGC ATG GCG AAG AAG AAC AAG 1425
  451 T K Q Q R K Q M K K D D A D R V N R R M A K K N K 475

1426 AAG CTA GGC GCG ACG CAG CCG TCC TTC GGT AAA TTG GAC AAG AGT CTG GCT GCC GAG GGA GCT AAA GCC AAG AGC 1500

```

476 K L G A T Q P S F G K L D K S L A A E G A K A K S 500
1501 AAA GAG AGG GTC AAA CTG AAG CAG CCG GGT GGT GCA GGT GTA CAC GCA GCT AAG CGC TTC AGG AGC GGT GCA GGC 1575
501 K E R V K L K Q P G G A G V H A A K R F R S G A G 525
1576 CCC AGT AGC TCT TCC GCT GCA AAA CCT CGG CCC AAG CCG AAA ATC TAG tgccagctacagccccatctacgaatccctttccaga 1659
526 P S S S S A A K P R P K P K I * 541
1660 tcacgagccaccccgattcgtctatttcattttcgttcgattcgtctgcatgcttcggttacgtgctgcgctcgcgtgtctgtgttgagtggtgcgacc 1759
1760 gtttgcattttgtacagcgttactaaagcaaacgacgcggttgcgtggtccacgctggacacgatagcatcaccatgctcgcacagtcgcgaccttg 1859
BamHI
1860 tgcgtacctcgtctctttgatccaccgcccaattctgtacactctaaggacattgcattgcgatgactacaaaatggtgcgaataactgcGGATCC 1955

pig6

EcoRI

-858 GAATTCttcggacaatcaaaactcgacatgtaacgtgtgagccaacgacgagtggtgca -801
-800 gcgcatggccaataaaagacggttcggtgtgtgctgttgaactcaatcggatcgcatgcagagatatggtcaacctaaagttataactattcc -701
-700 ttaaaaaacacacacatgccagcggcggaattgcaagtcctgatgaacaaatccgctcagagcccgtccgtttctttggccgcttgagccacacgtca -601
-600 cagttgagttttggtttacccttcacgcttcacgcttcacgctgcacgctgcacgctgcacgctgcacgctgcacgctggttccggtaaaattttgagat -501
-500 gcaaccacgcaatcacaacatcgttttgaacgtacacaacatgcgctttctgctgtgtattattcgtagctatactagcagtagtcacgaatcacga -401
-400 atcacaacatcacaacatcacaacagggtagcagggagtagcaacagtcacaacagtcgcccgaactgtgctgctgtggcattcaccgattccgggattg -301
-300 attggattccacgcttcggtaacggtgattcaccgattcaccgattgcttttgcggcctttggcccacagctcagaagttttccagagagcgc -201
-200 actgttttcggactcaattgagccatacgtctcctcgttcggcttacttcggtgctaccatctccatggctgattccggttgatcagcatgcaactcctcg -101
-100 ctgatagacaccacaagctataagagcaacactgcctggtgcactgttctctcgaagtcctcgatcctacgcttccaccaggaggccttagccctcga -1
1 ATG ACT CGT ACC GGT GGT TTT CCA ACA ATG TCG AGT CAT ACA CCT GCT GCT ACG ACA CTG TAT TCG CAG CAA CAG 75
1 M T R T G G F P T M S S H T P A A T T L Y S Q Q Q 25
76 CAA ACA CAC TCA CAC CCT GTC ACA TCC AAC TCG GTT GCA GAA GGC GCC AGC ACG CCA AAC ACC ATG ATG ACC GTT 150
26 Q T H S H P V T S N S V A E G A S T P N T M M T V 50
151 GAA GCG TCA TCC TCC AGA ACG CGC ACC GAC TCG CTC TCG TCG CAT CAC ACA TCA CCT GTC TCG CGC AGC ACC ATC 225
51 E A S S S R T R T D S L S S H H T S P V S R S T I 75
226 GTC GCC GAA CAA CAT CCG CCA GAA TTC AGC AAA GCG GCC AGA CAC GTC CCA GCA GAA TTG CGG TCT GCT GTA TCG 300
76 V A E G H P P E F S K A A R H V P A E L R S A V S 100
301 GAA CGA CGC TCC ACC ATT CCA TTC GAC GAT GAT GAT CAC GCG CAT ACC GAT CTA GAA AAA GTG GCG CAA GCC GAC 375
101 E R R S T I P F D D D H A H T D L E K V A Q A D 125
376 GAC CAC GAC AGT GTG ATC TGG GTC GAC TTC CCC GCA CAT GAC CCC GAG GAC CCT TTC AAC TTC AGC AAG ACG CGC 450
126 D H D S V I W V D F P A H D P E D P F N F S K T R 150
451 AAA TGG TGC ATC ACC ATC CTT GGC GTG CTG TTC ACC GCC GAA GTT GCA GCC ACC GCC TCC GCC TAT GTG CCT GGT 525
151 K W C I T I L G V L F T A E V A A T A S A Y V P G 175
526 ATC CCA TCG ATG GAG CGT GAT CTT GAC ATC ACC AAC CAC CAA CTC AGT CTG CTC GGC ATC GCC ATC TAC CCT CTG 600
176 I P S M E R D L D I T N H Q L S L L G I A I Y P L 200
601 GGC TTT GCC TTG CCT CCG CTG GTG CTC GCG CCG CTG TCC GAG GTG TTT GGC AGA AAT CCC ATG TAC ATC GTC TGC 675
201 G F A L P P L V L A P L S E V F G R N P M Y I V C 225
676 CAT CTC TGC TAT ACG GTG CTC TTC GTT GGG CTC GGA TTC GCC AAC AAC GCC GCG ACA GTC ATC ATT CTA CGA TTC 750
226 H L C Y T V L F V G L G F A N N A A T V I I L R F 250
751 CTG CAG GGC GCA TTT GGG AGT ACC GGA AGC ACA ATG GTG GGA GGA ACC ATC TCG GAT ATC TGG AAC AGC AAG GAG 825
251 L Q G A F G S T G S T M V G G T I S D I W N S K E 275
826 GCG GGT CAG CCA ATG GCG CTC TTC GCC ACA GCC GCC ATC TTC GGT ACC GGT ATT GGA CCT GTC TGG GCG GGC TGG 900
276 R G Q P M A L F A T A A I F G T G I G P V W A G W 300
901 GTG GAG CAG AAC ACG AGG CTA CAA TGG AGG TGG ATT CAG TAC ATC CAA GCC ATC TAT ACA GGC TTC ATC CTG TTG 975
301 V E Q N T R L Q W R W I Q Y I Q A I Y T G F I L L 325
976 CTT CTT CTC ATC TTT CTG CGA GAA ACG AGA GGA AGT ATT CTG CTG ACA CGT CGA GCC GCC AAG CTG CGC AAG ACG 1050
326 L L L I F L R E T R G S I L L T R R A A K L R K T 350
1051 ACC GGT GAT CCG AGG TAC AAG GCA CGA GCC GAA CTC GAA CGC TCT TCG TTG AGT GTG CTC ATC AAG AAC TCG CTC 1125
351 T G D P R Y K A R A E L E R S S L S V L I K N S L 375
1126 ACC CGT CCG CTC GTT TTT CTC ATC AAG GAA CCC ATC GTG ACG TTT TTC TCG CTC TGG ATC GCG TTC ACG TGG GGA 1200
376 T R P L V F L I K E P I V T F F S L W I A F T W G 400
1201 TTC ATG TAC ATG CTT CTC AGC TCA ATC GGG TTG ATC ACG GCA CAA CAT GGG TTT ACG CCG GGA CAA AAC GGA CTA 1275
401 F M Y M L L S S I G L I T A Q H G F T P G Q N G L 425
1276 GTT TTC TTG TCC ATC GCT GGC GCG GGC ATA CTG GGC AAC GTC CTG AAC CCA ATC CAA GAG TAC CTA TAC AGA AAG 1350

426 V F L S I A G A G I L G N V L N P I Q E Y L Y R K 450
1351 AAC TAC GCC AGA CAT GGA CCT GAA GCG CGA CTC TAC CTC GCC TGC GTT GGC GCC GTC TTC TTC CCC GTC GGC TGC 1425
451 N Y A R H G P E A R L Y L A C V G A V F F P V G C 475
1426 TTC ATC TAC GCC TGG ACG AGT TTT CCA CAC GTC TCA ATA GTC GGG CCT ATC GTA GGA ATC GTA GTG ACA ATG ACT 1500
476 F I Y A W T S F P H V S I V G P I V G I V V T M T 500
1501 TCG GTT TTC CAC GTA TAC CTA TGC TGC TTC TCG TAC CTG GCA GAC TGC TAC CTG ACA TAC GCC AGT TCA GCT TTG 1575
501 S V F H V Y L C C F S Y L A D C Y L T Y A S S A L 525
1576 GCT GCG CAG AGC TTT GCT AGA AAT ATT TTC GGT TTC ATC TTT CCG CTC TTC GTC GAG CAA TTT TAT CAC CGC CTC 1650
526 A A Q S F A R N I F G F I F P L F V E Q F Y H R L 550
1651 GGT TAC CAA TGG GCT AGC ACA CTT TCT GCG CTC TTG GGA GCT GTC TTG GGC GTC GTA CCT TTC ATC CTC TTT TTC 1725
551 G Y Q W A S T L S A L L G A V L G V V P F I L F F 575
1726 TAC GGC AAG AAG ATT CGC GCC AGA AGC AAG ATC AGC CAG GCA CTG CAA AAA CAG CAT CAA GAA CAA CAG CAA CAC 1800
576 Y G K K I R A R S K I S Q A L Q K Q H Q E Q Q Q H 600

BamHI

1801 AAG TCT TAA gctagtctaacttcgtcactGGATCC 1831
601 K S * 603

npil

PstI

-317 CTGCAGggtccacccca -301
