

**Isolierung und Charakterisierung  
von Komponenten der b-vermittelten  
Regulationskaskade in *Ustilago maydis***

**Dissertation**

**zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Gerhard Weinzierl  
aus Dachau

Marburg/Lahn 2001



vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: \_\_\_\_\_

Erstgutachter: Herr PD Dr. Jörg Kämper

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: \_\_\_\_\_

Die Abbildung auf der Umschlagseite wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Jörg Kämper, Herrn Prof. Dr. Michael Bölker und Frau Prof. Dr. Regine Kahmann zur Verfügung gestellt. Sie zeigt einen durch *Ustilago maydis* verursachten Tumor an einem Maiskolben (Feldisolat; Andechs, Bayern)

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Mitte Juli 1997 bis Ende Dezember 2000 in München am Institut für Genetik und Mikrobiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und der Betreuung von Herrn PD Dr. Jörg Kämper sowie von Anfang Januar 2001 bis November 2001 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und der Betreuung von Herrn PD Dr. Jörg Kämper durchgeführt.



## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel “Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*” selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

Gerhard Weinzierl

*Man muss ins Gelingen verliebt sein,  
nicht ins Scheitern.*

*Ernst Bloch (1885 – 1977)*

*Meiner Frau und meinen Eltern gewidmet*

*Leben ist das, was an uns vorüberzieht,  
wenn wir uns mit anderen Dingen beschäftigen.*

*John Lennon (1940 – 1980)*

# Zusammenfassung

Der Pilz *Ustilago maydis* ist der Erreger der Maisbeulenbrandkrankheit. Die pathogene Entwicklung des Pilzes beginnt mit der Fusion zweier kompatibler Sporidien, die ein dikaryotisches Filament ausbilden. Diese Prozesse werden durch die beiden Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Während der biallelische *a*-Locus für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-system kodiert, das die Zell/Zellerkennung und die anschließende Fusion vermittelt, ist der multiallelische *b*-Locus, der für zwei Homeodomänenproteine, bW und bE, kodiert, für weitere entwicklungsrelevante Schritte verantwortlich, die mit der pathogenen Entwicklung einhergehen.

Nach der Zellfusion können sich bW/bE-Heterodimere ausbilden, wenn die bW- und bE-Proteine von unterschiedlichen Allelen abstammen. Das bW/bE-Heterodimer ist der zentrale Regulator für filamentöses Wachstum und Pathogenität, wobei der b-Komplex Gene direkt und indirekt über eine b-vermittelte Regulationskaskade kontrolliert.

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst eine Unterteilung der b-regulierten Gene *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1*. Dabei stellte sich heraus, dass *hum2* und *rep1* filamentspezifisch exprimierte Gene, und *dik6*, *dik1* sowie *egl1* b-spezifisch exprimierte Gene sind. Bei einer näheren Analyse wurde *dik6* als ein direkt durch das bW/bE-Heterodimer reguliertes Gen charakterisiert, das für ein putatives Siebentransmembranprotein kodiert und ein Virulenzfaktor ist. Sowohl *dik6*-Deletionsmutanten als auch *dik6*-Überexpressionsmutanten weisen eine 57%ige Reduktion der Pathogenität auf.

Aufgrund der Tatsache, dass die Deletion von *dik6* nicht zum vollständigen Verlust der pathogenen Entwicklung führt, wurde nach einem zu *dik6* verwandten Gen gesucht und *dkh6* mittels eines *in silico* Ansatzes wegen seiner 35%igen Identität auf Aminosäureebene zu Dik6 isoliert. *dkh6* wurde als direkt b-reguliertes Gen charakterisiert, das, ähnlich wie *dik6*, für ein putatives Siebentransmembranprotein kodiert und essentiell ist.

Durch die simultane Verwendung der b-spezifisch exprimierten Gene *dik6*, *dik1* und *egl1* als Reporter konnten nach Mutagenese eines haploiden *U. maydis*-Stammes 19 UV-Mutanten isoliert werden, in denen außer den drei verwendeten Genen weitere b-regulierte und stadienspezifisch-induzierte Gene exprimiert sind. Durch Transformation desselben Stammes mit einer cDNA-Expressionsbank wurde das Gen *drf1* isoliert. Drf1 kodiert für ein Cyclin-ähnliches Protein, das kernlokalisiert ist und vermutlich als indirekter Aktivator von *dik6*, *frb124* und der Gene im *cab*-Locus wirkt. *drf1*-Deletionsstämme weisen keine Reduktion der Pathogenität auf, bei Überexpression von *drf1* hingegen wird verminderte Tumorbildung beobachtet.



# Abkürzungen und Fachbegriffe

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



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE</b> .....	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Ustilago maydis</i> ALS MODELLORGANISMUS FÜR PHYTOPATHOGENE PILZE.....	1
1.2 DER LEBENSZYKLUS VON <i>U. maydis</i> .....	3
1.3 DIE PAARUNGSTYPLOCI <i>a</i> UND <i>b</i> KONTROLLIEREN DIMORPHISMUS UND PATHOGENITÄT .....	6
1.4 SIGNALTRANSDUKTION WÄHREND DER ZELL/ZELL-ERKENNUNG.....	10
1.5 STRATEGIEN ZUR IDENTIFIZIERUNG <i>b</i> -REGULierter GENE.....	13
1.6 FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT.....	16
<b>2. ERGEBNISSE</b> .....	<b>17</b>
2.1 KLASSIFIZIERUNG <i>b</i> -REGULierter GENE.....	17
2.1.1 <i>dik6</i> , <i>dik1</i> und <i>egl1</i> sind <i>b</i> -spezifisch regulierte Gene .....	17
2.1.2 <i>dik6</i> , <i>dik1</i> und <i>egl1</i> sind <i>b</i> -filamentspezifische Gene.....	19
2.2 CHARAKTERISIERUNG DES <i>b</i> -REGULierten GENS <i>dik6</i> .....	23
2.2.1 <i>dik6</i> kodiert für ein Siebentransmembranprotein .....	23
2.2.2 <i>dik6</i> ist ein frühes <i>b</i> -induziertes Gen .....	26
2.2.3 <i>dik6</i> -Promotordeletionsanalyse .....	27
2.2.4 <i>dik6</i> ist ein direktes <i>b</i> -Zielgen .....	30
2.2.5 <i>dik6</i> -Deletionsmutanten weisen eine reduzierte Pathogenität auf .....	35
2.2.6 <i>dik6</i> ist in der frühen Infektionsphase exprimiert.....	37
2.2.7 <i>dik6</i> -Überexpressionsstämme weisen eine reduzierte Pathogenität auf .....	40
2.3 IDENTIFIZIERUNG UND KLONIERUNG VON <i>dkh6</i> .....	42
2.3.1 Klonierung von <i>dkh6</i> .....	42
2.3.2 <i>dkh6</i> kodiert für ein Siebentransmembranprotein .....	43
2.3.3 <i>dkh6</i> ist ein <i>b</i> -spezifisch reguliertes Gen .....	45
2.3.4 <i>dkh6</i> -Promotordeletionsanalyse .....	46
2.3.5 <i>dkh6</i> ist ein direktes <i>b</i> -Zielgen .....	47
2.3.6 <i>dkh6</i> ist ein essentielles Gen.....	49
2.3.7 <i>dkh6</i> -Überexpression .....	51

2.4	ISOLIERUNG VON KOMPONENTEN EINER b-VERMITTELTEN REGULATIONSKASKADE.....	52
2.4.1	Konstruktion eines <i>U. maydis</i> dreifach-Reporterstammes.....	52
2.4.2	Isolierung von negativ regulatorischen Faktoren der <i>dik6</i> -Expression .....	54
2.4.3	Komplementation der UV-Mutanten GW1, GW52, GW53, GW56 und GW57 .....	57
2.4.4	Isolierung von Aktivatoren der <i>dik6</i> -Expression nach Transformation des Stammes GE95 mit einer cDNA-Expressionsbank .....	59
2.4.5	Charakterisierung der Transformanten CGW5-2-5 und CGW5-6-5A .....	60
2.4.6	Drf1 ist im Kern lokalisiert .....	62
2.4.7	Drf1 und das bW-bE Fusionsprotein His-Kon8 regulieren <i>dik6</i> -Expression über gemeinsame Promotorbereiche.....	63
2.4.8	Expressionsanalyse von <i>drf1</i> .....	66
2.4.9	<i>drf1</i> -Deletion.....	67
2.4.10	Überexpression von <i>drf1</i> .....	68
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>71</b>
3.1	b-REGULIERTE GENE.....	71
3.1.1	b-regulierte Gene lassen sich bezüglich ihres Expressionsmusters in diskrete Klassen einteilen.....	71
3.1.2	<i>dik6</i> und <i>dkh6</i> sind direkte Zielgene des bW/bE-Heterodimers .....	73
3.1.3	<i>dik6</i> und <i>dkh6</i> werden nicht in der späten Infektionsphase exprimiert .....	76
3.1.4	<i>dik6</i> Expression wird negativ reguliert .....	77
3.2	DIE ROLLE VON <i>dik6</i> UND <i>dkh6</i> BEI DER PATHOGENITÄT.....	77
3.2.1	<i>dik6</i> kodiert für putatives Membranprotein, das ein Virulenzfaktor in <i>U. maydis</i> ist.....	77
3.2.2	Sind Dik6 und Dkh6 G-Protein gekoppelte Siebentransmembranproteine?.....	79
3.2.3	Kann Dik6 die Funktion von Dkh6 übernehmen?.....	82
3.3	DRF1 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION VON GENEN DER b-VERMITTELTEN REGULATIONSKASKADE .....	83
3.3.1	Drf1 wirkt indirekt auf die Expression b-abhängig regulierter Gene .....	83
3.3.2	Modell zur Vorstellung der b-vermittelten Regulationskaskade in <i>U. maydis</i> .....	85
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>89</b>
4.1	MATERIAL UND BEZUGSQUELLEN.....	89
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits.....	89
4.1.2	Oligonukleotide .....	92
4.1.3	Stämme.....	97
4.1.4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen .....	101
4.2	MIKROBIOLOGISCHE, ZELLBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODEN.....	120
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	120
4.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	121
4.2.3	<i>Ustilago maydis</i> .....	122
4.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN.....	126
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	126
4.3.2	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	129



4.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse.....	131
4.3.4	PCR-Techniken.....	132
4.3.5	Isolierung und Überexpression von Proteinen.....	135
4.3.6	Auftrennung und Nachweis von Proteinen.....	136
4.4	BIOCHEMISCHE METHODEN .....	138
4.4.1	Gelretardationsanalyse.....	138
4.4.2	DNaseI-Protektionsexperimente .....	139
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>		<b>141</b>
<b>6. ANHANG .....</b>		<b>151</b>
6.1	KONSTRUKTION UND ANALYSE EINER <i>U. maydis</i> CDNA-EXPRESSIONSBANK .....	151
6.2	SEQUENZDATEN .....	155







# 1. Einleitung

## 1.1 *Ustilago maydis* als Modellorganismus für phytopathogene Pilze

Nach Schätzungen von Mykologen gibt es weltweit etwa 1,5 Millionen verschiedene Pilze. Diese sind chemoorganotrophe Organismen, d. h. sie benötigen organisches Material als Nährstoff- und Energiequelle. Pilze sind überall verbreitet und kommen hauptsächlich an Land vor, sind aber auch im Süßwasser und eher selten im Meer anzutreffen.

Viele Pilzarten leben von totem organischen Material und bauen abgestorbene Pflanzen und Tierleichen zu Mineralstoffen ab, welche die Pflanzen wieder aufnehmen können. Sie sind somit neben Bakterien für die Erhaltung des Stoffkreislaufes in der Natur verantwortlich. Andere Pilze wiederum zersetzen lebendes organisches Gewebe. Entziehen sie ihre Nährstoffe aus Tieren und Menschen werden sie als Parasiten bezeichnet. Diese Pilze rufen bei geschwächten Patienten Krankheiten hervor, die oft tödlich enden können (Guarro et al., 1999). Andere Pilze hingegen sind Lebensmittel, werden für die Herstellung von Lebensmitteln oder Zusatzstoffen sowie für die Herstellung von Medikamenten verwendet.

Die ambivalente Rolle von Pilzen wird auch im Pflanzenreich deutlich. So erleichtern Mykorrhiza-Pilze durch eine für beide Seiten vorteilhafte Lebensgemeinschaft den Pflanzen die Aufnahme von Nährstoffen. Vertreter der Pilze aus verschiedenen Klassen, wie z. B. der Schleimpilze (Myxomycetes), der Algenpilze (Phycomycetes), der Schlauchpilze (Ascomycetes) oder der Ständerpilze (Basidiomycetes) hingegen sind Pflanzenschädlinge, auf die sich nach Schätzungen etwa 8% bis 25% aller Ernteverluste zurückführen lassen (Börner, 1997; Weber, 1993). Die pflanzenschädigenden (phytopathogenen) Pilze lassen sich in nekrotrophe und biotrophe Formen einteilen. Viele nekrotrophe Pilze wie z. B. *Cochliobolus carbonum* töten ihren Wirt durch Toxine, ehe sie ihn kolonisieren. Biotrophe Pilze hingegen entziehen dem Metabolismus des Wirts nur Nährstoffe, töten ihn in der Regel aber nicht. Bei dieser parasitischen Lebensgemeinschaft hat nur der Pilz einen Vorteil, indem er den Metabolismus des Wirtspartners ausbeutet. Als Vertreter der biotrophen Pilzschädlinge wurde *Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrandes, in den letzten 20 Jahren als Modellorganismus für phytopathogene Pilze etabliert. *U. maydis* gehört systematisch zur Klasse der Basidiomyceten, Unterklasse Phragmobasidiomyceten, in die Ordnung *Ustilaginales* und in die Familie der *Ustilaginaceae*. Der Pilz besitzt ein enges Wirtsspektrum und befällt nur Mais und Teosinte. Letztere ist die Urform des heutigen Mais (Wang et al., 1999). Betrachtet man in Europa den Pilz als Ernteschädling, so sind infizierte Maiskolben in Mexiko unter dem aztekischen Namen "Huitlacoche" als Delikatesse im Handel erhältlich