-300 cgTcaattcatgaacggtgaatccgcactttgacggcacttgagcagcattcgtgattatggcatgattagacctgactagcgttgcttgctaaggg -201
-200 tgcagcctgacaccagatgcatcctctattacataatgatgacattattaccggtggttggcttttttcgctcaactcgttggctgagcttcgctccac -101
-100 attcgtgattcacgattgatgatcctgctcagagtgttttcgctgcttgcgttggctctatcatcgacaacattcatccttgccgaagcaagcaagt -1

1 ATG CAG CAG CAC ACT CTG CTA GTC GTT GGA GGG GCT GGC TTC CTC GGC AGT GCC ATC TCG AAG GCT GCA CTT GCC 75
1 M Q Q H T L L V V G G A G F L G S A I S K A A L A 25
76 AAA GGC TGG CGC GTA CTC TCG ATC TCG CCA TCA GGA ACA CCG TAC CAC ACA CCC GCC GGC CAC CGT CCA GCT TGG 150
26 K G W R V L S I S P S G T P Y H T P A G H R P A W 50
151 TCG TCT AGC CCT AAC ATC GAA TGG CAT GCG GCT GAC GCG CTC AAT CCT TCT TCT TAT GCG CAT CTA GCA GAT CGG 225
51 S S S P N I E W H A A D A L N P S S Y A H L A D R 75
226 GCT ACT GCT GCT GTG CAC ACG GTT GGC ATC CTT CTC GAG TCG GAT TAC AAG TCA AAA TCG TCG CAG GCT TTG CCC 300
76 A T A A V H T V G I L L E S D Y K S K S S Q A L P 100
301 ATT CGC AAT GCG ATC GCC GGT ATC GCC AGA GGT TGG GGC TGG AAC CTT AGC GCA ACA AAG GCT GAT GCG AAC CCG 375
101 I R N A I A G I A R G W G W N L S A T K A D A N P 125
376 CTA CAT GAC GCC AAG TAT CCG GGC GCG GAT GCT GCA CCT GCG TCT TCT TCG TCT TCT GGA AGC TCA TCC AAG TTC 450
126 L H D A K Y P G A D A A P A S S S S S G S S K F 150
451 AGC TAC GAG CAC ATG AAC CGA GAC AGC GCA ATT GCG GTT GCT CAC ACT TTC CTC TCT TCG TTA CGA CAT CGC TAT 525
151 S Y E H M N R D S A I A V A H T F L S S L R H R Y 175
526 TTC CAT TCG ACT GGG ACG CTG AGC TCG GCA GCC AGA TCA GAA CCT GCG CCA TTC ATC TAC ATT TCG GCC GAG GAT 600
176 F H S T G T L S S A A R S E P A P F I Y I S A E D 200
601 CTC TTT CGA CCT GTG GTG GAT GCA AGG TAC ATC CGC ACA AAA CGT CAA GCC GAG TCA GCC ATT GCA CGC CTT GCA 675
201 L F R P V V D A R Y I R T K R Q A E S A I A R L A 225
676 TCT CAC CAC CAA GCT CCT CGA CCT CGA AGC TCC TCT GAA CAA GAT GCG CGT ATC ATC TTT GAT TCG GAC GGC GCA 750
226 S H H Q A P R P R S S S E Q D A R I I F D S D G A 250
751 GGT CTG GAA GCT GAA CTT CAC GAT GAG CTC ACG TCC GAC TCA TCT GAT GTG CAT GGC TTT GAG GAT CGC GAT ACA 825
251 G L E A E L H D E L T S D S S D V H G F E D R D T 275
826 CAG TCG AGC GCG TCT CAG GGT TTG GTG CGG CCC GTG TTC TTG CGA CCG GGA CTC ATG TAT CAC CCG CAC ACT CGA 900
276 Q S S A S Q G L V R P V F L R P G L M Y H P H T R 300
901 CCT GCT TCG ACA CTA CCC GCT GCG ATC TTG GAG GCG TCA GCT GCG CTC CAT CGC TCT CCA CCG CTG CCG CTT CCC 975
301 P A S T L P A A I L E A S A A L H R S P P L P L P 325
976 ATC CCG ACC CCG GCA CAG CTG ATC GCC AAG CTT GGG AGT GGC GGC AGT GCA ACG CAG TCG ATA GCA CGT CTG CTG 1050
326 I P T P A Q L I A K L G S G G S A T Q S I A R L L 350
1051 ACC ACG CCA CCA TTG CAT GTC GAT ACG GTG GCC AAA GCG GTG TGC GCT GCT ATC GAG GAT GAA AAT GTA TTT GGA 1125
351 T T P P L H V D T V A K A V C A A I E D E N V F G 375
1126 GCG GTG GAT GTG TAC GGT ATT CGT AAG CTT GCT GGC TGG AAA GAC GAT GCT TCG CTT GGT GCC AGT GTC TAT GGT 1200
376 A V D V Y G I R K L A G W K D D A S L G A S V Y G 400
1201 GAG AGC GTA GTG AGC GGT GCG CGT ACG GGA CGA CCA TGG CCG TCG AAT CAT CAG CAA GCC GCT GCA CGC TGC TTC 1275
401 E S V V S G A R T G R P W P S N H Q Q A A A R C F 425

601 ATG ATG ATC TCG GCA GAG TTT GAT CGT ATG GGA ATG GGC AAG TAT CAG ATC TGC ATC TGG GTT CTG TGC GGA TGC 675
201 M M I S A E F D R M G M G K Y Q I C I W V L C G C 225
676 GGC TAC TTT ATC GAC CTG TTG TGG GCG CAA GCG CTG GGC TTG ATT GTC ACG CAA GTG GCG TTC GAG TTT GCT GAC 750
226 G Y F I D L L W A Q A L G L I V T Q V A F E F A D 250
751 GAG ATC GGC GGC AAA ACC GGC CCA CTT CAG ACG GCA TTC TCG ACA GGA CTC ACG GTG GGC GCC TTC TTC TTC GGC 825
251 E I G G K T G P L Q T A F S T G L T V G A F F F G 275
826 TTT GCG GTC GAC GTA GTG GGC CGA CGA TGG AGC TTC TAT CTG ACG ACG TTG ATC GCG TCG ATT TTT GGG ATT GCC 900
276 F A V D V V G R R W S F Y L T T L I A S I F G I A 300
901 AGT GGA GGC GCA CGC AGC TTT GAT GGT CTC TGC GTG CTG TCG GCT TTC ATC GGG TTC GGT ATC GGT GGC AAT ATT 975
301 S G G A R S F D G L C V L S A F I G F G I G G N I 325
976 CCG ATC GAC GCG ACG ATC ACG TTG GAG TTT CTG CCC ACA AAT CGA CGC TTT CTC GTG GCG GCG CTA TCG CTG TTT 1050
326 P I D A T I T L E F L P T N R R F L V A A L S L F 350
1051 CAG CCG TTG GGG GTG CTG GTA TGC TCG GGC ATC TCG TAT GGA CTG ATT CCA AAG TAT GCG TGC GAG TCG GCC GAG 1125
351 Q P L G V L V C S G I S Y G L I P K Y A C E S A E 375
1126 ACG TGT ACG CGA TCG AAC AAC ATG GGC TGG CGA TAC ACA CTG TAC ACA CTC GGC TGT ATC ACC TGG CTC ATC TTT 1200
376 T C T R S N N M G W R Y T L Y T L G C I T W L I F 400
1201 GTG GCT CGA TTC TTC ATC TTC AGC TTC CGC GAG TCG CCG CAG TAT CTG CTG GCA CGT GGA AAG GAG GCT AGA GCG 1275
401 V A R F F I F S F R E S P Q Y L L A R G K E A R A 425
1276 CTC CAG ATT ATT CGG CAG ATT CTG CAT ACG AAC AAG AGC AAG ATG GAG CCG CTC TTT ACG CAG GCT GAT TTC CAG 1350
426 L Q I I R Q I L H T N K S K M E P L F T Q A D F Q 450
1351 GAG GCG GCG AGA CGG ATT GCA GAG CAC CAA GGC GGT GAA TAC CTG GTG GAG CCA GAG GAG CAA GAG CGG CTG CAC 1425
451 E A A R R I A E H Q G G E Y L V E P E E Q E R L H 475
1426 GGC GGT GCA CTC AAG ATG TCG AGG TGG GAG ACG GCC AAG AAA TCG GCC AAG GAA ATG GCG TCG CTC TTT CTG AAT 1500
476 G G A L K M S R W E T A K K S A K E M A S L F L N 500
1501 GCA AAG ACG TTG TTT CGG AAC AAG ACG ATG GCG AGG GTA ACT ATC ATT CTT TGG CTC ACG TTT ATT GCC GAC TTT 1575
501 A K T L F R N K T M A R V T I I L W L T F I A D F 525
1576 TGG GGG TTT ACG CTC GCA GGT TTC TAC CTG CCT CAA ATC CTG CGC GCC AAG GGA GCC GAG CAG GAC ACG TCG ATC 1650
526 W G F T L A G F Y L P Q I L R A K G A E Q D T S I 550
1651 TCG ACG ACC TAC CGC AAC TAC ATG CTG GTC TAC TTT CCG GGC ATA TTC GCA GTG GCG CTG GGT GCG GCG ATG ATC 1725
551 S T T Y R N Y M L V Y F F C G I F A V A L G A M I 575
1726 GAA GCG CCA AAA GTA GGA GCG CAA TGG GCC ATG GTG GTA TCA TCA GGC TTG ATG GCC GTT TCG TTC TTC CTG TTC 1800
576 E A P K V G R Q W A M V V S S G L M A V S F F L F 600
1801 ACG ATT GCC AAA GAT CAG ACG GGC AGC GTG GTG CTG AAC GCG GTC GAG TAC TTT TTC CAG AGC CTG TTC AAC AGT 1875
601 T I A K D Q T G S V V L N A V E Y F F Q S L F N S 625