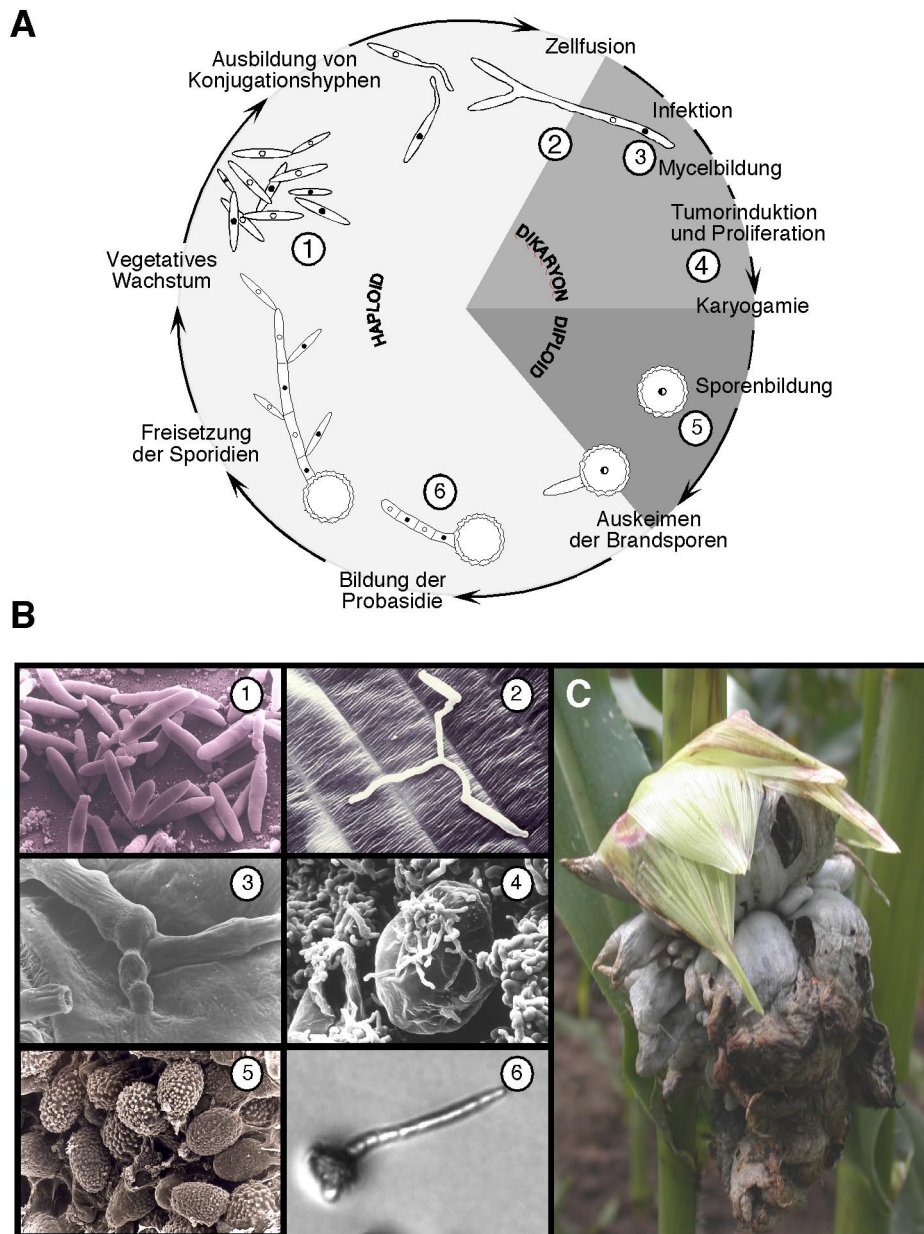
(Banuett, 1992) und werden in den USA als "mexikanische Trüffel" verkauft (Arnold, 1992). Nicht nur als Pathogen einer so weit verbreiteten und intensiv angebauten Nutzpflanze wie Mais zieht der Pilz das wissenschaftliche Interesse auf sich, sondern auch als Modellorganismus für die Aufklärung der Interaktion zwischen Pilz und Wirt. Zu den Eigenschaften, die *U. maydis* als Modellorganismus aufweist, gehört z. B. eine kurze Generationszeit und eine einfache axenische Kultivierung im großen Maßstab. Im Gegensatz zu anderen phytopathogenen Pilzen hat *U. maydis* einen relativ kurzen sexuellen Lebenszyklus von nur 3 Wochen, so dass rasche genetische Arbeiten ermöglicht werden (Christensen, 1963; Holliday, 1961; Holliday, 1974). Seit fast 40 Jahren wird *U. maydis* für Studien zur homologen Rekombination verwendet (Christensen, 1963; Holliday, 1961). Ein weiterer Vorteil von *U. maydis* ist, dass der Pilz während seines vegetativen Lebenszyklus auch in einer haploiden Form existiert, die den Organismus leicht für molekularbiologische Manipulationen zugänglich macht. Durch die Entwicklung von Testsystemen (Holliday, 1974; Puhalla, 1968) und molekularbiologischen Methoden, wie z. B. einem Transformationssystem mit freireplizierenden Plasmiden oder Geninaktivierung durch homologe Rekombination (Fotheringham und Holloman, 1989; Tsukuda et al., 1988; Wang et al., 1988), können Gene funktionell analysiert werden. Zudem stehen mehrere Selektionsmarker (Gold et al., 1994b; Kojic und Holloman, 2000), Auxotrophiemarker (Banks und Taylor, 1988; Holliday, 1961; Kronstad und Leong, 1989) sowie konstitutive und induzierbare Promotoren zur Verfügung (Banks et al., 1993; Bottin et al., 1996; Brachmann et al., 2001; Holden et al., 1989; Spellig et al., 1996).

In den letzten Jahren wurden die Infektionsmechanismen phytopathogener Pilze verstärkt untersucht (Kahmann und Basse, 2001), da diese Gruppe von Pilzen eine Bedrohung für die Sicherstellung des Nahrungsmittelbedarfs darstellen. Zu ihrer Bekämpfung stehen bisher noch unzureichende Mittel bzw. Strategien zur Verfügung. Gegen phytopathogene Pilze kommen zumeist Fungizide, die auf komplexen organischen Verbindungen oder Schwermetallionen beruhen, zur Anwendung. Oftmals ist der Einsatz dieser Präparate teuer, ineffizient und umweltbelastend (Börner, 1997; Müller und Loeffler, 1992), so dass es vor allem das Interesse der angewandten Forschung ist, durch ein besseres Verständnis der pathogenen Entwicklung gezielt wirksamere und verträglichere Wirkstoffe zu entwickeln (Groll et al., 1998; Klein und Li, 1999). Potentielle Ansatzpunkte von Wirkstoffen sind Komponenten, die an der Übertragung von Umweltsignalen mittels Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind (Borges-Walmsley und Walmsley, 2000; Kronstad, 1997; Madhani und Fink, 1998) oder Komponenten der Regulation der dimorphen Lebensform, deren Wechsel oft mit der pathogenen Entwicklung gekoppelt ist (Borges-Walmsley und Walmsley, 2000; Madhani und Fink, 1998; Sanchez-Martinez und Perez-Martin, 2001). Die gewonnenen Ergebnisse dieser molekularen Analyse zeigen oftmals Parallelen zu medizinisch relevanten, humanpathogenen Pilzen auf. Dies deutet an, dass Pathogenitätsmechanismen bei phyto- und humanpathogenen Pilzen im Laufe der Evolution beibehalten wurden oder sich nur geringfügig änderten.

## 1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

*U. maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. Der Name des Pilzes leitet sich vom lateinischen “ustilare” (verbrennen) ab, da die dunkel gefärbten Sporen des Pilzes den Tumoren ein rußiges, verbranntes Aussehen verleihen (Abbildung 1C). Die Symptome des Maisbrandes wurden zum ersten Mal 1754 von Bonnet beschrieben (Bonnet, 1754). Unger gab dem Erreger der Pflanzenkrankheit 1836 den Namen *Ustilago zaeae*. Durch Infektion mit reinen Sporensuspensionen konnte man *U. zaeae* eindeutig als Erreger des Maisbrandes nachweisen (Brefeld, 1883). Nach den aktuellen, internationalen Regeln der botanischen Nomenklatur wurde der Pilz in *Ustilago maydis* umbenannt (Christensen, 1963). *U. maydis* ist ein fakultativ biotropher Pflanzenparasit ohne Fruchtkörper, der einen im Vergleich zu den nahe verwandten Rostpilzen einfachen Lebenszyklus hat. Während dieses Lebenszyklus existiert der Pilz in drei verschiedenen Kernphasen, die mit unterschiedlichen morphologischen Stadien gekoppelt sind. Nach der Konjugation von zwei haploiden Zellen beginnt eine Dikaryophase; in dikaryotischen Zellen tritt nach der Karyogamie die Diplophase ein, die mit der Meiose von sogenannten Teliosporen endet und den Lebenszyklus mit der Haplophase der Zellen neu beginnen lässt (Abbildung 1A). Haploide *U. maydis* Sporidien weisen eine zigarrenförmige Zellform auf und vermehren sich hefeartig durch Sprossung (Abbildung 1B, Stadium 1). Wenn zwei kompatible haploide Sporidien aufeinandertreffen, sind sie in der Lage, sich gegenseitig zu erkennen. Dabei antworten die Zellen auf das Pheromon des jeweils anderen Paarungstyps mit der Ausbildung von sogenannten Konjugationshyphen, die an der Spitze fusionieren und ein Dikaryon ausbilden (Abbildung 1B, Stadium 2). Unter Laborbedingungen kann ein solches Dikaryon auf aktivkohlehaltigem Medium als weißes, pelzartiges Myzel sichtbar gemacht werden (sogenannter Fuz<sup>+</sup>-Phänotyp). Die auf diesem künstlichen Nährmedium induzierten Filamente sind aber im Gegensatz zum Dikaryon im Wirtsorganismus nicht in der Lage zu proliferieren. Man nimmt deshalb an, dass die Pflanze Substanzen produziert, deren Anwesenheit für das Wachstum und die Aufrechterhaltung des Dikaryons essentiell sind. Welche Faktoren dies sind, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Das dikaryotische Filament dringt direkt in die Epidermis junger Blätter ein (Snetselaar und Mims, 1993) (Abbildung 1B, Stadium 3). Dazu werden Appressorien-ähnliche Penetrationsstrukturen ausgebildet. *U. maydis* kann aber vermutlich auch durch Verwundungen der Epidermis und durch Spaltöffnungen eindringen (Snetselaar und Mims, 1993).



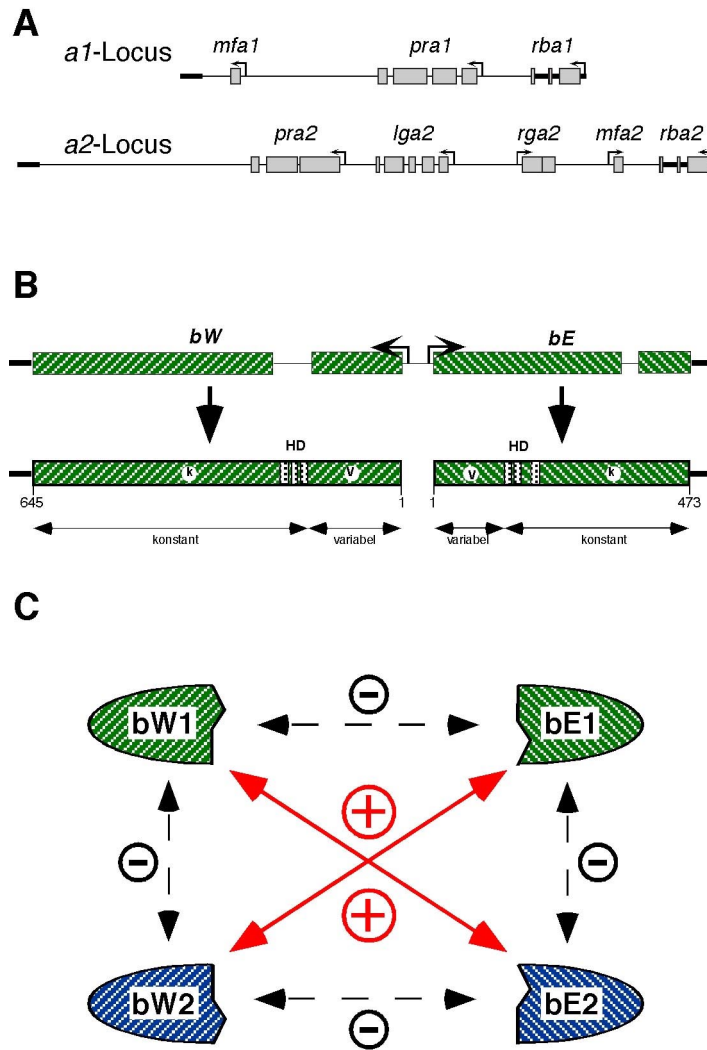
**Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** A) Schematische Darstellung des Lebenszyklus, Einzelheiten siehe Text. Die Zahlen beziehen sich auf die entsprechenden Stadien in B). B) Rasterelektronen- und Lichtmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Zellen. (1) Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Sprossung. (2) Fusion zweier haploider Zellen und Dikaryonbildung auf der Blattoberfläche. (3) Eine Infektionshyphe penetriert die Oberfläche einer Pflanzenzelle. (4) Starke Proliferation des Pilzmyzels im Tumor. (5) Bildung der Brandsporen in den sporogenen Hyphen. (6) Keimung einer Teliospore unter Ausbildung des Promyzels. C) Tumorbildung auf einem Maiskolben. Die Abbildungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: G. Wanner, C. Quadbeck-Seeger, J. Kämper (1, 3, 5); K. Snetselaar (2, 4); S. Huber (6).



Die ersten Symptome der Pflanze nach einem Befall sind Chlorosen und Anthocyanbildung. Innerhalb des pflanzlichen Gewebes wächst der Pilz dann als echtes dikaryotisches Myzel intra- und interzellulär (Abbildung 1B, Stadium 4). An geeigneten Stellen werden Tumore gebildet. Diese bestehen zunächst aus einem Verband stark vergrößerter Pflanzenzellen. Sie bilden sich am Stamm, an Blättern und an männlichen sowie weiblichen Blüten und können Kindskopfgröße erlangen. Innerhalb der Tumore kommt es zu einer starken Proliferation des Pilzes. Nach Karyogamie der paarweise vorliegenden Kerne entwickeln sich sporogene Hyphen, aus denen sich diploide Brandsporen (Teliosporen) differenzieren (Abbildung 1B, Stadium 5). Wenn die Tumore aufbrechen, werden die Brand- bzw. Teliosporen freigesetzt und durch Wind oder Regen verteilt. Diese Lebensform dient dem Pilz auch als Dauer- oder Überwinterungsform. Der sexuelle Lebenszyklus ist vollendet, wenn aus den Sporen bei der Keimung durch meiotische Teilung wiederum haploide Sporidien entstehen, die sich durch Knospung hefeartig vermehren (Abbildung 1B, Stadium 6).

### 1.3 Die Paarungstyploci *a* und *b* kontrollieren Dimorphismus und Pathogenität

Die Kompatibilität haploider *U. maydis* Zellen wird von den beiden genetisch nicht gekoppelten Paarungstyploci *a* und *b* vermittelt. Diese beiden Loci sind für die Fusion der Sporidien, den Morphologiewechsel und die Entwicklung zum pathogenen Dikaryon bis hin zur Tumorbildung verantwortlich (Holliday, 1961; Kahmann et al., 2000b).



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

Für das erfolgreiche Durchlaufen dieses Programms müssen zwei Zellen unterschiedliche Allele beider Paarungstyploci aufweisen. Während der biallelische *a*-Locus die Erkennung und Fusion zweier Zellen vermittelt, ist der multiallelische *b*-Locus für filamentöses Wachstum und die nachfolgende pathogene Entwicklung von *U. maydis* in der Pflanze verantwortlich (Banuett, 1995). Sowohl das *a1*-Allel als auch das *a2*-Allel kodiert für Komponenten eines Pheromon/Rezeptorsystems, bei dem die membranständigen Rezeptoren (Pra1 bzw. Pra2) die sekretierten Pheromone (Mfa1 bzw. Mfa2) des jeweils anderen Kreuzungspartners erkennen (Bölker et al., 1992).

Die durch Bindung des Pheromons ausgelösten Vorgänge werden als Pheromonantwort bezeichnet und führen zu einer verstärkten Transkription der Gene in den *a*- und *b*-Loci, wodurch die Zellen auf eine bevorstehende Fusion vorbereitet werden (Urban et al., 1996b). Dazu bilden die Zellen zunächst Konjugationshyphen aus, die miteinander an der Spitze fusionieren. Nach der Zellfusion wird das Pheromon/Rezeptorsystem zusammen mit dem *b*-Kreuzungstyplocus für die Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums benötigt (Banuett und Herskowitz, 1989; Puhalla, 1970). Die bei diesen Vorgängen involvierten Pheromonrezeptoren weisen Homologie zu anderen pilzlichen Pheromonrezeptoren auf und enthalten sieben hydrophobe, membranspannende Segmente. Anhand dieses Charakteristikums werden sie der Klasse der Ste3p-ähnlichen pilzlichen Pheromonrezeptoren zugeordnet (Bölker et al., 1992; Karchin R., 2001). Von diesen ist bekannt, dass sie mit heterotrimeren G-Proteinen assoziiert sind (Neer, 1995).

Bei den Pheromonen handelt es sich im Fall von Mfa1 um ein 13 Aminosäuren großes und im Fall von Mfa2 um ein 9 Aminosäuren großes Peptid, das posttranslational in einer Reihe von Modifikationsschritten am C-Terminus methyliert und farnesyliert wird (Spellig et al., 1994). Neben den Pheromon- und Pheromonrezeptorgenen befinden sich im *a2*-Locus noch die Gene *rga2* und *lga2*, denen bislang noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, sowie ein nicht-funktionelles Pheromongen, das Rückschlüsse auf die Evolution des Locus zulässt (Urban et al., 1996a) (Abbildung 2A).

Der multiallelische *b*-Locus existiert in mindestens 33 verschiedenen Allelen (Kahmann et al., 1995; Kämper et al., 1995). Jedes *b*-Allel enthält zwei divergent transkribierte Gene *bWest* (*bW*) und *bEast* (*bE*), die durch eine intergenische Promotorregion von 200 bp voneinander getrennt sind. Beide Gene kodieren für Homeodomänenproteine, die aus 645 Aminosäuren (*bW*) und 473 Aminosäuren (*bE*) bestehen (Gillissen et al., 1992) (Abbildung 2B). Beide Proteine zeigen, mit Ausnahme der Homeodomäne, keine Sequenzähnlichkeit, besitzen aber einen vergleichbaren strukturellen Aufbau. Sie lassen sich in zwei Bereiche gliedern: in einen N-terminalen variablen und einen C-terminalen konstanten Anteil. In letzterem ist auch die Homeodomäne lokalisiert. Bei der Homeodomäne handelt es sich um ein 60 bis 63 Aminosäuren großes DNA-Bindemotiv, das in Homeodomänenproteinen von zahlreichen Eukaryonten vorhanden ist (Gehring et al., 1994a).

Die N-terminale variable Domäne umfasst bei bW-Proteinen etwa 150 Aminosäuren und bei bE-Proteinen etwa 110 Aminosäuren und ist bei den einzelnen Allelen nur zu 40 – 60% konserviert, während der C-terminale Bereich in verschiedenen Allelen beider Proteine mit über 90% Identität hoch konserviert ist (Gillissen et al., 1992; Kronstad und Leong, 1990; Schulz et al., 1990). bW- und bE-Proteine interagieren über ihre variablen N-Termini in paarweiser Kombination miteinander, wenn sie von unterschiedlichen Allelen abstammen. Hierüber bildet sich ein bW/bE-Heterodimer aus, das in der Lage ist, die sexuelle Entwicklung und die Pathogenität des Dikaryons auszulösen (Kämper et al., 1995) (Abbildung 2C). Demzufolge findet nach der Plasmogamie zweier Zellen die Unterscheidung von eigenen und nicht eigenen Allelkombinationen auf Proteinebene statt. bW- und bE-Proteine, die vom selben Allel kodiert werden, können kein Heterodimer bilden (Kahmann und Bölker, 1996; Kämper et al., 1995). Dass die Fähigkeit, Heterodimere aus bW und bE zu bilden, ausschlaggebend für die Initiation des pathogenen Programms ist, konnte durch die Konstruktion eines haploiden Stammes, CL13 (*a1bW2bE1*), bewiesen werden. Dieser Stamm enthält ein chimäres *b*-Allel, bestehend aus *bW2* und *bE1*, und ist dadurch in der Lage, Maispflanzen ohne vorherige Zellfusion zu infizieren (Bölker et al., 1995b). Solche Stämme werden als solopathogen bezeichnet und somit konnte dem *b*-Locus bzw. dem von ihm kodierten bW/bE-Heterodimer die Rolle des zentralen Regulators der Pathogenität zugeschrieben werden.

Ein künstliches Fusionsprotein, bei dem die beiden Homeodomänenproteine bE und bW über eine flexible Linkerregion translational fusioniert wurden, kann das bW/bE-Heterodimer ersetzen (Grandel et al., 2000; Romeis et al., 1997). Im Fusionsprotein führte eine Entfernung der variablen Domänen nicht zu einem Funktionsverlust (Grandel et al., 2000; Romeis et al., 1997). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die variablen Domänen nur für die Dimerisierung der Proteine notwendig sind, während Teile des konstanten Proteinbereichs von bW und bE offensichtlich bei der Regulation der Pathogenität eine Rolle spielen (Grandel et al., 2000).

Deletiert oder verändert man allerdings die Homeodomäne des Fusionsproteins, führt dies zu einem Verlust der Pathogenität (Romeis et al., 1997; Schlesinger et al., 1997). Daher wurde vermutet, dass beide Homeodomänen an der DNA-Bindung beteiligt sind und dadurch die regulatorische Funktion des bW/bE-Heterodimers vermitteln. Zudem enthält bW eine Domäne, die in *Saccharomyces cerevisiae* zur transkriptionellen Aktivierung eines Reportergens führt (Romeis et al., 2000). Kürzlich konnte für die beiden Gene *lga2* und *frb52* eine direkte Regulation durch Bindung des bW/bE-Heterodimers gezeigt werden (Brachmann et al., 2001; Romeis et al., 2000), so dass es wahrscheinlich erscheint, dass das bW/bE-Heterodimer als Aktivator von Genen, die an der Ausprägung des filamentösen Wachstums und an der Pathogenität beteiligt sind, wirkt. Das bW/bE-Heterodimer könnte aber auch als negativer Regulator von Repressoren wirken, die Pathogenitätsgene kontrollieren (Banuett, 1991), oder wie das Mata1p/Mat $\alpha$ 2p Heterodimer in *S. cerevisiae* als Repressor haploid-

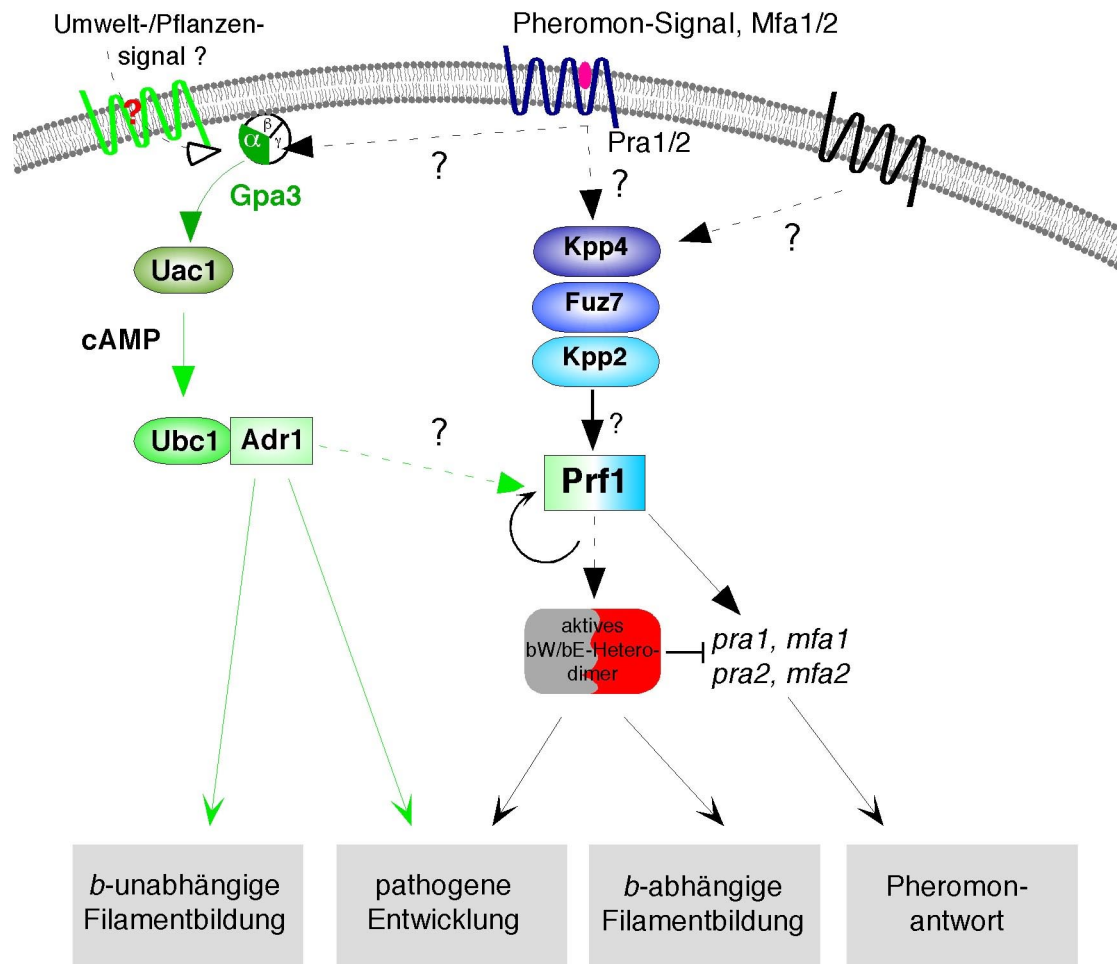
spezifischer Gene wirken, indem es die generellen Transkriptionsfaktoren Tup1p und Ssn6p an Promotoren rekrutiert (Johnson, 1995). Kürzlich wurde in *U. maydis* mit Sql1 ein zu Ssn6p ähnliches Protein identifiziert (Loubradou et al., 2001).

Interessanterweise werden Entwicklungsprozesse in anderen Basidiomyceten wie etwa *Coprinus cinereus* und *Schizophyllum commune* sowie in dem Ascomyceten *S. cerevisiae* ebenfalls über die Heterodimerisierung von Homeodomänenproteine kontrolliert (Casselton und Olesnicky, 1998). Aufgrund der Ähnlichkeit der Homeodomänen der bW- und bE-Proteine von *U. maydis* wurden sie zusammen mit den Homeodomänenproteinen aus *C. cinereus*, *S. commune* und *S. cerevisiae* in die beiden Untergruppen der HD1- und HD2-Proteine eingeteilt. Dabei gehört bE zu den HD1-Proteinen, bW hingegen zu der HD2-Klasse (Kues und Casselton, 1992).

Die beschriebene Organisation in zwei Paarungstyploci, die für Pheromon- und Pheromonrezeptor- bzw. Homeodomänen-Proteine kodieren, findet man auch bei verwandten Arten von *U. maydis*. So trägt z. B. das Roggenpathogen *Ustilago hordei* einen Kreuzungstyplocus, auf dem die *a* und *b* Paarungstyploci benachbart liegen und zusammen vererbt werden (Bakkeren und Kronstad, 1994). Daher weist dieser Pilz ein bipolares Paarungssystem auf, wohingegen die obengenannten Vertreter der Basidiomyceten *C. cinereus* und *S. commune*, ebenso wie *U. maydis*, über ein tetrapolares Paarungssystem verfügen.

### 1.4 Signaltransduktion während der Zell/Zell-Erkennung

Bislang sind in *U. maydis* zwei Signalweiterleitungswege bekannt, die an der Zellfusion und Pathogenität beteiligt sind: eine Pheromon-MAPK-Signalkaskade und eine cAMP-Kaskade (Kahmann et al., 2000a) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Signaltransduktionskaskaden in *U. maydis*.** Nach Bindung des Pheromons (Mfa1/2) an den entsprechenden Rezeptor (Pra1/2) wird das Signal auf ein MAPK-Modul weitergeleitet, das aus der MAPKKK Kpp4, der MAPKK Fuz7 und der MAP-Kinase Kpp2 besteht, wodurch Prf1 aktiviert wird. Diese Aktivierung induziert die Transkription der *a*- und *b*-Gene sowie von *prf1* selbst. An die Zellfusion schließt sich die Bildung eines aktiven bW/bE-Heterodimers an, das zu filamentösem Wachstum und zur pathogenen Entwicklung des Dikaryons führt. Komponenten der cAMP-Kaskade sind die G $\alpha$ -Untereinheit Gpa3, die Adenylatzyklase Uac1 und die Proteinkinase A, die aus der regulatorischen Untereinheit Ubc1 und der katalytischen Untereinheit Adr1 besteht. Eine Aktivierung der cAMP-Kaskade führt ebenfalls zu einer Induktion der Pheromongene. Eine Beteiligung der Komponenten dieses Signalwegs an der Weiterleitung von Umwelt- und/oder Pflanzensignalen wird hier angenommen. Beide Signale treffen bei Prf1 aufeinander. Daneben führt ein Ausfall der cAMP-Kaskade – wie z. B. in  $\Delta gpa3$ -,  $\Delta uac1$ - oder  $\Delta adr1$ -Stämmen – zu einem b-unabhängigen Filament. (modifiziert nach Kahmann et al., 2000a).