1876 ATT CTG TAT GCT TTT GTG CCA GAG ATC TAT CCA TCG CAA GTC AGA GGA ACA GCG AGC GGA CTG GCA TCG ACG TTG 1950
626 I L Y A F V P E I Y P S Q V R G T A S G L A S T L 650
1951 GGA CCG ATC GCG GGC ATC ATA GCA CCG CTC GCA GCC GAT CCG CTG TTC GCA GAT CAG ACG GAA CAG CAA GCG AAG 2025
651 G R I A G I I A P L A A D P L F A D Q T E Q Q A K 675
2026 CAC GTT CTG TAT CTA GCG GGT GGG GTG ACG CTG CTG TGC CCA ATA GCG CTG GCG TTG CTG CCG TAC GAT ACG AGG 2100
676 H V L Y L A G G V T L L C P I A L A L L P Y D T R 700
2101 GGG ATG CCG GTG TAC TAG gtgggtgttggcgagcagtgaggcaagagcaaaacatgacagagaaagatagataccatgccaagcacaaccacg 2194
701 G M R V Y * 706
2195 aacgcaacatgcaccaggcactgaggcactgatgatcgtgttacagtgtgaccgcaagcgcaatcgtgaatcgtgaatcgcgaataggtcagcagcatct 2294
BamHI (REMI-Insertion und bis NcoI REMI-
"rescue")
2295 cacatcttggtaacttatatttgaattaacagaggtggtaaatagagtcacagagtcgCGATCCagagcggacataaattataagttagtgtgagc 2394
2395 ttggatgaatgcagaccggagcggcgagggcaagcgctgttagctgctgctcttctttatgcatcctgcccagtcacagattgtcacaagtcacgagag 2494
2495 cgctaactcacgacttactgtagctcttctgctgaacaacggtgaaatgaaaacaaaacccaaacccaaacccaaacccaaacccaaacccct 2594
2595 ttccgacttgtgagtttttcaattttctctcttcaatgcttcacagtaacaaacaaaggtgattttctgatcgtatgatatttggaaattccgaatcgt 2694
2695 gaatcacgaatcggttgtgctatcccgtttgcatgcaacgtgcaacgtgcaacagcaggtgaaacgggtgcctctagctctcttcagctgccgctgttcg 2794
2795 gcgctgtgacaggtaatcacagaatgagagataagtgtagggtaactataagtcggcctcaagtcctttttctattaataactttgtggtcctttgttta 2894
2895 atttcaaccaatcacgaatcacgcttttgagccataatgttgactgtttgtgtgaccacaatcgtgaatcgtgaggcctcctcttttacagcca 2994
NcoI
2995 cgagttggcttggctgtctttgcaactgtcaatcacgaatgtgctgcatcgtcaagccgtcgtatccgatccgatgcaagCCATGGcagtcactgtggt 3094
3095 gccaattcaactggcaaacccggcttttcaataagagcggtgtgatgcatattgacgctctgtgattcacgatggtcaattcggctgccccattt 3194
3195 gttataagttaagttagatttcatcttgggttttgggtgtgctggagtcgaatgaaataagttagctggaatcacgaatagcaggtctcagct 3294
3295 tggatctcagttgaggtttcggggctgttctgctgctgctcagctgaggtgctctgacacaggtacgagaaatcaactcgcgcgcat 3394
3395 gttggtcccttccgtcttttctgtgtttttcttctgctcttggcctgttggctgctgattctgattctgtacagttcaatcgtgacctgtctgtgag 3494

3495 tatcgccccagtttccgtgttcgagcagttgagcagacatgttcccttgaacttggcagaaatgcagattagcgaatcacgaatgtcgaatacaatcgtg 3594
 3595 aatttgggtggtgaaagactcacgactgaaacgactgactgactgactgactgaccaactgactgacttctcagcatatcaacctcggtatctcaga 3694
 3695 ttccacattgtggagccatgcattcgtgattcacgattcacgactcgtcagcgttctcgcacatcaattcaatcaatcacgaatcaagccaa 3794
 HindIII
 3795 gttAAGCTT 3803

pig3

HindIII
 -1067 AAGCTTgagcgtgcctcgtcctcttttctcgtgccaagccatttcacgatttcaaacctctctccctct -1001
 -1000 ctgatcttctgcttcttctgctgctgcttattcatcatcattatcatcatcatcgtcgtcgtcgtcgtcctcattcttctgctgtacatcaatctgcgggttgt -901
 -900 tcatccacgcccgtccgtacaccagcgaacgcttctcgtaccaagctggtaagcactgctctctgttccgagcactcttgcgtccgtacaccgtccttcc -801
 -800 aaccgcttgcctcgtcgtcgtcctcagctcctcgttctcatttctactaccaacgctccgtgactacgcgttccatcagcaacgcttgccttgaatctggac -701
 -700 cccgtttccatcagactcagccttcagcgtgtccgagctcgcgtcccgaaccagcctcttctcgtcttcttccaatcaacttgttccgtaaggcttac -601
 StuI
 -600 catcgcacaacAGGCCTagtctttcaacgcaaaccttgcctcgtcgtggttgcagagctccagcaacgctctatccaaccaactagcccagcttcat -501
 -500 tttagcatcacatccgctgacccaccctcagagcacatttctcctttgctttcaactcaaacgcacatcctcataatcctttcatctcagccgct -401
 -400 cgcacctcttgcagaagccttggctcaaccatccgtaactcgtcgcgattgagcagaaccgaatccccagtagctttaccacactctgcctcagctcct -301
 -300 cgacccccccccgtaaacctctctggtcggactctgactctggctcagctcgcgtgcatctttctatcccgttctcctccccatcaacctcagcgc -201
 -200 catcgtactctggtccacacactagctccgcttctttggcgcagtgctgatcggtttgatcctacatcaccgcatcccgatcccgctgatcgggtcggca -101
 -100 tcacctcggacaacagttcttctgtaaccgctgtctacaccgctcctcctcgcacactcagtagaatttagacgtccggcccgggataataag -1
 1 ATG GCT TCT GCG CCA ACA CCA GCT CCC TTG CCC ACA CAA CCT TTG CTT TCT CAC TTG GCA AGA TCC ACC TTG GGT 75
 1 M A S A P T P A P L P T Q P L L S H L A R S T L G 25
 76 GCT GCA TTC GAT CCT CGT ACC ATC TCT GCT TTG CCC TCG CCA TCC TCT TCC TCT CGG CCT GCT TCC ATC CAC CAC 150
 26 A A F D P R T I S A L P S P S S S R P A S I H H 50
 151 CGT GCC CAC GTA CAT CAC CTC ACC ATG TCG CCC TCG CCT TCG CAT TCC TTT GCC GAG AAT CCA CGC GCA TTC AAC 225
 51 R A H V H H L T M S P S P S H S F A E N P R A F N 75
 226 AAC ATC TCT TCA GCA TAC AAC AAG CGC AAC GGC ACC CCC AAC ACT GCC ACC ACC TCT CGA ACA GCC TTG GCC TCG 300
 76 N I S S A Y N K R N G T P N T A T T S R T A L A S 100
 301 GAC GAG GCG CTA CAG CAC TCC TAT GCA GCT CGC AAT TCG CCT CAG CGT ATG CCT TCG CAT ACC GCG CCT CTA CCG 375
 101 D E A L Q H S Y A A R N S P Q R M P S H T A P L P 125
 376 CCG CAC CGT CCG CTT GAT CCC ATC CAG AGT CGC GTC TAT GGT CTC ACA GCA GAC TTG CGT GAG CCC AGC ACA CCG 450
 126 P H R P L D P I Q S R V Y G L T A D L R E P S T P 150
 451 GCT GTC CAC GCT CCA GCA CTC GAC GAT GCC ACC CGC ATG GCG CGT CTG CTC AAC GAG CAG AAA CCC AAC TTT AGC 525
 151 A V H A P A L D D A T R M A R L L N E Q K P N F S 175
 526 GTC GAG GTC TTT GCC TCG TCC TTT GAT AAC CGT GGC TAT CCA GTC ATC TCG GGT CGC GCC GCT ACT GTA CGC GGA 600
 176 V E V F A S S F D N R G Y P V I S G R A A T V R G 200
 601 ATT GTA CGC ATG CCC GCC ACC GGC TGC RAC GTT CTC ATG ACC ATC TCG GCG CAT ACA ACC TCT GGA TCG CCC 675
 201 I V R M P A A T G C D V L M T I S A H T T S G S P 225
 676 GCA GCC GTG TGG CAA GGC ATC GCA CTG GCA CCC TAC TCG GCC GGC GGC GAA AAG ACT GTC TTT GAG ATC AAG GAT 750
 226 A A V W Q G I A L A P Y S A G G E K T V F E I K D 250
 751 CGT CTT GTC GCC AAT TAC GAC CTT GTC AGG CCA CGC GCC GCC TAT GCA CCC AAG AAC GAA GAG ATG ATG GAG CCG 825
 251 R L V A N Y D L V R P R A A Y A P K N E E M M E P 275
 826 CCG CAG CTC TCC CAG GAT GAT CTC GTG CTA CCC ATC CCT TTC CAA GTC CAG TTG CCA CTC GGC AAA TCC ACG CGC 900
 276 P Q L S Q D D L V L P I P F Q V Q L P L G K S T R 300
 901 TTC ATC GAC GGT GAA ATG CAG GCT GTC CCC GTC TCG CTT CCA CCC AGC TTT GAG ATC AGC TCG AAA CAC GCT GCG 975
 301 F I D G E M Q A V P V S L P P S F E I S S K H A A 325
 976 CAG GAA AAG CGC GAC ATA CGT TTG GCG ACC AAG GGC AAG GCC AAA GTG CCC TTG GCC AAG GAA CTC ATC GAA AAG 1050
 326 Q E K R D I R L A T K G K A K V P L A K E L I E K 350