Die Bindung des Pheromons an den Pheromonrezeptor des anderen Paarungstyp führt zu einer transkriptionellen Aktivierung der Gene der *a*- und *b*-Paarungstyploci, wodurch die Zellen auf die bevorstehende Fusion vorbereitet werden (Urban et al., 1996b). Die durch Bindung des Pheromons ausgelösten Vorgänge werden als Pheromonantwort bezeichnet, die bei *U. maydis* ähnlich wie in *S. cerevisiae* und *S. pombe* über eine Pheromon-MAPK-Kaskade weitergeleitet wird (Lengeler et al., 2000). Dabei überträgt vermutlich ein an den entsprechenden Pheromonrezeptor gekoppeltes G-Protein das Pheromonsignal über eine MAPK-Signalkaskade auf einen Transkriptionsfaktor. Die Komponenten der Pheromon-MAPK-Signalkaskade und der Transkriptionsfaktor sind in *U. maydis* bekannt. Die Pheromon-MAPK-Kaskade bestehen aus der MAPKK-Kinase Kpp4, der MAPK-Kinase Fuz7 und der MAP-Kinase Kpp2 (P. Müller, pers. Mitteilung; Banuett und Herskowitz, 1994; Mayorga und Gold, 1999; Müller et al., 1999). Dieses modular aufgebaute Kinasesystem überträgt das Signal auf den Transkriptionsfaktor Prf1 (Hartmann et al., 1996). Prf1 enthält eine potentielle MAP-Kinase-Interaktionsdomäne sowie potentielle Phosphorylierungsstellen für MAP-Kinasen und für cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKAs). Es konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen in den MAP-Kinase-Phosphorylierungsstellen und in der MAPK-Interaktionsdomäne die Funktion von Prf1 beeinträchtigen (Müller et al., 1999). Prf1 ist ein HMG-Domänen Protein und bindet an sogenannte “pheromone responsive elements” (PREs) in der Nähe aller Gene, die in den *a*- und *b*-Paarungstyploci liegen (Hartmann et al., 1996; Urban et al., 1996b). Prf1 ist auch für die basale Transkription dieser pheromoninduzierbaren Gene notwendig. Nach Aktivierung durch die Pheromon-MAPK-Kaskade wird auch die Transkription von *prf1* stimuliert. Diese autokrine Stimulation führt zu einer Verstärkung des ursprünglichen Pheromonsignals vor der Zellfusion. Prf1 induziert auch die Expression der *b*-Gene, so dass während der Zellfusion vermehrt bW- und bE-Proteine vorliegen (Hartmann et al., 1996). Nach der Fusion führt die Anwesenheit von aktiven bW/bE-Heterodimeren zur Repression der Gene im *a*-Locus. Da *prf1* neben der basalen Transkription der *a*-Paarungstypgene auch die Expression der *b*-Gene reguliert, sind *prf1*-Deletionsstämme nicht nur steril, sondern auch apathogen. Eine Deletion von *prf1* im solopathogenen Stamm CL13 führt zum Verlust der pathogenen Entwicklung, die durch die Überexpression eines aktiven bW/bE-Heterodimer wiederhergestellt werden konnte (Hartmann et al., 1996). Prf1 kommt neben einer zentralen Rolle bei der Signalübertragung von der Pheromon-Stimulation hin zur Expression der *b*-Gene vermutlich auch eine Rolle bei der Übermittlung von Pflanzensignalen zu (Hartmann et al., 1996).

In Mutationsanalysen konnte für alle Komponenten der Pheromon-MAPK-Kaskade neben ihrer Rolle in der Weiterleitung des Pheromonsignals auch eine Beteiligung an der pathogenen Entwicklung nachgewiesen werden (Banuett und Herskowitz, 1994; Müller et al., 1999; P. Müller, pers. Mitteilung). Im Fall von Kpp4 kann der Verlust der Pathogenität nicht und im Fall von Kpp2 nur teilweise durch die Expression eines aktiven bW/bE-Heterodimers komplementiert werden (Müller et al., 1999; P. Müller, pers. Mitteilung). Dies deutet an, dass

über Komponenten des MAP-Kinasemoduls, das das Pheromonsignal weiterleitet, noch andere Signale umgesetzt werden. Kürzlich konnte mit *kpp6* ein Gen isoliert werden, das für eine weitere MAP-Kinase kodiert (Brachmann, 2001). Da *kpp6*-Deletionsmutanten in der Pathogenität deutlich reduziert sind und keine primäre Anthocyanbildung als Abwehrreaktion der Maispflanzen auf eine pilzliche Infektion zu beobachten war, könnte Kpp6 eine entscheidende Rolle in der frühen Infektionsphase spielen und an der Kommunikation zwischen Pilz und Pflanze beteiligt sein (Brachmann, 2001).

Aufgrund ihres Einflusses auf die Zellmorphologie sind in *U. maydis* bislang mehrere Komponenten einer cAMP-vermittelten Signalkaskade isoliert worden. Das Signaltransduktions-Modul wird von einem noch unbekanntem Umweltsignal aktiviert und ist an der Regulation von Zellfusion und Pathogenität beteiligt (Abbildung 3). Es besteht aus Gpa3, der  $\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins (Krüger et al., 1998; Regenfelder et al., 1997), der Adenylatzyklase Uac1 (Gold et al., 1994a), und der regulatorischen und katalytischen Untereinheit der PKA, Ubc1 (Gold et al., 1994a) und Adr1 (Dürrenberger et al., 1998). Ähnlich aufgebaute cAMP-Kaskade-Module findet man auch in anderen filamentösen Pilzen, wo sie an entwicklungsrelevanten Prozessen beteiligt sind (Kronstad und Staben, 1997).

In *U. maydis* wird das Signal von einem bislang unbekanntem Rezeptor perzipiert und über Gpa3, nach Abdissoziation der  $\beta\gamma$ -Untereinheit auf die Adenylatzyklase Uac1 übertragen. Die durch Uac1 bewirkte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt zur Dissoziation des Ubc1/Adr1-Komplexes, so dass Adr1 Zielproteine durch Phosphorylierung aktivieren kann (Dürrenberger et al., 1998; Gold et al., 1997). Interessanterweise führt dies ebenfalls zu einer transkriptionellen Aktivierung der Paarungstyploci-Gene, die abhängig von Prf1 ist (Krüger et al., 1998). Da Mutationen in den potentiellen PKA-Phosphorylierungstellen von Prf1 einen deutlichen Einfluss auf die Weiterleitung des cAMP-Signals und die Paarungskompetenz haben, scheinen die Signale der cAMP-Kaskade wenigstens zum Teil auch über Prf1 weitergeleitet zu werden (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung).

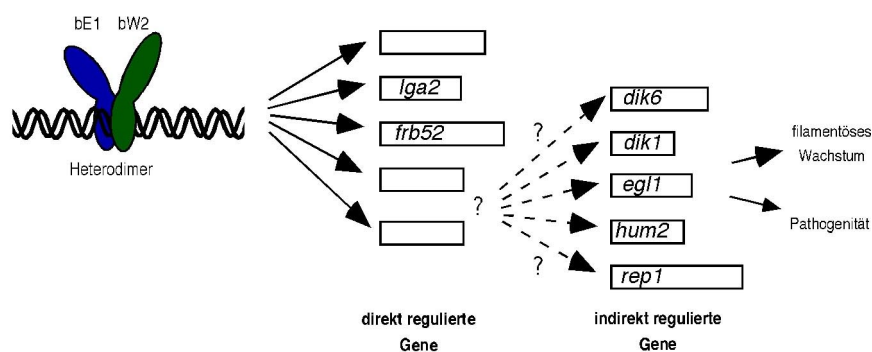
Mutanten in den Komponenten der cAMP-Kaskade weisen Defekte in der pathogenen Entwicklung auf (Gold et al., 1994a; Gold et al., 1997; Regenfelder et al., 1997; Dürrenberger et al., 1998). Die Deletion von *gpa3*, von *uac1* oder von *adr1* führt zu einem filamentösen Phänotyp (Dürrenberger et al., 1998; Gold et al., 1994a; Regenfelder et al., 1997). Kompatible Kombinationen von Stämmen, die durch einen erniedrigten, intrazellulären cAMP-Spiegel filamentös wachsen, sind nicht in der Lage, Pflanzen zu infizieren (Dürrenberger et al., 1998; Gold et al., 1994a; Regenfelder et al., 1997). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen cAMP-Signalkaskade und Morphologie wurde postuliert, dass in einem Dikaryon ein erniedrigter cAMP-Spiegel vorherrscht (Gold et al., 1994a; Kronstad, 1997). Eine Deletion von *ubc1* führt zu einem Defekt in der Zytokinese (Gold et al., 1994a). Der beobachtete Phänotyp wird als „multiple budding“ bezeichnet. Dabei kommt es am gleichen Zellpol zur Ausbildung mehrerer Knospen ohne vorherige Abschnürung von der Mutterzelle (Gold et al., 1994a; Gold



et al., 1997). Derselbe Effekt wird in Stämmen, die ein konstitutiv aktives Allel von *gpa3* (*gpa3<sub>Q206L</sub>*) enthalten oder nach Zugabe von cAMP zum Medium beobachtet (Krüger et al., 1998; Regenfelder et al., 1997). Da  $\Delta$ *abc1*-Mutanten apathogen sind und *gpa3<sub>Q206L</sub>*-Mutanten in sehr späten Stadien der pathogenen Entwicklung gestört sind (Gold et al., 1997; Krüger et al., 2000), wurde gefolgert, dass der cAMP-Signaltransduktionsweg weitere, für die pathogene Entwicklung notwendige Gene reguliert, die während der biotrophen Phase von *U. maydis* wichtig sind.

## 1.5 Strategien zur Identifizierung b-regulierter Gene

Durch die Identifikation des *b*-Locus als zentralem Regulator des Morphologiewechsels und der pathogenen Entwicklung hat *U. maydis* unter den phytopathogenen Pilze eine besondere Bedeutung als Modellorganismus gewonnen. Aufgrund seiner herausragenden Funktion wurde das bW/bE-Heterodimer konzeptionell an die Spitze einer b-vermittelten Regulationskaskade gestellt. Für die morphologischen Transitionen, die mit der pathogenen Entwicklung einhergehen, wurde deshalb ein komplexes regulatorisches Netzwerk postuliert. Dieses Netzwerk muss gewährleisten, dass einerseits die Expression einer Vielzahl von Genen, die im haploiden Stadium nicht oder nur basal exprimiert sind, induziert wird, dass diese Prozesse zeitlich koordiniert erfolgen und, dass andererseits haploid-spezifische Gene reprimiert werden. Es ist also denkbar, dass das bW/bE-Heterodimer, ähnlich wie in *Drosophila melanogaster* die Homeodomänenproteine Even-skipped (Eve) und Fushi-tarazu (Ftz) (Liang und Biggin, 1998), als Aktivator oder Repressor viele verschiedene Gene durch direkte Bindung an deren Promotoren reguliert (direkt b-regulierte Gene), die wiederum andere Gene positiv oder negativ kontrollieren (indirekt b-regulierte Gene). Die Vorstellung einer b-vermittelten Regulationskaskade ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: b-vermittelte Regulationskaskade in *U. maydis*.** Das bW/bE-Heterodimer bindet an eine b-Bindestelle eines Promotors, wodurch das betreffende Gen aktiviert bzw. reprimiert wird. Direkte Zielgene werden so durch Bindung des bW/bE-Heterodimers reguliert und indirekte Zielgene werden wiederum durch Genprodukte der direkten Zielgene reguliert. Möglicherweise sind in einzelnen Fällen Signalkaskaden zwischengeschaltet (durch Fragezeichen und gestrichelte Pfeile angedeutet). Einige b-abhängig exprimierte Gene wurden bereits in das Modell eingeordnet (Erläuterungen dazu siehe Text).

Mit *lga2* ist ein direkt durch das bW/bE-Heterodimer reguliertes Gen gefunden worden (Romeis et al., 2000). *lga2* kodiert für ein Protein unbekannter Funktion, das in den Mitochondrien lokalisiert ist (M. Bölker, P. Müller, pers. Mitteilung). Eine Deletionsmutante zeigt keinen Einfluss auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis*.

Mit verschiedenen Ansätzen konnten auf mRNA- und Proteinebene neben *lga2* weitere, differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, deren Expression nach Bildung eines aktiven b-Komplexes induziert wird. Eines dieser b-regulierten Gene ist *egl1*, das für eine  $\beta$ -1,4-Endoglukanase kodiert, die Cellulose spalten kann. Das *egl1*-Gen wurde durch subtraktive Hybridisierung von mRNA aus hefeähnlich wachsenden und filamentösen Formen von *U. maydis* identifiziert (Schauwecker et al., 1995).

Die Gene *dik6*, *dik1* und *hum2* wurden mittels eines “differential display”-Ansatzes isoliert, indem das Expressionsmuster haploider und dikaryotischer Zellen verglichen wurde, um Gene zu identifizieren, die nur im filamentösen Dikaryon exprimiert sind. *hum2* kodiert für ein Hydrophobin-Protein, das eine strukturelle Komponente der Zellwand darstellt, wohingegen *dik1* und *dik6* für Proteine mit bislang unbekannter Funktion kodieren, die auch keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen in Datenbanken aufweisen (Bohlmann, 1996; Bohlmann et al., 1994). Über einen Vergleich der Proteinzusammensetzung von Zellwänden hefeartig und filamentös wachsender Zellen mittels SDS Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde mit Rep1 ein anderes filamentspezifisch exprimiertes Protein gefunden (Wösten et al., 1996). Rep1 ist ein hydrophobes Protein, das posttranslational prozessiert wird und auf die Zellwand von Hyphen aufgelagert ist. *rep1*-Deletionsmutanten weisen bei der Ausbildung von Lufthyphen einen Defekt auf (Wösten et al., 1996). Da sich Einzeldelationen der Gene *egl1*, *dik6*, *dik1*, *hum2* und *rep1* weder hinsichtlich der Kreuzungskompetenz von Zellen noch in Bezug auf Pathogenität auswirken, ist nicht klar, welche Funktion die Gene während der Entwicklung von *U. maydis* haben.

Ein grundlegendes Problem aller bisher durchgeführten Ansätze, Zielgene des bW/bE-Heterodimers zu identifizieren, ist, dass Stämme miteinander verglichen wurden, die sich nicht nur in ihrem Genotyp und der Expressionsstärke der Paarungstypgene unterscheiden, sondern auch in ihrer Morphologie, also hefeartiges und filamentöses Wachstum. Um diese Problematik zu umgehen, wurden Stämme entwickelt, in denen die *b*-Gene zeitlich definiert exprimiert werden können. Dadurch war es möglich, Auswirkungen der *b*-Kaskade auf das Transkriptom einer Zelle noch vor den anschließenden morphologischen Veränderungen abgreifen zu können (Brachmann, 2001). Mit Hilfe einer Variante des “differential display”, dem RNA-Fingerprint, wurde für die Untersuchung der hergestellten, *b*-regulierbaren Stämme ein Detektionssystem angewandt, das zum einen die Identifizierung transient *b*-regulierter Gene und zum anderen die Identifizierung *b*-induzierter sowie *b*-reprimierter Gene erlaubt (Brachmann et al., 2001; Friedel et al., 1997). Dabei wurde herausgefunden, dass in *U. maydis* nach 1 Stunde Induktion der *b*-Genexpression etwa 0,3% aller Gene bzw. nach 5 Stunden 2% aller Gene differentiell exprimiert sind, bezogen auf eine Gesamtzahl von 7.200

Genen in *U. maydis* (Brachmann et al., 2001). Die weitere Analyse führte zur Identifizierung von 12 neuen b-regulierten Genen, von denen 7 b-induziert und 5 b-reprimiert sind. Für eines der Gene, *frb52*, konnte eine direkte Regulation durch das bW/bE-Heterodimer gezeigt werden (Brachmann et al., 2001).

Um weitere Komponenten einer b-vermittelten Regulationskaskade zu isolieren, wurde in einem genetischen Ansatz ein haploider Stamm UV-mutagenisiert. Als Reportergen wurde das vermutlich indirekt b-regulierte Gen *egl1* verwendet, da die cellulolytische Aktivität der von *egl1* kodierten  $\beta$ -1,4-Endoglukanase leicht mit einem Plattentest nachzuweisen ist. Dabei wurden mehrere Mutanten isoliert, die b-unabhängig eine cellulolytische Aktivität aufwiesen. In diesen Mutanten konnte die Expression der b-regulierten Gene *dik1*, *hum2* und *rep1* gezeigt werden (M. Reichmann, pers. Mitteilung; Quadbeck-Seeger et al., 2000). Durch Komplementation von zwei Mutanten war es möglich, die Gene *hda1* und *rum1* zu isolieren. *hda1* kodiert dabei für eine Histondeacetylase, die vermutlich bei der Chromatin-vermittelten Transkriptionskontrolle eine wichtige Rolle spielt (M. Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung), da Histondeacetylasen von Transkriptionsfaktoren in einem Multiproteinkomplex an die DNA rekrutiert werden, um durch die Deacetylierung von Histonproteinen eine Lockerung der Chromatinstruktur in Promotorregionen zu bewirken (Struhl, 1999). Das zweite in diesem Ansatz isolierte Gen, *rum1*, weist Sequenzähnlichkeiten zum Retinomablastom-bindenden Protein 2 von Mensch auf und hat vermutlich eine Funktion als DNA-bindender Regulator (Quadbeck-Seeger et al., 2000). Damit werden die differentiell exprimierten Gene *egl1*, *dik1*, *hum2* und *rep1* einerseits durch das bW/bE-Heterodimer aktiviert und andererseits durch Hda1 und Rum1 reprimiert.

## 1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung weiterer Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *U. maydis*. Dazu sollten zunächst die bislang bekannten b-regulierten Gene *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1*, von denen sich keines als essentiell für die pathogene Entwicklung herausstellte, in allgemein filamentspezifische und b-filamentspezifische Gene eingeteilt werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob b-regulierte Gene Virulenzfaktoren darstellen. Dazu wurde das von Bohlmann (1996) isolierte Gen *dik6* näher untersucht. Anschließend sollten in unabhängigen genetischen Ansätzen die b-regulierten Gene *dik6*, *dik1* und *egl1* simultan als Reporter eingesetzt werden, um gemeinsame Regulatoren zu finden. Da Komponenten einer b-vermittelten Regulationskaskade sowohl als Repressoren als auch Aktivatoren wirken können, sollte der dreifach-Reporterstamm einerseits mit UV mutagenisiert und andererseits mit einer cDNA-Expressionsbank transformiert werden. Dabei sollte der Schwerpunkt auf der Suche nach Aktivatoren liegen, da den dabei identifizierten Genen eine direkte biologische Funktion hinsichtlich ihres Einflusses auf filamentöses Wachstum und Pathogenität zugeschrieben werden kann. Von den identifizierten Genen sollten die interessantesten Kandidaten in Bezug auf ihre Rolle im Pathogenitätsprozess näher untersucht werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Klassifizierung b-regulierter Gene

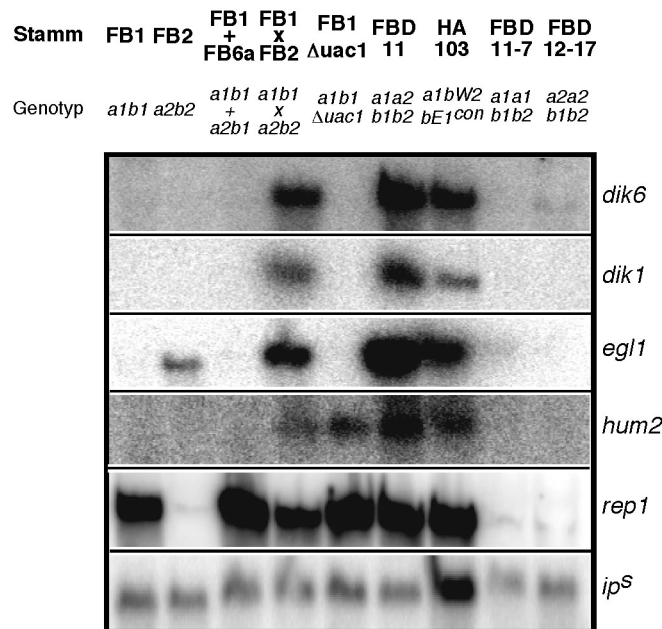
#### 2.1.1 *dik6*, *dik1* und *egl1* sind b-spezifisch regulierte Gene

Mittels verschiedener Ansätze zur Klonierung von Zielgenen des bW/bE-Heterodimers wurden die differentiell exprimierten Gene *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1* isoliert (Bohlmann, 1996; Schauwecker et al., 1995; Wösten et al., 1996). Bei diesen Ansätzen wurden Stämme miteinander verglichen, die sich in ihrem Genotyp, in der Expression der Paarungstypgene und in ihrer Morphologie unterscheiden. Daher kann die Suche nach differentiell exprimierten Genen in solchen resultieren, deren Expression zum einen von der *a*-abhängigen Signalkaskade, zum anderen von einem aktiven bW/bE-Heterodimer (Bohlmann, 1996; Brachmann, 2001) oder vom Morphologiewechsel hefeartiger zu filamentös wachsenden Zellen beeinflusst wird (S. Gold, pers. Mitteilung). Der Einfluss der *a*-abhängigen Signalkaskade auf die Expression der fünf Gene wurde in allen Fällen ausgeschlossen (Bohlmann, 1996; Schauwecker et al., 1995; Wösten et al., 1996). Jedoch konnte zum Zeitpunkt der Charakterisierung der Gene *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1* der Einfluss des Morphologiewechsels auf deren Expression nicht eindeutig auf b-abhängiges oder b-unabhängiges filamentöses Wachstum, das bei einem erniedrigten, intrazellulären cAMP-Spiegel auftritt, zurückgeführt werden (Gold et al., 1994a).

Um vor allem zwischen den beiden letztgenannten Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde eine Expressionsanalyse der filament-spezifisch exprimierten Gene *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1* (Bohlmann, 1996; Bohlmann et al., 1994; Schauwecker et al., 1995; Wösten et al., 1996) durchgeführt.

Für diesen Ansatz wurden die haploiden *U. maydis* Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*), die hefeartig wachsen, eine Mischung dieser beiden Stämme (FB1 x FB2) und der diploide Stamm FBD11 (*a1a2b1b2*), der aufgrund zweier unterschiedlicher Allele in den Paarungstyploci *a* und *b* Filamente auf aktivkohlehaltigen CM-Medium ausbildet und pathogen ist, verwendet. Ebenso wurden die diploiden Stämme FBD11-7 (*a1a1b1b2*) und FBD12-17 (*a2a2b1b2*) hinzugezogen, die unterschiedliche *b*-Allele und gleiche *a*-Allele aufweisen und aufgrund der fehlenden autokrinen Pheromonstimulation auf aktivkohlehaltigen CM-Medium hefeartig wachsen, jedoch pathogen in der Pflanze sind. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine Mischung der haploiden Stämme FB1 (*a1b1*) und FB6a (*a2b1*) (FB1 + FB6a) verwendet, die als Indikator für eine pheromonabhängige Regulation

dient, da sich die Zellen gegenseitig stimulieren, aber wegen der gleichen *b*-Loci nicht miteinander fusionieren können. Als weitere Indikatoren wurden der Stamm FB1Δ*uac1* (*alb1*Δ*uac1*) (Krüger et al., 1998), der aufgrund einer Deletion der Adenylatzyklase *uac1* konstitutiv filamentös wächst, und der haploide Stamm HA103 (*albW2bE1<sup>com</sup>*) verwendet (Hartmann et al., 1996), der aufgrund der konstitutiven Expression zweier kompatibler *b*-Allele filamentös wächst und pathogen ist. Mit Hilfe dieser Stämme ist es möglich, zum einen zwischen einer *b*-unabhängigen, aber filament-spezifischen Expression (in FB1Δ*uac1*) und zum anderen zwischen einer *a*-unabhängigen, aber *b*-abhängigen Expression der Gene *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1*, zu unterscheiden (in HA103). Um Medien-abhängige Effekte auszuschließen, wurden alle Stämme in CM-Flüssigmedium bis zu OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 angezogen, in einer Dichte von etwa 0,1 OD<sub>600</sub>/cm<sup>2</sup> auf CM-Aktivkohlemedium ausgestrichen und 48 Stunden bei 28°C inkubiert.



**Abbildung 5: Northern-Analyse der b-abhängig exprimierten Gene *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1*.** Kultivierungsbedingungen und weitere Einzelheiten siehe Text; in den Fällen von FB1 x FB2 und FB1 + FB6a wurden die Stämme getrennt angezogen und auf der CM-Aktivkohleplatte mit einer Dichte von 0,05 OD<sub>600</sub>/cm<sup>2</sup> pro Stamm gemischt, der Stamm FB1Δ*uac1* wurde mit 6 mM cAMP angezogen, damit der filamentöse Phänotyp erst bei Wachstum auf der Aktivkohleplatte auftritt. Die verwendeten Stämme sind über den Spuren angegeben. Pro Spur wurde jeweils 10 μg RNA aufgetragen. Zur Mengenkontrolle wurde der Filter mit einem Fragment des konstitutiv exprimierten Gens für die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinatdehydrogenase (*ip<sup>S</sup>*) hybridisiert.

Dabei zeigte sich, dass die Gene *dik6*, *dik1* und *egl1* nur in Anwesenheit aktiver bW/bE-Heterodimere (Abbildung 5, Stämme *a1b1* x *a2b2*, *a1a2b1b2*, *albW2bE1<sup>com</sup>*) exprimiert werden. In den beiden Stämmen FBD11-7 (*a1a1b1b2*) und FBD12-17 (*a2a2b1b2*) ist die Expression der untersuchten Gene vermutlich aufgrund der schwachen *b*-Genexpression zum Teil so gering, dass sie nicht mehr nachgewiesen werden kann. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Stämme aufgrund gleicher *a*-Loci keine autokrine

Pheromonstimulation aufweisen. Da diese Stimulation aber für die Induktion der *b*-Genexpression essentiell ist, ist folglich eine zu geringe Anzahl von *b*-Transkripten vorhanden.

Eine *a*-abhängige (Abbildung 5, Stämme *alb1* + *a2b1*) oder filamentspezifische Expression (Stamm *alb1Δuac1*) der drei Gene *dik6*, *dik1* und *egl1* kann ausgeschlossen werden, da in der Northern-Analyse keine Signale detektiert werden konnten. Die Expression der Gene *hum2* und *rep1* ist hingegen mit dem filamentös wachsenden Phänotyp von *U. maydis* Zellen gekoppelt, da beide Gene noch *b*-unabhängig in einem FB1Δuac1 Stamm exprimiert werden. Die Expression von *rep1* wird zudem noch durch Komponenten der aktiven Pheromon-MAPK-Signalkaskade (Abb. 5, Stämme *alb1* + *a2b1*) und unter den gewählten Bedingungen auch in haploiden Sporidien (Abbildung 5, Stamm *alb1*) induziert. Die Ergebnisse der Northern-Analyse lassen den Schluss zu, dass die Gene *dik6*, *dik1* und *egl1* *b*-spezifisch induziert sind.