 1051 GGT TTC AGC AAG GTG TAT CGC ATC GGC TGT TAC TAT CAA GTC ACC TGG ACC CTC ATT CGA TCC AAC AAG GAC AAG 1125
 351 G F S K V Y R I G C Y Y Q V T W T L I R S N K D K 375
 1126 TCG AAA AAG TTT TCG AGC AAG TCG TCC AGG GAA CCT GCC GAG GGC GAC TCG TTG ACG CTA CCC TTT ATC TTT CTC 1200
 376 S K K F S S K S S R E P A E G D S L T L P F I F L 400
 1201 GGC GAG CCA ACG AGC CTG CCA CCT CAT CCG CCT ACC TTG CCA TCT TCG ATC AGC CCA GAT GTA TTT CTG CTC CCA 1275
 401 G E P T S L P P H P P T L P S S I S P D V F L L P 425
 1276 GAC ACA ACG TTG GGC GAT CAG TGG ACT CTG CAT CGA TCC CAA GCA AAG TGG TCC GGA TCC ATG TTG AAA GCG TCT 1350
 426 D T T L G D Q W T L H R S Q A K W S G S M L K A S 450
 1351 AGG AAG ACG GTC GAG GTG GAG CTC CAC ATG CCC AAT CCA CCC GTG CTC CAG GCG CCT TCA GTG TTG CCG TTG ATG 1425

451 R K T V E V E L H M P N P P V L Q A P S V L P L M 475
 1426 GTC GTC TTG CGA CCC ACT GAT CCG ACG CTG CTC TCG AAC GTG CGC ACA AGA GCT CCG AGC GAG ACC TCG ACA GCG 1500
 476 V V L R P T D P T L L S N V R T R A P S E T S T A 500
 1501 CCC GGT TCT CCT GCC GTT GGA CAG GTC GAC GAC CCC ATC GAA AGC ATG TCT TCC CCC ACC ATG GCC TCG ACC GCG 1575
 501 P G S P A V G Q V D D P I E S M S S P T M A S T A 525
 1576 TCC ACC ATG GCT GCA TCG CCG CCT TTG TCT CAG CCT TTG CAG CAG CGC GAT GCT GAC ACC GAA TCG ATC AAG ACA 1650
 526 S T M A A S P P L S Q P L Q Q R D A D T E S I K T 550
 1651 TCA CGC AGC ATC ATG TCG AGA TTC ATC AAG CCT TCC GCC AGC TTG GCG CGC TTC CCA GCC TCG TCC TCT CGC AAG 1725
 551 S R S I M S R F I K P S A S L A R F P A S S S R K 575
 1726 GGA CCA TCG AGC ATT TTT AGC GGT CGA CGA CCC AAC ACG GCT CCC AGC TCC GGT AGC TCC GAG ACG GGC ATG ACG 1800
 576 G P S S I F S G R R P N T A P S S G S S E T G M T 600
 1801 GAT GCC ATG ACC GAT CGA ACC TTT GTT GCT GCA GGT GCT CTT CCA GAT CTG GTG AGC TTG GTG TGT GTC TCG CTG 1875
 601 D A M T D R T F V A A G A L P D L V S L V C V S L 625
 1876 ATT CAG ACG ACG TTT AGC AGC AAC GAC AAC ATC AAC GAT GGA CCA GAA CAT CGC AGA AAG TTG CTC TCC GTC GCC 1950
 626 I Q T T F S S N D N I N D G P E H R R K L L S V A 650
 1951 GAT CTC GAA GAA GTG GAC GTG CAC GCG TTA CTC GTC AAC TCG GAC TCT TCG GGT AGC CAG GCA GGT TCT CGA CCG 2025
 651 D L E E V D V H A L L V N S D S S G S Q A G S R P 675
 2026 GGC TCA AGC AGG TCG CCG GAA GAC ATG GCG CAG ATC AAC GAG GCG GCA GCC GCT GCG AAA GCT GCC GTG CGT 2100
 676 G S S R S P E D M A Q I N E A A A A A K A A G V R 700
 2101 GTG CTG GTG GGC TCG TTG AAG GTG GCC GGC AGC ACA CCG CCC AGT TTC CGC TGT CAC GGG TTG GAA GTC AAG TAT 2175
 701 V L V G S L K V A G S T P P S F R C H G L E V K Y 725
 2176 GCG CTC AAG GTG GAT CTC TTG CCT GCG AAT CCG TAC GGC GGT AGC GAT GGT GTA GAG AAG GCG ATG CGC AGT CTA 2250
 726 A L K V D L L P A N R Y G G S D G V E K A M R S L 750
 2251 GGT ATC GGT GGT AGA AGT CGT GGA TTT TCG GAT GGC ATA AGC ACT ACA GCT TCG ATG CAC ACA CAG ACG CAG TTC 2325
 751 G I G G R S R G F S D G I S T T A S M H T Q T Q F 775
 2326 ACT TCG CTC TCT GGC GAT GCA AAC AGC CCA CCG ACG ACG CCG CCG AAC CTC ATG TCG CCA GTC ATG TTT GGC ACG 2400
 776 T S L S G D A N S P P T T P P N L M S P V M F G T 800
 2401 CGC TCG CCC GAA GGT CCT GCT TCG CGC GCG TTC TCG CGC ACC ACC GGC AGC CGA AAC GCG TCG CCT CTG AAT GGT 2475
 801 R S P E G P A S R A F S R T T G S R N A S P L N G 825
 2476 CAG AAT GTC GGA ATG GCC ATC TCT ACG ACG GAA AGC GCA ACT GCC GAC GCA GCT GAA GCA CAG GAA CAT 2550
 826 Q N V G M A I S T T D E S A V T A D A A E A H E H 850
 2551 GGA CGT GCG CCC ATC GCA CCT TAC CCC AAC GCC TAC CCG CAA CAC CAG CTG CCA CAG CAG ACT ACT AGA CCA ACC 2625
 851 G R A P I A P Y P N A Y P Q H Q L P Q Q T T R P T 875
 2626 GCG TCC GTC TAC AGC TCT GTC AGG TCA GGC TGG GGA AGC GCC TCC ATG TCT GAC GCT TCA GGC ATG CAG AGT AGC 2700
 876 A S V Y S S V R S G W G S A S M S D A S G M Q S S 900
 2701 ATC TAC ATG AGC GAA TGG GGT AGG GAC AGG AAG ACC GTA AGC AAG ATC AAC AAG ACC ATC GGC GAG ATG TGG CTG 2775
 901 I Y M S E W G R D R K T V S K I N K T I G E M W L 925
 2776 GAT ATA CGG CTG GTC AGG GGA TAT GGC GCG TAT TGA gtctagctcgaatggcgggtgttgaccccgacaagcggtcgaaacatggtcgc 2863
 926 D I R L V R G Y G A Y * 937
 2864 gtttgcgtcaatctaatacagttacagttacagttgctatagcataaatgtgatttggcgtcgttttcagagaggatcagctgtttcgagagcttgt 2963
 2964 aagcgtggacctgtgagctctgtgagctgtgagttggatgagctctcgtgcagctagcttaacagagcaactctatcagcacgcagccgaaaacgcacg 3063
 3064 accaacacagaggtgttcaacattcagatattgtcctaagtgtgactaagctaggttacgagttgtctgcggttatcaagtcatttgcacatgacttg 3163
 3164 ctatgaaaccagctctgtgaaaggccgatagttacacttgttacttgcgatgaaaccagactgtgtaaggctgatagttacacttgttacttgcctat 3263
 Homologie zu 5,8s rRNA
 3264 gaaaccagactgtgaaaggccgatagctataacttgttcgtaactgagtcATCTGCGGCCATAGAGACATGAAAATACCGGATTCGGTTCGATCTGCGCA 3363
 3364 GTCAAGCATGTCGTCGCCCTAGTCAGTACTGCGGTGGGGACCACGCGGAATCCTAGGTGCTGCAgttctctttttttttcttcttcttgaatc 3463
 3464 atcgacagattgttgcgccagcttcttggttgttggtagttccgcattgcttccgtttcatcccgttggaggcgtcacctttttcgcacacagatgtc 3563
 3564 gtctgctacgacgtcacgtggtccttcagacatctcaagtggataggggcatcagcttgtgtggtcctttaagcgggtcgtcttcttgcacgctcgc 3663
 3664 gtttgggtggcagaaaaactcaacacagcgcgatatactctccaaacagcattgctttacaagaagctacttagaccatggtctcaagcagctcacaat 3763
 3764 ccttgagagcataagggggcagacgggttcaacaagcattcggcttgcgagaatgtgatctctctagtacaaggggtgtaacaggggcaagcttag 3863
 3864 cggctttcgcactggccaagtgttcagagccgtgtaccggatgtccgagtcgaagtgaaggaagcgactttgacctcggctctgagcacaccacgcccgc 3963
 HindIII
 3964 tctgagcagtgagagatgcgccatcaacacaAAGCTT 4001

npi3

HindIII

```

-898 AAGCTTgcgtccacggtctgtgcacacgcactcagagtgtgcacctgccaatctcgaatcacgaatgcttcaagtgtcgatctgaacacaatcacga -801
-800 acccctcttgccacaaccaagagcctttgcagctgcccgcttggctcccgccactgcaaatgacgaacctgatgatgctgagagagagtgtctgtgc -701
-700 ctgcgctggagaagcggaagcgccatgaggagatactctgtcgctgttggggatacttttagataccgtcaacacgcagtatgactgaagagactgtca -601
-600 agaggcagcattttgttccttattccctttttgctcttctgttttctcgctgtgtgacacggaccatgaattcagttacgagccttagctgaagaagcgt -501
-500 tgaaaatgagcgctgcccctgtgtcctaagctacagtaagacggcttaaggtaaaacatactcgtgactgtgcttgaacacccctaactcgtgattgagt -401
-400 gccaaagtgcgtcacacggcgcgctgtgtgcagcaagaccctggattctccattctccacatgaattcatgattcgtgattgtgattttcgtggaagca -301