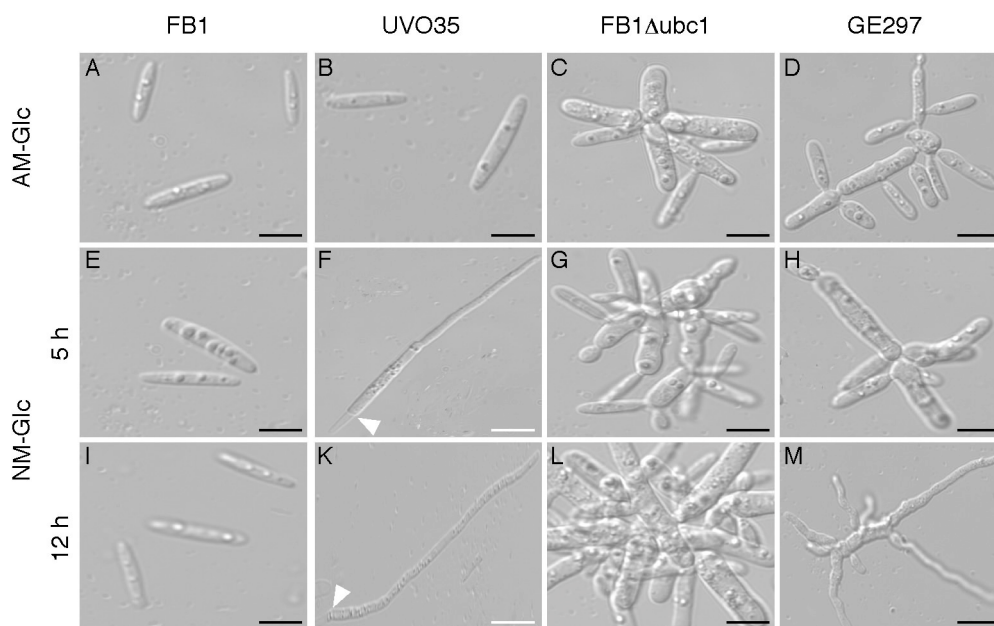
### 2.1.2 *dik6*, *dik1* und *egl1* sind *b*-filamentspezifische Gene

Durch die oben erläuterte Northern-Analyse ist es nicht möglich, zu unterscheiden, ob die Gene *dik6*, *dik1* und *egl1* in einem *b*-abhängigen Filament nur aufgrund des Einflusses eines aktiven *bW/bE*-Heterodimers exprimiert werden oder synergistisch durch regulatorische Prozesse während der Filamentbildung beeinflusst werden, z. B. durch die Repression des cAMP-Signalweges und einem daraus resultierenden erniedrigten, intrazellulären cAMP-Spiegel (Gold et al., 1994a; Kronstad, 1997). Daher war es von Interesse, einen *U. maydis* Stamm herzustellen, der ein aktives *bW/bE*-Heterodimer trägt und einen aktiven cAMP-Signalweg aufweist, da postuliert wird, dass ein aktiver *b*-Komplex und eine aktive cAMP-Signalkaskade antagonistisch auf das Wachstum durch Knospung und das filamentöse Wachstum von *U. maydis* Zellen wirken (Gold et al., 1994a).

Dazu wurden Sporen einer Infektion der kompatiblen Stämme FB1Δubc1 (*alb1Δubc1*), ein Stamm der vermutlich aufgrund der Deletion des Gens für die regulatorische Untereinheit der PKA, *ubc1*, einen konstitutiv aktivierten cAMP-Signalweg aufweist (Gold et al., 1997) und UVO38 (*a2b2*;  $P_{nar1}:bW2$ , *bE1*), ein Stamm der aufgrund eines im *ip*-Locus integrierten Plasmids in  $\text{NO}_3^-$ -Medium filamentös wächst, da *bW2* und *bE1* unter der Kontrolle des  $\text{NO}_3^-$ -induzierbaren und  $\text{NH}_4^+$ -reprimierbaren *nar1*-Promotors stehen (V. Vincon und J. Kämper, pers. Mitteilung), ausgekeimt und Sporidien isoliert, die den Genotyp  $\Delta ubc1 P_{nar1}:bW2, bE1$  aufweisen.

Vor der Induktion und 5 sowie 12 Stunden nach der Induktion der *b*-Gene wurden Zellaliquots entnommen und lichtmikroskopisch untersucht. Unter reprimierenden Bedingungen zeigten die Stämme FB1Δubc1 und GE297 (*alb1Δubc1*,  $P_{nar1}:bW2$ , *bE1*) den durch die Deletion von *ubc1* verursachten typischen „multiple budding“-Phänotyp (Gold et al., 1994a; Gold et al., 1997) (Abbildung 6C, D), wohingegen bei den Stämmen FB1 (*alb1*)

und UVO35 (*alb1*;P<sub>*nari*</sub>:*bW2*, *bE1*) keine morphologischen Auffälligkeiten beobachtet wurden (Abbildung 6A, B). Etwa 5 Stunden nach Induktion der *b*-Genexpression waren in dem Stamm UVO35 (*alb1*;P<sub>*nari*</sub>:*bW2*, *bE1*) bei 70% aller Zellen und nach 12 Stunden bei fast allen Zellen deutliche Filamente mit leeren Abschnitten erkennbar (Abbildung 6F, K). Interessanterweise konnte der Stamm GE297 weder nach 5 noch nach 12 Stunden *b*-Genexpression lange Filamente mit leeren Abschnitten ausbilden, jedoch lösten sich die für den „multiple budding“-Phänotyp typischen sternförmigen Zellaggregate zum Teil auf, wobei die noch verbliebenen Knospen einer Mutterzelle begannen filamentös auszuwachsen (Abbildung 6H, M).



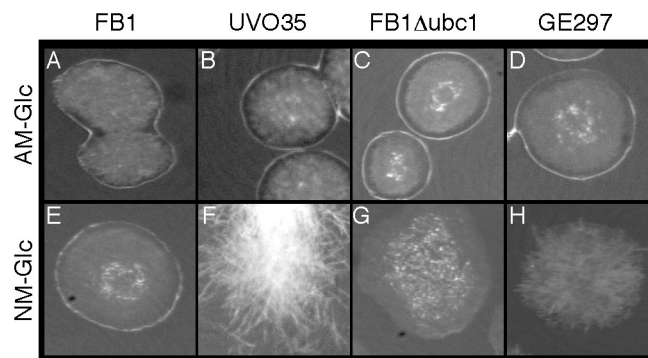
**Abbildung 6: Zellmorphologie von  $\Delta ubc1$ -Stämmen nach induzierter *b*-Genexpression.** In allen Fällen wurden die Zellen der entsprechenden Stämme (Stammbezeichnung über den Bildern angegeben) in AM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert und für 5 bzw. 12 h in NM-Glc induziert. Die Bilder zeigen charakteristische Einzelheiten von Zellen der jeweiligen Kultur. Die Analyse erfolgte mittels DIC-Mikroskopie an einem Axiophot II (Zeiss). Die weiße Pfeilspitze kennzeichnet ein Septum, das distal einen leeren Hyphenabschnitt abtrennt. Der schwarze Balken steht für einen Längenmaßstab von 10  $\mu m$ .

In einem weiteren Versuch wurde die Kolonimorphologie der oben verwendeten Stämme untersucht, da es von Interesse war, herauszufinden, welche Kolonimorphologie GE297-Zellen auf  $NO_3^-$ -Medium ausbilden. Zellen des Stammes UVO35 sollten auf  $NO_3^-$ -Medium weißlich, watteartig aussehende Kolonien ausbilden und Zellen des Stammes FB1 $\Delta ubc1$  sollten Kolonien mit einer leicht glänzende Oberfläche aufweisen.

Dabei zeigte sich, dass bei Kolonien, die von  $\Delta ubc1$ -Zellen gebildet werden, wie erwartet, sowohl auf AM- als auch NM-Medium eine leicht glänzende Oberfläche zu beobachten ist (Abbildung 7C, G). Ebenso erwartungsgemäß bildet der Stamm UVO35 (*alb1*;P<sub>*nari*</sub>:*bW2*, *bE1*) auf AM-Medium wildtyp-ähnliche Kolonien aus, wohingegen er auf  $NO_3^-$ -haltigem Medium stark filamentös wächst und die Kolonien dadurch eine watteartige Morphologie

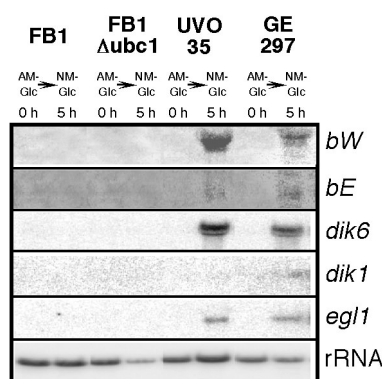


aufweisen (Abbildung 7B, F). Interessanterweise zeigt der Stamm GE297 (*alb1Δubc1*,  $P_{nar1}:bW2$ , *bE1*) auf  $\text{NO}_3^-$ -haltigem Medium einen intermediären Koloniephänotyp. Einerseits weisen Kolonien dieses Stammes die für  $\Delta ubc1$ -Stämme typische, leicht glänzende Oberfläche auf und andererseits sind auch kleine filamentöse Auswüchse zu erkennen (Abbildung 7H). Auf AM-Medium hingegen kann bei Kolonien dieses Stammes die glänzende Oberfläche der Kolonien beobachtet werden (Abbildung 7D). Wildtyp-Zellen werden in ihrem Kolonie-Phänotyp weder durch Ammonium noch durch Nitrat als Stickstoffquelle beeinflusst (Abbildung 7A, E).



**Abbildung 7: Koloniemorphologie von  $\Delta ubc1$ -Stämmen nach induzierter *b*-Genexpression.** In allen Fällen wurden die Zellen der entsprechenden Stämme (Stammbezeichnung über den Bildern angegeben) in AM-Glc bis zu  $\text{OD}_{600} \approx 0,5$  kultiviert und anschließend auf AM-Glc bzw. NM-Glc-Medium ausgebracht und für 48 h bei  $28^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Kolonien sind etwa sechsfach vergrößert dargestellt. Erläuterungen siehe Text.

Die Ergebnisse der Phänotypanalyse lassen den Schluss zu, dass der *b*-Komplex die cAMP-Kaskade negativ reguliert und die Effekte der cAMP-Kaskade zum Teil überspielen kann. Parallel zur Phänotypanalyse wurden alle Stämme in Northern-Analysen untersucht.



**Abbildung 8: *dik6*-, *dik1*- und *egl1*-Expression in  $\Delta ubc1$ -Stämmen.** Kultivierungsbedingungen und weitere Einzelheiten siehe Text. Für die 8 Spuren wurden die Stämme FB1 (*alb1*),  $\text{FB1}\Delta ubc1$  (*alb1\Delta ubc1*), UVO35 (*alb1*;  $P_{nar1}:bW2$ , *bE1*) und GE297 (*alb1\Delta ubc1*,  $P_{nar1}:bW2$ , *bE1*) in AM-Glc bis zu  $\text{OD}_{600} \approx 0,5$  angezogen und für 5 h in NM-Glc induziert. Die verwendeten Stämme sind über den Spuren angegeben. Pro Spur wurde jeweils  $10 \mu\text{g}$  RNA aufgetragen. Zur Mengenkontrolle wurden die Filter mit einer für 18S rRNA spezifischen Sonde hybridisiert.

Dabei zeigte sich, dass *bW*- als auch *bE*-Transkripte nach 5 Stunden in den Stämmen UVO35 (*a1b1*;P<sub>*nar1*</sub>:*bW2*, *bE1*) und GE297 (*a1b1Δubc1*, P<sub>*nar1*</sub>:*bW2*, *bE1*) gut nachweisbar sind, wohingegen unter reprimierenden Bedingungen keine Transkripte detektiert werden konnten (Abbildung 8). Für die drei untersuchten b-spezifisch exprimierten Gene *dik6*, *dik1* und *egl1* konnten unter Induktionsbedingungen Transkripte in den Stämmen UVO35 (*a1b1*;P<sub>*nar1*</sub>:*bW2*, *bE1*) und GE297 (*a1b1Δubc1*, P<sub>*nar1*</sub>:*bW2*, *bE1*) nachgewiesen werden, unter reprimierenden Bedingungen gelang dies nicht (Abbildung 8). Da die Gene *dik6*, *dik1* und *egl1* in einem Stamm, der einen konstitutiv aktiven cAMP-Signalweg und eine erhöhte Menge an *bW*- und *bE*-Transkripten aufweist und dabei nicht das typische b-Filament bildet (Brachmann, 2001), exprimiert werden, können sie als b-spezifische, filament-unabhängige Gene eingeordnet werden.

## 2.2 Charakterisierung des b-regulierten Gens *dik6*

Da sich von den bislang bekannten b-regulierten Genen *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1* keines als essentiell für die pathogene Entwicklung herausstellte, sollte anhand des *dik6*-Gens überprüft werden, ob b-regulierte Gene Virulenzfaktoren darstellen. Dazu wurde das von Bohlmann (1996) isolierte Gen *dik6* näher untersucht.

### 2.2.1 *dik6* kodiert für ein Siebentransmembranprotein

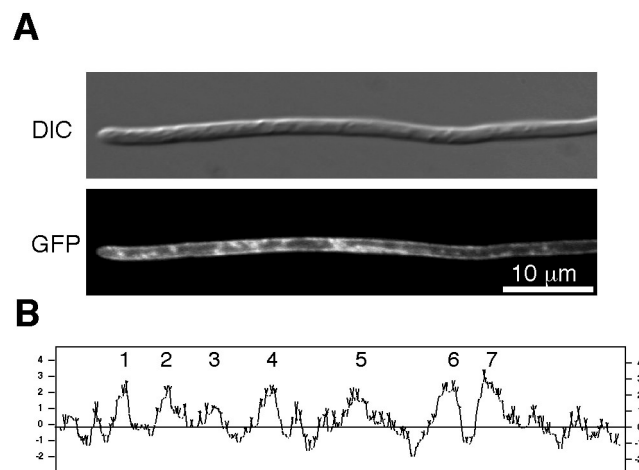
Für *dik6* konnte ein 1.543 bp großes cDNA Fragment aus einer Phagenbank isoliert werden (Bohlmann, 1996). Das daraus abgeleitete Polypeptid besteht aus 383 Aminosäuren und weist 4 Transmembrandomänen auf. Das Ende der cDNA liegt 252 bp hinter dem Translations-Stopkodon (Bohlmann, 1996), 426 bp hinter dem Translations-Stopkodon befindet sich das 3'-Ende eines divergent transkribierten Gens, das eine schwache Homologie zu dem hypothetischen Protein Y48A5A (Accession Number T33900; Courtney, L., Drone, K. und Wohlmann, P., direct submission) aus *Caenorhabditis elegans* aufweist. Ein Vergleich des isolierten *dik6*-cDNA Fragments mit der genomischen Sequenz ergab, dass sich stromaufwärts des angenommenen Translations-Startpunktes vier weitere potenzielle Startkodons (1. Startkodon bei – 408 bp, 2. Startkodon bei – 330 bp, 3. Startkodon bei –183 bp und 4. Startkodon bei –39 bp) in einem durchgehenden Leseraster befinden, dessen maximale Kapazität für ein putatives Polypeptid von 518 Aminosäuren kodiert. Um Hinweise darauf zu erhalten, ob das offene Leseraster für ein größeres Polypeptid kodiert als angenommen wurde (Bohlmann, 1996), sollte analysiert werden, ob in einer cDNA-Population von revers transkribierter RNA des Stammes HA103 (*albW2 bE1<sup>con</sup>*) mittels PCR längere *dik6*-cDNAs als die bislang isolierten nachgewiesen werden können. Dazu wurde das genspezifische Oligonukleotid OAN34 in Kombination mit den vier Oligonukleotiden OAN35, OAN36, OAN37 und OAN38, die stromaufwärts der weiteren potenziellen Translations-Startkodons an cDNA binden können, eingesetzt. Als Kontrolle wurde cDNA des Stammes FB1 (*alb1*) verwendet. Dabei führte die Verwendung von drei der vier Oligonukleotide (OAN35, OAN36, OAN37) zusammen mit dem genspezifischen Oligonukleotid OAN34 im Fall von cDNA aus HA103 (*albW2 bE1<sup>con</sup>*) als Matrize zu PCR-Amplifikaten der erwarteten Größe (Daten nicht gezeigt). Das vierte Oligonukleotid OAN38 ist etwa 600 bp stromaufwärts des 1. Startkodons gelegen und führte entweder aufgrund der gewählten PCR-Bedingungen und/oder aufgrund des Fehlens von cDNA-Molekülen, die diesen Bereich umfassen, zu keinem Reaktionsprodukt. Um potenzielle Transkriptionsinitiationsstellen für das *dik6*-Gen zu bestimmen, wurde ein sogenanntes 5'-Ligation Anchored RACE-Experiment (LA-RACE) (Troutt et al., 1992) durchgeführt. Dabei wurde RNA einer Mischung von FB1 (*alb1*) und FB2 (*a2b2*) nach 48 stündiger Inkubation