-300 tcacgcatggacacagccgacgagagctaaactcacgatgtgactcactcgtgacttttgactgctcaagagcggcagagaccagaaaatcgaggaaaag -201
-200 caccttccaaaactcacagccaatccacacttgacaggctccacgctcacacgtcactttcgactgagcttcaacgtcacttataataaggcagatcatc -101
-100 caccatgctccatccaagtcacctcactgtcgatcgcatcgctgtcagccgctccatagacaaaagttgctgtttccctgcgagcaagacctgacaca -1
  1 ATG CCC ATG TCG GTG CAG AAC CCA CTC GAA CTG CCA CTG CCT GTG GTG GTG GAT ACT CTA CTA CCT ATG CTA TCG 75
  1 M P M S V Q N P L E L P L P V V V D T L L P M L S 25
  76 GAT CGC GAC TTG GCC TCA CTG CGA TGC GTC TCC AAG CAT GCC AAG TTG CTT GTC GAA GAC GAG GTG CTA TGG AAA 150
  26 D R D L A S L R C V S K H A K L L V E D E V L W K 50
  151 CGC AAA GTG CTG GCC GAC TTT ACT TTT CCC GCG TAT GCA ACT GCT CGT ATG GGC GGT TGG TAT CGC CTC TAC ACC 225
  51 R K V L A D F T F P A Y A T A R M G G W Y R L Y T 75
  226 GGA CTC AGC AAC CCT GAC ATC TAT GTC TGG GGT CAG GAT AGC AAT GGT CGA CTT GGC ATC ACG AGA CAC GAG CGT 300
  76 G L S N P D I Y V W G Q D S N G R L G I T R H E R 100
  301 TCT CAA CAG ATG CGC GCC CAT CTC ACA AAT ATC AGC GCA GGT ATC CCT TAC CCG ATC AAG CTC ACC TCG AGA GTG 375
  101 S Q Q M R A H L T N I S A G I P Y P I K L T S R V 125
  376 CTT CGC GAC TCG GTG CAT CAG AAG GCC AAG AGC AGC CCG CGG GCG CCG TGG TCG AGA TCA TCG CCG AAG GTT GGT 450
  126 L R D S V H Q K A K S S P R A P W S R S S P K V G 150
  451 CAT TCC ATG CTC GAA CCT CGA CGG GCC AAG TGT GGG CTT GGG GCA CAA TGA ATG GTA AGT AAG CGC AAC TTC GAT 525
  151 H S M L E P R R A K C G L G A Q * M V S K R N F D 8
  526 CGA TAC CCT ATG TCA CCC GGG CAA AGT GGT ATC CAC GCC ACA GCC GAT AAA AAA TCT GCC GCC AAT CCG ATC GCT 600
  9 R Y P M S P G Q S G I H A T A D K K S A A N P I A 33
  601 TTC GGG CGG ACG CCA TCA CGC CGT TGC GCT GTC TCA TGA CAACCGGCTTTTGA ATG GTC AGC GTG GGG TAC CAT TTG 678
  34 F G R T P S R R C A V S * M V S V G Y H L 8
  679 GGA GCA CGT CGG CTT TCC AGC TCA TCT CAT CGC TCC TCC AAA CTC CAA GAC TAG CATCACAAGTCAGAACGACATTGTACC 760
  9 G A R R L S S S S H R S S K L Q D * 26
  761 ATCACCAACGTCAAACAGCTCGAAGCCGGGTGGTATTTCTCAGCGATCCTCACGCAGACGGGCGAAATCTGGCTGTGGCGCACAAATGGAGCCAAGCTG 860
  861 TTTTTCGCGGCTACCAGACGGCCGAAGAACCAGCGTCGCCCTCTGCGCCTGGCGGCCCCACACCAAGACGTGGCGACTCGATATCACTCCTGTTTCGATT 960
  961 GCCACCAATCGTCTCGACGCTGAGCAGCAAGAGCGAGAGCATCTTGCCAACAAGTCGTACAGATCGCAGCAGGAGAAGACTTCATCGTTGCTCTGACA 1060
  1061 CAAGCTGGAACGTTGCACAGACTCGAT ATG AGT CAC TAT CGG ACG CGG GAA GAG GAT GGT CTT GTG AAT CAA CAA CTT TTT 1141
  1 M S H Y R T R E E D G L V N Q Q L F 18
  1142 GAC CAC TTG CAT CGT GAG CAT CGT GAT GGT GTC GAG ACG CAT GCG CAG TCT GGA CGC TTG CTA GAT TTG ACG TCT 1216
  19 D H L H R E H R D G V E T H A Q S G R L L D L T S 43
  1217 CGC TTT CAC GTG TTT CTC GAG TCT CGA GCA AAG TGG GAG AGG CTG GCA GCT TTT GAA GAT CCA CAG GGT CTG CCG 1291
  44 R F H V F L E S R A K W E R L A A F E D P Q G L P 68
  1292 GGT TTC GAC TCT GCG TGG CTG AAA GAT GGG CGA GGA GCC CAA GGA AGC GTG GCG GCA TTT CGC ACA TTT CGG CGC 1366
  69 G F D S A W L K D G R G A Q G S V A A F R T F R R 93
  1367 AAT TTC GGA CAT TTG TCG TTT TCC ACA CTG TCA AGC CAG CCA AAC GGC CGC AAT GGC GGG ATG GGC AGC CAG CAG 1441
  94 N F G H L S F S T L S S Q P N G R N G G M G S Q Q 118
  1442 TGC TGG AAA CCG ACC AGG ACG CAC AGA cgcttgtgtgtggtggtcgtccatgctcgcgctctcccagctaatccacaactgcaggctcg 1532
  119 C W K P T R T H R 127
  NcoI
  1533 cgcgtaatacaagtgaCCATGG 1555

```

Mutante #1486

uat1

```

-3116 cgatgcatgccattct -3101
-3100 ggactttcgtttctgccatcacctccctgcttgacatgctctacattgtcaggtatcactgagaggatgacgcccgaaggtcaaaaaggcgtgattttgat -3001
-3000 gttgttgccatttagcagtcacagatctagtagtgggttggtagttcatcagctgctgcccgtcggtacgcacgtatcgtacggcagatgaagacggatag -2901
-2900 tcgaaatcagtcggccatctttagacgctgcttgtgcagagagcgttctgcattcacgattcgtttgcttctgcttgatccctggcgccgctcactttgt -2801
-2800 tcgcatcaatagaggaaaagccctgaogtacaacgcccattttcacaacaccctagccgagcagccaagataagaaggcgtgctgtgattggctgcy -2701

```


976 GAT GAG GAC CAG TGT GGC GAG TGG GCT TAC GAC TAC GCC TTT ATC AAC CGT GAT CTT GAG GGC AAC TAC AAG CCC 1050
 326 D E D Q C G E W A Y D Y A F I N R D L E G N Y K P 350
 1051 GAC CAC GGT CAG ACG CTC GAC ATC AAC GAA AAG ATG CCC AAC GTT CAT CAA ACC GAC TCG CTG CGC TCC GAA ACG 1125
 351 D H G Q T L D I N E K M P N V H Q T D S L R S E T 375
 1126 CAC GCC GAC TCG AGC CAA GAC AAC TCC AAC TCG CAG CTC GCC GCT GCC GAA CAC CAG TCT CCA TCC ACC GCT GAA 1200
 376 H A D S S Q D N S N S Q L A A A E H Q S P S T A E 400
 1201 CCA GCC GTG GAA ATG AAG CAG GCT TAA aagttgcaaagacgtcgttagagtgaagcgttcgaatgccaccaacacgtcgaccgtttccacg 1291
 401 P A V E M K Q A * 409
 1292 ctttctctttgatgtatataaccgttttcattcgttctctcgtttccatggaatcaactctaactgtacaattttgacctctgctaattggcgaccactcg 1391
 1392 tgacggcggtggccgaccagattcacgaacgaccaaaagaaacatcttctcgtcacttgcttcgctctctgcaatgcattgtttgttcaacgctttgca 1491
 1492 tgaccaacaatccgtcaatctcgccaacttcggttgacacagaacatgagatgctgaaccgtgaatg 1559

npi5

GCT TCT TGG ACC ATC TCG GAA TGG GCC GAA TAC TTT AAC ACG CCC AAG GAA AAG AAG AAA AAG ACG CTC AAC 75
 A S W T I S E W A E Y F N T P K E K K K K T L N 25
 76 GTC ATC TCG CTC GAG GTG ACA GGT ACG CCA ATG CAA GCC TAC GTC GAA GCG CCT CAG CTA GTT CGA GAT CTA GAC 150
 26 V I S L E V T G T P M Q A Y V E A P Q L V R D L D 50
 151 TGG GTG ACG CGC GAC TGG CCA GCG GAA CGC CGC GAC GCT TCG TGT TCT GAA AAT AGC TGG CCC AAG GTG CAG CGC 225
 51 W V T R D W P A E R R D A S C S E N S W P K V Q R 75
 226 TAT GTG CTT ATG GGT GTA GAA GGC GCC TAT TCG GAT TGG CAC ATT GAT TTC GCC GGA AGC AGC GTC TAT TAC CAC 300
 76 Y V L M G V E G A Y S D W H I D F A G S S V Y Y H 100
 301 GTC ATC TGG GGC CAA AAA ACG TTT CTG TTT GCT CCA CCC ACT GCG CGC AAT CTG GCG GCC TAC AAA GCA TGG TGC 375
 101 V I W G Q K T F L F A P P T A R N L A A Y K A W C 125
 376 AGC AGC ACA CGC CAG GAC TTT GAC TGG CTC GGC GAT CAT CTT CAC AGC CTC ACG CGC GTC GAC ATA GGA CCC GGT 450
 126 S S T R Q D F D W L G D H L H S L T R V D I G P G 150
 451 GAA ACC ATG CTC ATT CCA TCT GGC TGG TTG CAC TGC GTC TAT ACG CCC AAG AAC ACG CTC GTG GTA GGC GGC AAT 525
 151 E T M L I P S G W L H C V Y T P K N T L V V G G N 175
 526 TTT TTG ACC GAC TGG AAC GTA GCT ACG CAG TGG AAA CTC GTC GAG ATC GAA GAG GCT ACC AAA GTA CCC CGG AAG 600
 176 F L T D W N V A T Q W K L V E I E E A T K V P R K 200
 601 TTC CGC TTC CCC CAT CTC AAG CGT CTC AGC TGG GTT CGT GGC CAA AGG CTG GAA TGA tcgactcgagccgctggcaagaat 681
 201 F R F P H L K R L S W V R G Q R L E * 219
 682 tcgagacgctaac 694

Mutante #219

p219-15

abp1

CCG TGG AGC TGG TAC GGG TAT ACT GCC GCC GCA AAC GCG CCA CCT GCG CCT GTT GCT CCC CCC GCG CCC CCG 75
 R W S W Y G Y T A A A N A P P A P V A P P A P P 25
 76 GCA CTT CAT ACA CTT CCT GCA GCT GCA GCT GTA TCC GCA CCC GAG GAA GCC GAG GAA GAG GCG CCA GCT GCA CCG 150
 26 A L H T L P A A A A V S A P E E A E E E A P A A P 50
 151 CCC GCT CCT CCT TCT CCC CCT GCT CAT ACA GAG GCG GAT GTG GGA GGA GCT GCA GAG CAA CTA GAG TCG ACG CAT 225
 51 P A P P S P P A H T E A D V G G A A E Q L E S T H 75
 226 CTC TCT GCT GTC AGT GCT GGC AGC AAC AAG GGT CTA CGC GGT CGC GTT GCG TGG GCG TAC GAA GCA GCT GAA GAC 300
 76 L S A V S A G S N K G L R G R V A W A Y E A A E D 100
 301 AAC GAA TTG ACG CTT GTC GAG GGA GCG ATC ATC TCA CAC ATT GAA CAG ATC GAC GAA GGT TGG TGG TCA GGT GTA 375
 101 N E L T L V E G A I I S H I E Q I D E G W W S G V 125
 376 GAT GAG CAC GGT CAA GAG GGT CTG TTC CCT GCC TCG TAC GTG GAG CTG ATT GAA GGC GAG GCT GAG CCG GAA GAA 450
 126 D E H G Q E G L F P A S Y V E L I E G E A E P E E 150
 451 GAG GCC GCA CCG CCA GCA CCG CCA GCA CCG CCA CCT GCT GCT GCC GCT AGC GAG ACA GAA GAG CAA GAC 525

451 CTC GGC AGC GTC TAC CAT CTC GAC TGC TTC CGA TGC AAC GAC TGC GAC AAA GTC GTC GCC GCC AAG TTT TTC CCA 525
151 L G S V Y H L D C F R C N D C D K V V A A K F F P 175
526 GCT ACC GAC GAC ATG GTC GAC TCC TCG GGC ACA GGC CGT CTC TTT CCT CTC TGC GAG ACC GAC TAC TTT CGA CGT 600
176 A T D D M V D S S G T G R L F P L C E T D Y F R R 200
601 CTC GAC CTC ATC TGT GCA AAG TGC AGC GGT GCG CTA AGA GGC AGC TAC ATC ACG GCG CTT GGC AAG AAG TTT CAC 675
201 L D L I C A K C S G A L R G S Y I T A L G K K F H 225
676 GTC GAG CAT TTC ACC TGC TCG GTC TGC CCA ACC GTC TTT GGT CCT CAG GAT AGC TAC TAC GAG CAT GAC GGC AGT 750
226 V E H F T C S V C P T V F G P Q D S Y Y E H D G S 250
751 GTC TTT TGC CAC TTT CAT TAC AGC ACC CGC TTC GCC ATC AAG TGC ACA GGC TGC AAA ACG GCC ATC CTC AAG CAG 825
251 V F C H F H Y S T R F A I K C T G C K T A I L K Q 275
826 TTT GTC GAG ATC AAT CGC AAC AAC ACA GAC GAA CAT TGG CAT CCC GAG TGC TAC ATG ATC CAC AAG TTC TGG AAC 900
276 F V E I N R N N T D E H W H P E C Y M I H K F W N 300
901 ATC AAG TTG TGT CCC ACC GGA TCC ACT CCC AAA GAC GGC GCC GCA GCC GTG TCC GAA GTG ACT GCT ACC GAC AAC 975
301 I K L C P T G S T P K D G A A A V S E V T A T D N 325
976 GGA ATC GAC AGC CCC GCG CTG CAG CAC TCA GCC AGT CAA GGA GAC GCC GTC GAG TCG TCG CCC GGT CAA TCC GCT 1050
326 G I D S P A L Q H S A S Q G D A V E S S P G Q C S A 350
1051 CCT TCG CGC ACA GAG CCA TCT CCC GAC GCT ACC GAG ATC GAG GCC ACC GAG ACA CCT TCC AGT CTC AAG CAC AAG 1125
351 P S R T E P S P D A T E I E A T E T P S S L K H K 375
1126 CAG AAA CAG ATG GAG GAG CGC GTC TAC CGC ATC TGG ACC GTA CTT TCT GCC TTT GAA GAG AGC TCC GCA GCG TGC 1200
376 Q K Q M E E R V Y R I W T V L S A F E E S S A A C 400
1201 ATC TCT GAA ATG CTC CGC CAC GTC AGC AGC GGC CGC TAC CTC GGC GGT GTC AGG ATG GCT GAG AAG TTC ATC CTA 1275
401 I S E M L R H V S S G R Y L G G V R M A E K F I L 425
1276 CAT GTC GAG ATT CTT TTC TCT GCC ATC GAC GAC TTG GAG GCC AAC TTT CGC AAG GAA GAT GCC AAA GGC GTC TCG 1350
426 H V E I L F S A I D D L E A N F R K E D A K G V S 450
1351 CAC ATT CGT GAA GCC AGA ATG TTA TGC AAG AAG ATC GTC AAA TTC TTT TCC TTG CTT TCG CAC ACG CAG GAA ACA 1425
451 H I R E A R M L C K K I V K F F S L L S H T Q E T 475
1426 GGT GCA AGG AGG ATG GGC ATC ACT CAG GAA CTC CTC TCG CTC GTT ACG GGT CTG GCA CAC TAT CTC AAG ATC CTC 1500
476 G A R R M G I T Q E L L S L V T G L A H Y L K I L 500
1501 ATC CGT ATC GCC TTG ACG GGC GCG CTC AAG TTG GAC CGC GAG TTC AAC AAC GAA AGC GCT CTC CAT TGG TTC CTG 1575
501 I R I A L T G A L K L D R E F N N E S A L H W F L 525
1576 AGC CAG CTC GCC TTT TCC GCC AAG CTG GGC AGC ATC ACT GCC GAC GAC AAG CAG GGC ACG CAG CAG CCC AAC ACT 1650
526 S Q L A F S A K L G S I T A D D K Q G T Q Q P N T 550
1651 AAT ACC GTC GGC CCA GAC GGC AAA TGG TAT GGC TAC CGC TCC CTG CCC CGA TCC ACC AGC TCG GGC TCG AGC GAA 1725
551 N T V G P D G K W Y G Y R S L P R S T S S G S S E 575
1726 AAC GGC GAA GCA GCA ACC GAT CTT TGC GTT GCA TGT GGA TCC ACC GTT GAA GAA GAG TGC TTG CGT ATG GGC GTC 1800
576 N G E A A T D L C V A C G S T V E E E C L R M G V 600
1801 AAT CTG CGA TGG CAC TCC AAC TGC CTC AAG TGC TCG ACG TGT CAG CGA CCT GCT CTG CGT GAT GGA GCG TCG ACG 1875
601 N L R W H S N C L K C S T C Q R P A L R D G A S T 625
1876 CGC AAG CAA CCT GAC CCT GTA CCT GGT GCA CCG GAG CCA TTA CCA GCT TCG CAG TAC GGT CTC GAG TCC AAG CGC 1950
626 R K Q P D P V P G A P E P L P A S Q Y G L E S K R 650
1951 AGA CCG TCC GAG GGT AGC GCT GGT CTC AGC GGT CCG CGC TCG TTG TCT TCC AGC TCG TGG ACG TAT GCC TGC 2025
651 R P S E G S A G L Q S G P R S L S S S S W T Y A C 675
2026 TTC TGC CCC CAG TGT TCT GGC GGC TTA CAG CTC CGG ACA GGC TTT GAG TCG GTC ACA AGG CTG GAA CAA TAT GCT 2100
676 F C P Q C S G G L Q L R T G F E S V T R L E Q Y A 700
2101 TTC CTC TTA CGT GTT GCG CTC AAC CGC CTA TTT GCA TTG CTG CGC AAG CGC GGC GTT GTT CCG CCT TCG CCG CCA 2175
701 F L L R V A L N R L F A L L R K R G V V P P S P P 725
2176 GTT TCA GCG ACG CGT CAG GTG GGA GGA ACT GAC ACT TCC ACG CCG GGT GCT GCA TCG CCA GCT GAT GCC AAC AAA 2250
726 V S A T R Q V G G T D T S T P G A A S P A D A N K 750
2251 CAG GTT TCA ATG CAC GAG GCG TAC CGC AAC TCG CAA GAC ATC AAG CGA ATG AAG TCG GTG AAT CTA AAT CGC AAG 2325
751 Q V S M H E A Y R N S Q D I K R M K S V N L N R K 775
2326 TTG TCG ACC AAG GCA AAG GTG CCC CGC ATC TCT ACG GTG GTT GGC AGT CCG TCA GGA CCG CAA ACG CAA ACG TCT 2400
776 L S T G CAA AAA CAC TCT CCC TCC GAC ATT GGC CTG CAA ACC GAC AGC AGA CGT TCA CCT CGT CAA GCC AGC CCT 2475
801 D M Q K H S P S D I G L Q T D S R R S P R Q A S P 825