auf aktivkohlehaltigem CM-Medium isoliert, mit DNaseI verdaut und mit Hilfe des *dik6*-spezifischen Oligonukleotids OAN34 revers transkribiert. Mittels T4-RNA Ligase wurde anschließend an die freien 3'-OH-Enden der generierten cDNA-Moleküle ein am 3'-OH-Ende blockiertes und am 5'-Ende phosphoryliertes Oligonukleotid (OGW26) ligiert, um in einer darauf folgenden PCR-Reaktion eine spezifische Bindestelle für das Oligonukleotid OGW27 zu schaffen. Mit diesem Ansatz konnten 5 Transkriptionsinitiationsstellen zwischen – 101 bp und – 66 bp stromaufwärts des 1. Startkodons von *dik6* bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob stromaufwärts des 1. ATG-Kodons ein funktioneller, b-regulierter Promotor vorhanden ist, wurde dann das Hygromycin-Resistenz vermittelnde Gen *hph* (Tsukuda et al., 1988), das für eine Hygromycinphosphotransferase kodiert, transkriptionell mit dem 1. Startkodon bei +1 bp fusioniert und das resultierende Plasmid in den *U. maydis* Stamm AB31 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1*) (Brachmann et al., 2001) transformiert. Dieser haploide Stamm trägt *bW2*-und *bE1*-Gene, die ausgehend vom *crg1*-Promotor exprimiert werden (Bottin et al., 1996), wodurch in Arabinose-haltigem Medium eine starke Expression der *b*-Allele erfolgt, in Glucose-haltigem Medium hingegen die *b*-Genexpression reprimiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass das hergestellte *dik6*-Promotor:*hph* Konstrukt nach Induktion der *b*-Gene in der resultierenden Transformante GE41 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1Δdik6::hph*) Hygromycin-Resistenz vermittelt. Daraus lässt sich ableiten, dass der ORF des *dik6*-Gens für ein putatives Protein von 518 Aminosäuren kodiert.

Mit Hilfe des Programms BLAST2 (Altschul et al., 1990), das ähnliche Proteine in öffentlichen Datenbanken mittels eines heuristischen Algorithmus identifiziert, konnten keine Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit zu Dik6 gefunden werden. Jedoch ergab eine Analyse der Proteinstruktur mit den Programmen TMPRED (Hofmann und Stoffel, 1993) und TMHMM (Krogh et al., 2001), dass das Dik6-Protein sieben potenzielle Transmembrandomänen besitzt (Abbildung 9B). Diese Vorhersage wird durch das Ergebnis einer PROPSEARCH-Analyse (Hobohm und Sander, 1995) unterstützt. Im Unterschied zu anderen Homologie-Findungs-Algorithmen vergleicht der Algorithmus dieses Programms Proteine hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung, ihres Molekulargewichts und ihres isoelektrischen Punktes. Dabei wurden Ähnlichkeiten von Dik6 zu mehreren potenziellen G-Protein gekoppelten Siebentransmembranrezeptoren mit einer Wahrscheinlichkeit von >0,8 gefunden, wie z. B. ein putativer Glucocorticoid-induzierter, G-Protein gekoppelter Rezeptor der Maus (Accession Number NP\_034417) (Harrigan et al., 1991), der potenzielle Siebentransmembranrezeptor GprX des Fisches *Oryzias latipes* (Accession Number Q91178) (Yasuoka et al., 1995), der Neurotensin-Rezeptor Ntr1 der Ratte ( Accession Number P20789) (Tanaka et al., 1990) und der Octopamin-Rezeptor 2 aus der Schnecke *Lymnaea stagnalis* (Accession Number O01670) (Gerhardt et al., 1997).

Das Programm PSORTII (Nakai und Horton, 1999) prognostizierte zudem mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,565 eine Lokalisierung von Dik6 an der zytoplasmatischen Membran. Um die bioinformatisch getroffene Vorhersage, dass Dik6 ein integrales

Membranprotein ist, zu verifizieren, wurde versucht das *dik6*-Genprodukt *in vivo* zu lokalisieren. Dazu wurde eine C-terminale Fusion des eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) mit dem Dik6-Protein hergestellt. Aufgrund der Computeranalyse (Marck, 1988) sollte der C-Terminus von Dik6 zytoplasmatisch lokalisiert sein und damit das eGFP so gefaltet werden können, dass ein funktionelles Protein entstehen würde. Zu diesem Zweck wurde ein Teil des offenen Leserasters von *dik6* an der Basenpaarposition 1491 (entspricht der Aminosäureposition 497) translational mit dem Gen für eGFP fusioniert. Das entstandene Plasmid pGE106 wurde mittels homologer Rekombination in den *dik6*-Locus des *U. maydis* Stammes AB31 ( $a2 P_{crg}:bW2,bE1$ ) eingebracht. Der daraus resultierende Stamm GE59 ( $a2 P_{crg}:bW2,bE1, dik6::egfp$ ) wurde in CM-Glucose Medium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  angezogen und anschließend für 12 Stunden in CM-Medium mit Arabinose inkubiert. Dies sollte zur Produktion des bW2/bE1-Heterodimers führen, das die Expression des *dik6::egfp*-Fusionsgens bewirkt.



**Abbildung 9: Dik6 ist ein Siebentransmembranprotein.** A) DIC-Mikroskopie. Der Stamm GE59 ( $a2 P_{crg}:bW2,bE1;dik6::eGFP$ ) wurde in CM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert und anschließend für 12 h in CM-Ara inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels DIC-Mikroskopie an einem Axiophot II (Zeiss). Epifluoreszenz-Mikroskopie des Stammes GE59 ( $a2 P_{crg}:bW2,bE1;dik6::eGFP$ ) nach 12 h Inkubation in CM-Ara. Das Dik6::eGFP Fusionsprotein lokalisiert gleichverteilt mit einigen punktuellen Anhäufungen an der zytoplasmatischen Membran einer Hyphe. Der Längenmaßstab bezieht sich auf alle Abbildungen. B) Hydropathie-Plot des Dik6 Proteins. Hydrophile Aminosäuren haben Werte, die größer als Null sind, hydrophobe Aminosäuren haben Werte, die kleiner als Null sind. Es sind sieben Transmembranregionen angegeben.

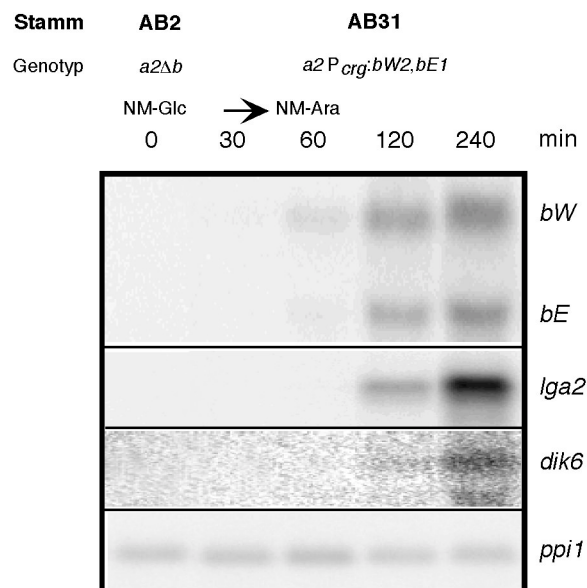
Wie bereits für AB31 gezeigt (Brachmann et al., 2001), wachsen Zellen des Stammes GE59 ( $a2 P_{crg}:bW2,bE1, dik6::egfp$ ) nach 12 Stunden Induktion in Arabinose-haltigem Medium aufgrund des Vorhandenseins aktiver bW/bE-Heterodimere zu langen Filamenten aus (Abbildung 9A). Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Analyse der Hyphen ergab, dass das Dik6::eGFP Fusionsprotein an der zytoplasmatischen Membran lokalisiert ist. Das Fusionsprotein war gleichmäßig über die gesamte zytoplasmatische Membran der Hyphe verteilt, daneben fanden sich auch einige punktuelle Akkumulationen des Fusionsproteins in

frühen Endosomen, die mit dem spezifischen Farbstoff FM4-64 anfärbbar sind (Abbildung 9A, Daten nicht gezeigt), was darauf hindeuten könnte, dass es von der Membran internalisiert wird. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das *dik6*-Genprodukt an der zytoplasmatischen Membran lokalisiert ist.

## 2.2.2 *dik6* ist ein frühes b-induziertes Gen

Aus Expressionsstudien ist bekannt, dass die Expression der beiden direkt b-regulierten Gene *frb52* und *lga2* 60 bzw. 120 Minuten nach Induktion von *bW2* und *bE1* im Stamm AB31 in Northern-Analysen nachgewiesen werden kann (Brachmann et al., 2001; Romeis et al., 2000). Die Expression der vermutlich indirekt durch b regulierten Gene *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1* erfolgt erst zu späteren Zeitpunkten (Brachmann et al., 2001; Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die zu einem frühen Zeitpunkt durch den b-Komplex induzierten Gene auch direkt durch aktive bW/bE-Heterodimere reguliert werden. Um *dik6* anhand seines Expressionszeitpunktes den frühen oder späten b-induzierten Genen zuzuordnen und damit Hinweise auf eine direkte oder indirekte Regulation durch das bW/bE-Heterodimer zu erhalten, wurde der Zeitpunkt der *dik6*-Genexpression ermittelt.

Für diesen Ansatz wurde eine Northern-Analyse durchgeführt. Dabei wurde erneut der Stamm AB31 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1*) verwendet. Als Kontrolle wurde der Stamm AB2 (*a2Δb*) verwendet, in dem der gesamte *b*-Locus deletiert und durch eine Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt ist (Brachmann, 2001; Romeis et al., 2000).



**Abbildung 10: *dik6* wird zum selben Zeitpunkt wie *lga2* exprimiert.** Northern-Analyse der Stämme AB2 (*a2Δb*) und AB31 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1*). Kultivierung siehe Text; zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde 10 µg RNA geladen. Zur Mengenkontrolle wurde der Filter mit einem Fragment des konstitutiv exprimierten Gens für die Peptidyl Prolyl, *cis-trans* Isomerase (*ppi1*) hybridisiert.

Die beiden Stämme wurden in CM-Medium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle bis zu  $OD_{600} \approx 0.5$  angezogen und anschließend in das gleiche Medium mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle überführt. Vor der Induktion und 30, 60, 120 sowie 240 Minuten nach der Induktion wurden Zellaliquots entnommen und die Expression von *lga2* und *dik6* analysiert.

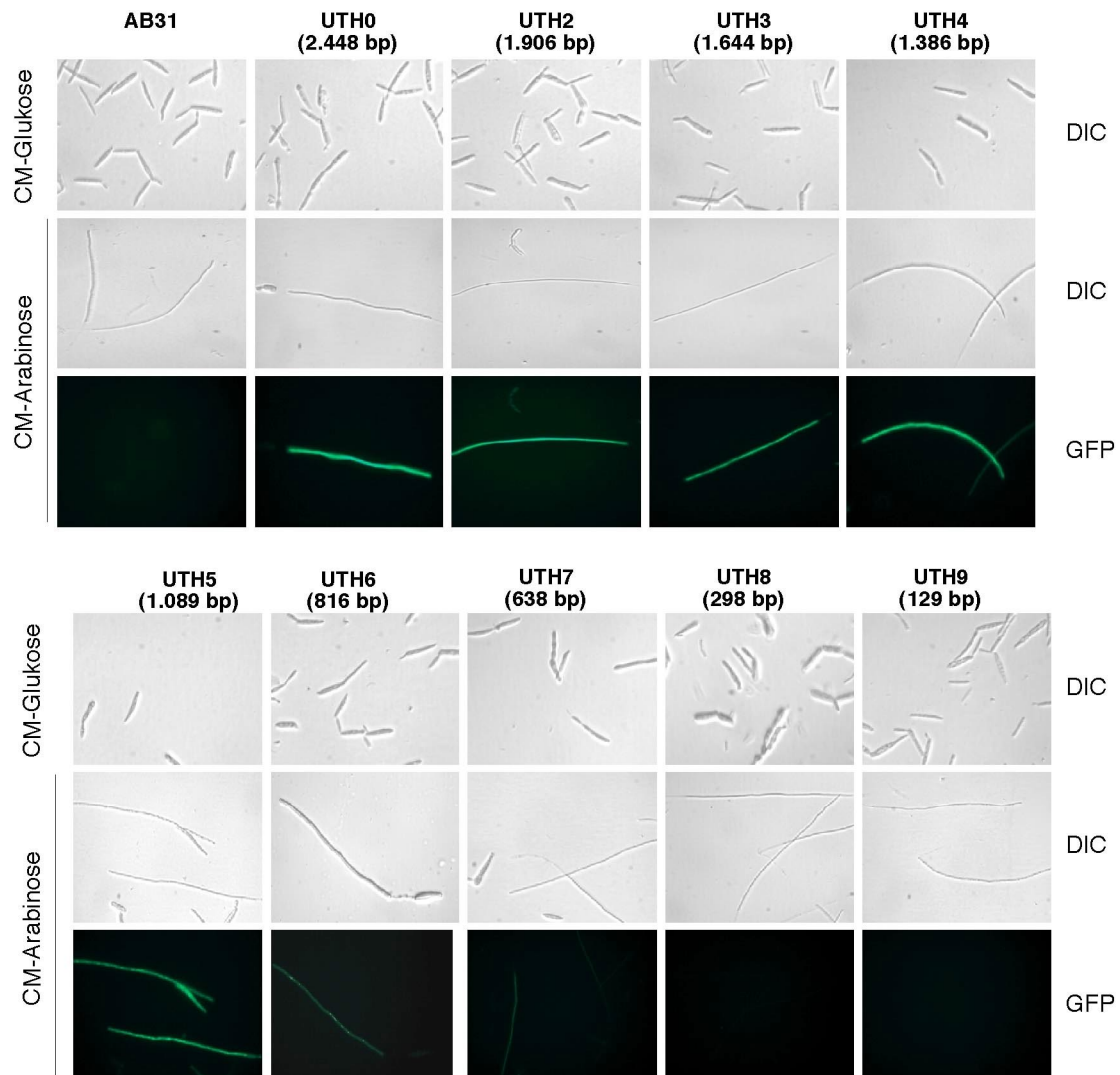
Dabei zeigte sich, dass sowohl *bW*- als auch *bE*-Transkripte schon 60 Minuten nach Induktion erkennbar sind. Unter reprimierenden Bedingungen ist dies nicht der Fall (Abbildung 10). Die Expressionsstärke der *b*-Gene erreicht nach 240 Minuten Induktion ihr Maximum und hält sich auf diesem Niveau für längere Zeit (Brachmann, 2001; Daten nicht gezeigt). Für die beiden *b*-regulierten Gene *dik6* und *lga2* konnten Transkripte in dem Stamm AB31 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1*) nachgewiesen werden, in dem Stamm AB2 (*a2Δb*) hingegen nicht. Dabei konnten Transkripte für beide Gene 120 Minuten nach Induktion der *b*-Gene nachgewiesen werden (Abbildung 10). Da *dik6* nach *b*-Geninduktion zu einem ähnlich frühen Zeitpunkt wie die beiden direkt *b*-regulierten Gene *lga2* und *frb52* (Brachmann et al., 2001; Romeis et al., 2000) exprimiert wird, galt *dik6* als ein weiterer Kandidat für ein direkt durch das *bW/bE*-Heterodimer reguliertes Gen.