2476 GGC TCC TCG CCG AGG GAA CCT AGT TCG CCC TTC AAG CGT GAA GTC GGT TCG TCT CCA GAA ACC TCG CCG TCG AGT 2550
826 G S S P R E P S S P F K R E V G S S P E T S P S S 850
2551 CGG GCA CGA CAA GCA CAG CCG CCG CAA GGC TAC CAG CAG CAG CAG CAG CAA CAG CAA CAG CCG TAC AAA CAG CAG 2625
851 R A R Q A Q P P Q G Y Q Q Q Q Q Q Q P Y K Q Q 875

2626 CAG GTG TTC CAG CCG GTC CAG CAA CAG CAG CAT CTT CCG TTT GCA TTG CCT CCC CAG CAG CAG CAG CCT CCT CAG 2700
876 Q V F Q P V Q Q Q Q H L P F A L P P Q Q Q Q P P Q 900
2701 TTT GGC AGC GGC ACG TCC GGA CGT TCT GGA TCG CCC TCA AAC CTG GAG CCT GGC TCG ATT GTG CCG ATC CGA CCT 2775
901 F G S G T S G R S G S P S N L E P G S I V P I R P 925
2776 GCG TTT GCA CGC CAC AAT ACC GAC GTC AAG ATT CGC GAA GAC GGG CCT ATG CGA CAG CCT TCC GGC GAT GAA ATC 2850
926 A F A R H N T D V K I R E D G P M R Q P S G D E I 950
2851 CAG CGC GAG ACA AGG AGT GAG GAC GGC ATC ACG CTC GCT GAT ATC CCG CAC ATC TTG GAA GCC GAG CAG GCG CGC 2925
951 Q R E T R S E D G I T L A D I P H I L E A E Q A R 975
2926 GAG CAG CAC CGA CCG CTG CCA AGC GAA AGC ACG CGC TGC ATC TCC GAG TTG TCG GCT CTG GAG CTG TTT ATC GTC 3000
976 E Q H R P L P S E S T R C I S E L S A L E L F I V 1000
3001 AAG CAC ATG GCA GTC ATG TAC CTT CAG CAG TCG GCG CTG CGA GAC CAC GTC AAC CTG GAC GAT TTG ATC GAA TTC 3075
1001 K H M A V M Y L Q Q S A L R D H V N L D D L I E F 1025
3076 ATC GAG ACG CGC AAG AAC ACG TTT TGG GGC AAA ATC TTC AAG GGT GGC AAG GAC AAG AAG GAG ATC AAG AAA AAG 3150
1026 I E T R K N T F W G K I F K G G K D K K E I K K K 1050
3151 GGC GTA TTT GGC ATC CCT CTC GAG ATT CTC GTG GAA CGC AAT GGC GCC GAC TCA ACG CTG GGT GCT AGT GCA GCA 3225
1051 G V F G I P L E I L V E R N G A D S T L G A S A A A 1075
3226 CAT CTG CGC GTA CCT TCG TTC ATC GAC GAT VTG ATC TCG GCC ATG AAG CAG ATG GAT TTG TCA GTC GAA GGC ATC 3300
1076 H L R V P S F I D D V I S A M K Q M D L S V E G I 1100
3301 TTC CGC AAG AAC GGC AAC ATC CGT CGA CTC AAG GAG CTG TCC GAA GCG CTC GAC CGT GAC AGC TCG GCA GTG AAT 3375
1101 F R K N G N I R R L K E L S E A L D R D S S A V N 1125
3376 CTG CTC GAT GAC AAT CCG GTT CAG CTG GCG GCG TTG CTC AAG AAG TCC TGC GTG AGC TCC CGG ATC CGC TCA TGA 3450
1126 L L D D N P V Q L A A L L K K S C V S S R I R S * 1150
3451 cgttcaagctgcacaagctgttgcacatgtccaaaagctggaatccgaagcgaacgacgtcgcattctgcacat 3524

p219-13

npi4

1 ATG ACA TTC TCA ACC TAC ATG CGC TTG TCC GCT ACA AAC TAC CCC TCG ATC ACC TCG CTA GAT GCT GCC ATG CCT 75
1 M T F S T Y M R L S A T N Y P S I T S L D A A M P 25
76 CAT CTG TGC GAT CGA GCA GGC AAA GAG TTG CGC GCT GCC ACC TAC CGC CTA CTC CGC CAC GCT CTC ATA CAG CCA 150
26 H L C D R A G K E L R A A T Y R L L R H A L I Q P 50
151 CTT TCG CCG CTC GTC TCA CGC TGT CGC GAA AAG GGC CTC GAC ATT TAC CTC TCA CGT ACC CTC ATC CGT GAT AAT 225
51 L S P L V S R C R E K G L D I Y L S R T L I R D N 75
226 CGT TTT GAG CTC GAA AAG GTG CAA GCC ATC AAA CTC ATA CGA GCC ATC ATG GAG CTG GCA GCA CTG CGA TCC ATC 300
76 R F E L E K V Q A I K L I R A I M E L A A L R S I 100
301 ACC ACA GCT CCT GAT CGT CTC GCC CTC GAC TTG CAG CAA CTC GTG GCG CCC GGC GTA ATT CGT GCT CTC GCT GCC 375
101 T T A P D R L A L D L Q Q L V A P G V I R A L A A 125
376 GTC GCA GAG CAT TCC GAA GAC AGG CTC CGT CAC ATC TGC CTC GAA ACG CTC GCC GAG CTT GCC GTC TTT GAT CTT 450
126 V A E H S E D R L R H I C L E T L A E L A V F D L 150
451 CGG CTG CTC ATC AAA GCT GGT GGC CTC AGG GCC ACT CTC CAG GCG CTC ACC GAG GGC GCC ACC GAA TTC TCA CCC 525
151 R L L I K A G G L R A T L Q A L T E G A T E F S P 175
526 ACT TTG ATC CAG GTC TTC ATC TAC CTC GTT GAC ATG CCT GGC ACT CGT CAG CAT CTG CGT CCA GGT GTC GAT CTC 600
176 T L I Q V F I Y L V D M P G T R Q H L R P G V D L 200
601 GAA ATC GCC CTC TCG GGC TTC ACA GAG ACT CCG GTG CAG AAA CCC ATC ACC TAC GAT GCT CTA GTG CGA TCC ACC 675
201 E I A L S G F T E T P V Q K P I T Y D A L L R S T 225
676 GCT TCC GTC GTC ACC GTC CTC CTC CGC TCC TGG GCA GGT CTC ATC TAT CTG TGC ATG GAC GAC AAG CGT GCG ATC 750
226 A S V V T V L L R S W A G L I Y L C M D D K R A I 250
751 AAA TCG CTT GTC CAG GCG CTA CGT GTC AAC ACG CTC GAC GTC AAG AGC GTT CTA CTC GAC ATG CTC CAC GAC CTC 825
251 K S L V Q A L R V N T L D V K S V L L D M L H D L 275
826 TTC AAC GTT CGT GGC GCC ACC GGA CGA GTG GAT CC 860
276 F N V R G A T G R V D 286

npi4

```

1 ATG ATC CTC GCT CAC TAC GCC ATC ATC GCC GTC GGC AGC ATT GGT CGG CAC AGT CGT ATC GAC GAC AAA CCA TTC 75
1 M I L A H Y A I I A V G S I G R H S R I D D K P F 25
76 ACG ACT TTG CAG AGT CAG AGC TCG CGA CTC GAT CCC ATC ACC AGG CAA CGC TTG GCG CTC TTG CGA TTT GGC CGG 150
26 T T L Q S Q S S R L D P I T R Q R L A L L R F G R 50
151 CAT CGA ACC TCG ACG ACT CAG GGA ATC ACG TAT GGA CTC AAG CAC TTT GAC TTC CAT CTG TCA ATC TGC TCT TGC 225
51 H R T S T T Q G I T Y G L K H F D F H L S I C S C 75
226 TGT AAA TCG CTG CCG GCG GTG ATC GCG CTG TTG CTC GCT CGC TTG ACG ATG GAG TCG CTT CAG CCG CAC CAA GAG 300
76 C K S L P A V I A L L L A R L T M E S L Q P H Q E 100
301 GCG CAA CGC CTT CAG AAC CAG ATC GAT ATC GAG AAC AAG ATC AAG GAT GGC GCC GAA AAT TTG CTC AGT GTC TTT 375
101 A Q R L Q N Q I D I E N K I K D G A E N L L S V F 125
376 GAC CTA AAG CTC GCC TCC TCT GCA AAG CAA GAC CTT CGC AAG CAG ATC GAG TCT GAG CTC GAC TCG GCC ACC CTC 450
126 D L K L A S S A K Q D L R K Q I E S E L D S A T L 150
451 AGA ATC GCA TCT CTC ACC GCC GAG CTC CAA CGA TGG AAG CAA ACA CAC TCT ACC ACC TCG CCG CCT TCC TGG GCG 525
151 R I A S L T A E L Q R W K Q T H S T T S P P S W A 175
526 TCC AAT CCC TCC GCC TCC GAT TCA GAG TCT GCC TGC AAC ATT CCC GCT TCC ACC ATA TCC AGG CTT GAG CAG TCT 600
176 S N P S A S D S E S A C N I P A S T I S R L E Q S 200
601 GCA CTC GGA TTC GAG GGC CGT CCA TTG TTT GAG AGT GCC AGT GCC CAG TCC GGT CCC AGC CAT CAA CCC GTT CGC 675
201 A L G F E G R P L F E S A S A Q S G P S H Q P V R 225
676 AAC ACC AGC TAC GAC ATC CTT ACC GCC CAT CTC GAC CCC AGC AAT GGC TCT CCA CCT TCC ACC AAC TAT GTC AAT 750
226 N T S Y D I L T A H L D P S N G S P P S T N Y V N 250
751 GAT CTT GGC TCC CAC TTC CAC TTG CAT GCC TGC AGC GCC TTT TCC AAC TCT CGG CAT CGG TCT GGA CGG ACA TGC 825
251 D L G S H F H L H A C S A F S N S R H R S G R T C 275
826 TCC GCT TTC TCT TGC CGG TGC ACA GCC ATC ATC CGT CTC TGC GCT GCG CAC TCC CCT CGC CCA TCC GCC CTG CTT 900
276 S A F S C R C T A I I R L C A A H S P R P S A L L 300
901 TTC GAT CGT TAC TTT GTC CCT TCG ACT CAG CCG GCG CAG CAC ATC GAC GCA GAG CAT GCC CGA TCT CAC GAC CGC 975
301 F D R Y F V P S T Q P A Q H I D A E H A R S H D R 325
976 GAA GTA GAG GAT GCT CGC GCG TCA CGA TCT TTG GCT CTC ATG CTC ATT CGC TCC TTG CGC CCG CCA TCT CCC ATC 1050
326 E V E D A R A S R S L A L M L I R S L R P P S P I 350
1051 CCT CCA CCC GCA ATG CTG CCC ACT CTC TCA GAA AAT GCC GAC ACG TCC TCA CCA ACC GTT CAA ACT GGC CCC GCT 1125
351 P P P A M L P T L S E N A D T S S P T V Q T G P A 375
1126 GTC GTT TCT ACC GCC ACC GTT GAT CCA GTC TCG CCG CCC AGC TCG AAT CTC GCG CTG CCA CGT ATG GCT CGC AGA 1200
376 V V S T A T V D P V S P P S S N L A L P R M A R R 400
1201 ACC GTT GCA CGT TCC AGA GCA GCA GCC ATA GCT TCC GGC GCC TCT TCA CAC GCA CGT ACG CCC AGC AAC GCA ACG 1275
401 T V A R S R A A A I A S G A S S H A R T P S N A T 425
1276 GGT CTC GAC GAT CAA GCC AAG CAC AGA TCG ACC AAA TCA ATC GTC TCG TCG AC 1328
426 G L D D Q A K H R S T K S I V S S 442

```

pig2

BamHI (REMI-Integration)

```

-716 GGATCCgtgcccgcagc -701
-700 gaccacgcacgacagtcggttggttggttggtgctgcaactcaacacggggacccttgaactggagtatgcttttgccggggtaaagcgcctcg -601
-600 acgagctgctctccacaatcgtgaattcagtgattcagaattgtgatcacgtgaatcgtgctggaattctcagatttctgcccgttaattttgaaagac -501
-500 gcacacaaaatcacgagtcgtagtcacgtgaatcacgaatcgtgaatcgcgaatgctcgaagtcgtgagtggtatgtccccaaaagtcgcacaaatt -401
-400 aaaggctgccaaaatcacgaatcagaatcgtgaatgagtgaaatcagcaggaaaagtcacgagtcgtgagtggtgagtcggactgtaccacgactcagc -301
-300 actctgtgactgttctgtgagtcacagtgacgagtagtagtaagtcgtctcgtgctgtaagataaaagcagcattggacccttctgctcgcacat -201
-200 catccaatcaactcattcacattgcattcacattcgtggttcgcaaacgcttctcaacatctccatcacgacaacatcccacacagc -101
-100 aacaacgcagcaccgcacatccgcacctctgttggtgtgacgcaaatcctaccgactggcatctgtcagcacactcagcgcgccacgctgaccaacgt -1
1 ATG CCG ATG AGG TTT GCT CCG ACA TTC AAC CGC CTC GTC GCG AGC AGC TGC TCA CCC TGG CTT GCG GTG GCA GCC 75
1 M P M R F A P T F N R L V A S S C S P W L A V A A 25
76 GCG TTT GTG CTG TCT GGG CTG GTG CAG TCG GCA GCA TCC TCC TCA TCC GAT GAG GCA ACT CAT GAT GGT CTT CGA 150
26 A F V L S G L V Q S A A S S S S D E A T H D G L R 50
151 AAG CTC ACT GCT GCC AAT TTT ACT CTC GTC AAC GAT GGT GCA TGG CTC ATC GAA TTC TTC TCG CCC GTT TGC GTC 225
51 K L T A A N F T L V N D G A W L I E F F S P V C V 75
226 CAC TGC AAG AAG TTC GGC GCT ACC TGG TCG GAG CTC TCC CAA TTA AGG ACT CGC TTC ACC CAA TAT CCA CAG GCA 300
76 H C K K F G A T W S E L S Q L R T R F T Q Y P Q A 100
301 CCC TTC ACC CTC GCT CAA GTC GAC TGT CTC GCC CAG TGG GAC TTG TGC ACG GAG CAG GGC GTC CAG TTC TTG CCT 375

```

101 P F T L A Q V D C L A Q W D L C T E Q G V Q F L P 125
376 CGG CTT ACC ATC TAC CAG GAC GGC AAG CAG AAT GCC GAG GAA TAC AAG GGA GAC CGC AAC TAT CCC GAG ATC TCG 450
126 R L T I Y Q D G K Q N A E E Y K G D R N Y P E I S 150
451 GCT TAC ATT GAT AAG TTT GCC AGA GAA TAT CGT CAG AAG AAG GGC GTT GCT GAC GTA CCG CTT GTA GCG TCC ACC 525
151 A Y I D K F A R E Y R Q K K G V A D V P L V A S T 175
526 AAC TCC GAC GCC ACT TCA ACA GCT ATC GAG TCT TCC AAT CCT GCT TCA GAT AAC GCT GCT TCC ATT TCG GCT GCA 600
176 N S D A T S T A I E S S N P A S D N A A S I S A A 200
601 TTG CCA TCC CCA TCT CCG TCG TCA TCC AGC GAG CCA GCT GCT GTT ACC CCA AGT CCG GCA TCC TCT TTG TCC TCC 675
201 L P S P S P S S S S E P A A V T P S P A S S L S S 225
676 CTC GAG CCG ATC CAG GAG ATC TTG CCC GCA GGC CCC AAC TCC AAA GGT CAG CTT CTG AGC TAC GGC ACT GCC CCC 750
226 L E P I Q E I L P A G P N S K G Q L L S Y G T A P 250
751 GTC CAA AAC CAG CAA GAG CTT GCA GCA TGG CTC GCC AAA TCG TCC GGT CAG GGA CCC AGC TTT GTC AAG TTT TTT 825
251 V Q N Q Q E L A A W L A K S S G Q G P S F V K F F 275
826 GCT CCC TGG TGT CCA CAC TGC AAA GCC ATG GCC GCC GCC TTT AAG CAA CTT AGC CAA TCG CTC AAA GGC AGG GTC 900
276 A P W C P H C K A M A A A F K Q L S Q S L K G R V 300
901 AAT GTG CTC GAG GTC GAC TGT GAA GCT AAC CAC GCT CTC TGT GCC AGC TAC AAC ATC CGC AGC TAC CCT GTC CTT 975
301 N V L E V D C E A N H A L C A S Y N I R S Y P V L 325
976 CGC CTG TAC AAT CAA GGC AAC CTC AAG GAG TAC ACG GGC AAT CAC GAT GCT ATG CTT AAA TGG GTG CTC 1050
326 R L Y N Q G N L K E Y T G G R N H D A M L K W V L 350
1051 AAA GCC GTC TCG AGC TCA GGA CTC AAA CCT GTC AGC TCG AGC ACC GAG CTC GTG AGC CTT TCC AAG GAG AAT GAG 1125
351 K A V S S S G L K P V S S S T E L V S L S K E N E 375
1126 GTC ATC TTT CTC TAC CTT CAC TCG CCA GGC ACT CCC ATC GAC GAG GTC CAC GCC GTC GAG ACA GCT AGT CAA GCG 1200
376 V I F L Y L H S P G T P I D E V H A V E T A S Q A 400
1201 CTC TTT GGC GCC CGA GCC CCC ATC TTT GTT TCC TCC GAA CCG TCC CTG CTC GAT AGG TAC TCG AGC TCT CTG GCG 1275
401 L F G A R A P I F V S S E P S L L D R Y S S S L A 425
1276 CAG GAC CGT TCT ACA TCC GTT CCC GCC GAG TCT GGC CTG CTG GTG TTC AAG GAT CAT TCG ATA GCC CAG CCC GTC 1350
426 Q D R S T S V P A E S G L L V F K D H S I A Q P V 450
1351 TCG GTC CTC AAC CCG TCC AGC TTG CGT GCA TCC GAT TCG GCT TCA GTA GAG GGC GTC TAC TCG GAG CTG GCC ACC 1425
451 S V L N P S S L R A S D S A S V E G V Y S E L A T 475
1426 TCC AAG ATC GCC GCC TTC TTG TCT CGT GAG CAG TAC TCG CTC GTC ACG GAG CTC ACA GCT GCC AAC TTT GAG GAG 1500
476 S K I A A F L S R E Q Y S L V T E L T A A N F E E 500
1501 ATC GTG CGC AAC CGG GAC GAC GCG CTC GTT GTG CTT GCT GCG CTA TCC GAT ACC TAT CAT GGC TCG CAT CAA GCT 1575
501 I V R N R D D A L V V L A A L S D T Y H G S H Q A 525
1576 GAC GTT TCT GCC CAA GGT ATC GCG TTG AAA GAA GTC GAA TGT CGA CGC TGC GCT CCG TTT CGC TCG AAT GGA GGT 1650
526 D V S A Q G I A L K E V E C R R C A P F R S N G G 550
1651 TGA aacaggcttcaacgtcggctcggccggctcgtgttcgcatgagatcgacgacggaccgttggaaatcgcccctcaagaagctgtataaacatggatgcta 1749
551 * 551
1750 ccaaagtacctgcagctgttttggatgggcaaccagttgctgtactacgacctgcccttcggttctggctctgggctcggccgtgagtgcgcaaca 1849
1850 atggatttccaacgacatctttgatagcatcaccgacgccatccagggcaagactcgaccgaaatcatcccggagccttttgcagaaatcggttctggtg 1949
1950 gctggcaactacatgaacgcgt 1971