### 2.2.3 *dik6*-Promotordeletionsanalyse

Um zu untersuchen, ob *dik6* ein direktes *b*-Zielgen ist, wurde zunächst damit begonnen, die Promotorsequenzen von *lga2* (Romeis et al., 2000) und *frb52* (Brachmann et al., 2001) mit dem *dik6* 5'-Bereich zu vergleichen. Bei dieser Analyse wurden mehrere Sequenzabschnitte entdeckt, die als mögliche *b*-Bindestellen in Frage kommen (Daten nicht gezeigt). Mittels einer Promotordeletionsanalyse sollten daraufhin Bereiche eingegrenzt werden, die eine *b*-abhängige Regulation der *dik6*-Genexpression vermitteln. Um den stromaufwärts liegenden Bereich des *dik6*-Gens für die Promotordeletionsanalyse festzulegen, wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die Analyse des 4.539 bp langen 5'-Bereichs von *dik6* zeigte, dass an Position -1.566 bp ein 2.967 bp langer, durchgehender ORF existiert, der divergent zu *dik6* transkribiert wird. Dieser ORF kodiert in *U. maydis* für das putative Polypeptid Usw2 (*Ustilago maydis* Swi/Snf), das mit 29 % identischen Aminosäuren eine signifikante Ähnlichkeit zu einem Swi/Snf-ähnlichen Protein aus *Arabidopsis thaliana* (Accession Number AAD28303) aufweist (Jeddeloh et al., 1999).

Nach der durchgeführten Sequenzanalyse wurde die 5'-Region für die *dik6*-Promotordeletionsanalyse auf ca. 2,5 kb begrenzt, da angenommen wurde, dass dieser Bereich, alle notwendigen regulatorischen Sequenzen enthält, zumal sich darauf ein Teil des divergent transkribierten *usw2*-Gens befindet und sich in bisher durchgeführten Promotoranalysen gezeigt hat, dass Bereiche von ca. 2 kb stromaufwärts des entsprechenden Translations-Startpunktes für eine zur Wildtypsituation identische Genregulation ausreichend waren (Basse et al., 2000; Hartmann et al., 1999). Auf diesem Bereich befinden sich 1.566 bp intergenische Region bis zum *usw2*-Translations-Startkodon und noch 882 bp des ORFs von

*usw2*. Für die *dik6*-Promotordeletionsanalyse wurden die freireplizierenden Plasmide pTH0, pTH2, pTH3, pTH4, pTH5, pTH6, pTH7, pTH8 und pTH9 hergestellt, die verschieden lange, mit *sgfp* fusionierte *dik6*-Promotorfragmente von 2.448 bp, 1.906 bp, 1.644 bp, 1.386 bp, 1.089 bp, 816 bp, 638 bp, 298 bp und 129 bp Länge enthalten. Die Verwendung des *sgfp*-Gens als heterologes Reportersystem erlaubt einerseits eine einfache und schnelle *in vivo*-Analyse der Reporter-genaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten und andererseits in Northern-Analysen eine Unterscheidung zwischen der Promotoraktivität der Deletionskonstrukte und der endogenen *dik6*-Promotoraktivität.



**Abbildung 11: *in vivo* Charakterisierung von *dik6*-Promotorregionen, die eine b-abhängige Regulation vermitteln.** Mikroskopische Aufnahmen von Zellen der Stämme AB31 und UTH0 bis UTH9. Kultivierung und Einzelheiten siehe Text; zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mittels DIC-Mikroskopie und Epifluoreszenz-Mikroskopie an einem Axiophot II (Zeiss) untersucht. Die obere Bildreihe zeigt Zellen der entsprechenden Stämme, die in CM-Glc inkubiert wurden, in der mittleren Bildreihe sind Zellen der entsprechenden Stämme gezeigt, die für 12 h in CM-Ara inkubiert wurden, die Bildreihe darunter zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des gleichen Ausschnitts.

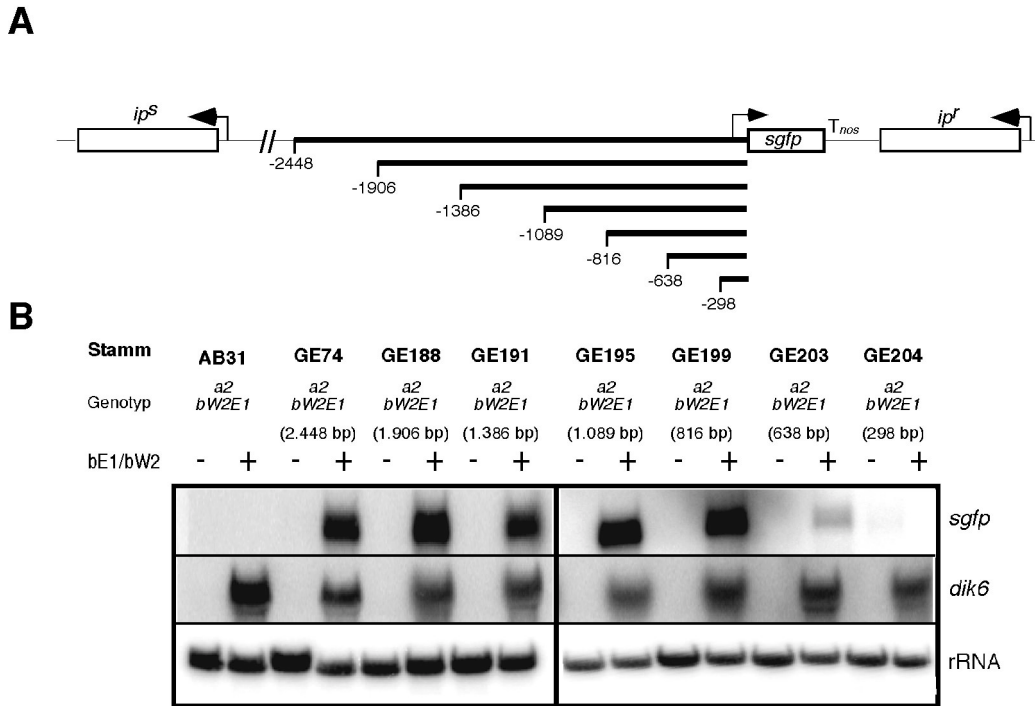


Dazu wurden die Plasmide in den *U. maydis* Stamm AB31 ( $a2 P_{crg}:bW2,bE1$ ) transformiert und die Transformanten auf Reportergenaktivität getestet. Zu diesem Zweck wurden die resultierenden Stämme UTH0, UTH2, UTH3, UTH4, UTH5, UTH6, UTH7, UTH8 und UTH9 in CM-Glucose Medium mit 2  $\mu\text{g/ml}$  Carboxin bis  $OD_{600} \approx 0,5$  angezogen und anschließend in das gleiche Medium mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle überführt.

Vor der Induktion und 5 sowie 12 Stunden nach der Induktion der *b*-Genexpression wurde die Aktivität der *dik6:sgfp*-Promotorfusionskonstrukte fluoreszenzmikroskopisch und in Northern-Analysen untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurde der *U. maydis* Stamm AB31( $a2 P_{crg}:bW2,bE1$ ) verwendet.

Nach 12 stündiger Induktion der *b*-Gene konnte beobachtet werden, dass die Zellen filamentös wuchsen, und die von 2.448 bp, 1.906 bp, 1.644 bp, 1.386 bp und 1.089 bp großen *dik6*-Promotorfragmenten vermittelte Stärke der Expression des *sgfp*-Reportergens war vergleichbar (Abbildung 11, 3. und 6. Bildreihe). Ein 816 bp und 638 bp langes Promotorfragment scheint eine geringere *sgfp*-Aktivität zu induzieren, ehe ab einer Promotorlänge von 298 bp Länge keine Reportergenaktivität mehr nachgewiesen werden kann (Abbildung 11, 6. Bildreihe). Bei keinem der verwendeten Stämme wurde grüne Fluoreszenz oder filamentöses Wachstum ohne Induktion der *bW2*- und *bE1*-Gene beobachtet (Daten nicht gezeigt und Abbildung 11, 1. und 4. Bildreihe).

Die aus diesem Versuch erhaltenen Ergebnisse der Promotordeletionsstudie wurden mittels Northern-Analysen von AB31-Derivaten bestätigt, die die Plasmide pTH11, pTH13, pTH15, pTH16, pTH17, pTH18 und pTH19, in denen *dik6* 5'-Bereiche von 2.448 bp, 1.906 bp, 1.386 bp, 1.089 bp, 816 bp, 638 bp und 298 bp Länge am *dik6* Translations-Startkodon mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurden, als singuläre Kopie im *ip*-Locus enthalten (Abbildung 12A). Dazu wurden die korrespondierenden Stämme GE74, GE188, GE191, GE195, GE199, GE203 und GE204 in CM-Medium mit Glucose bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  angezogen und anschließend in das gleiche Medium mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle überführt, wodurch die *b*-Genexpression induziert wurde. Als zusätzliche Kontrolle wurde der Stamm AB31 verwendet. Vor der Induktion und 5 Stunden nach der Induktion wurden Aliquots entnommen und die Expression der *b*-Gene und von *dik6* in allen Stämmen auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Abbildung 12B). *dik6*-Promotorfragmente, die an den Positionen – 2.448, – 1.906, – 1.386, – 1.089 und – 816 beginnen, führen nach Induktion zu einer ähnlichen *sgfp*-Expression. Das Fragment von 638 bp Länge vermittelte eine deutliche geringere Transkription des *sgfp*-Reportergens (Abbildung 12B). Das Promotorfragment von 298 bp Länge vermittelte selbst nach siebentägiger Exposition der Autoradiographie sowohl mit als auch ohne vorherige Induktion der *b*-Gene ein kaum nachweisbares *sgfp*-Transkript (Daten nicht gezeigt).



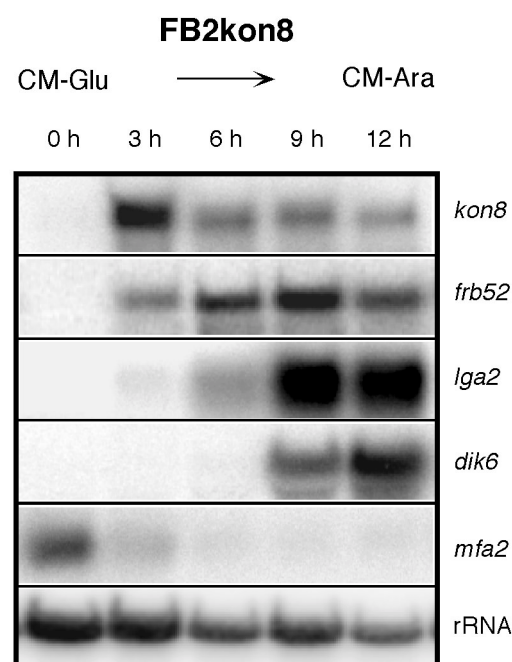
**Abbildung 12: Eingrenzung cis-aktiver Promotor-Elemente für eine b-abhängige Regulation von *dik6*.** **A)** Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *ip*-Locus nach singularärer homologer Integration der verschieden langen *dik6*-Promotor:*sgfp* Reporterkonstrukte. Die entsprechenden Stämme sind: GE74 (2.448 bp), GE188 (1.906 bp), GE191 (1.386 bp), GE195 (1.089 bp), GE199 (816 bp), GE203 (638 bp) und GE204 (298 bp). **B)** Northern-Analyse der *dik6*-Promotor:*sgfp* Reporterstämme. Kultivierung siehe Text; zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde 10 µg RNA geladen. Zur Mengenkontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer für 18S rRNA spezifischen Sonde durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse beider Studien, dass die Region zwischen 1.089 bp und +1 des *dik6*-Promotors die b-abhängige Regulation vermittelt. Zwischen – 816 bp und – 298 bp sind offensichtlich die cis-regulatorischen Elemente für eine Kontrolle durch den *trans*-aktivierenden b-Komplex lokalisiert und in dem Bereich zwischen – 638 bp und – 298 bp könnten sich Elemente befinden, die ein negativ regulatorisch wirkender Faktor zur Kontrolle der *dik6*-Expression benötigt, da ein 298 bp langes Promotorfragment auch b-unabhängig zur Aktivierung des Reporterkonstrukts führt (siehe Abschnitt 2.4.2).

### 2.2.4 *dik6* ist ein direktes b-Zielgen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *dik6* ein frühes b-induziertes Gen ist und der *dik6*-Promotor auf einen Bereich eingrenzt werden konnte, der für die b-abhängige Regulation notwendig ist, sollte eine direkte b-Abhängigkeit der *dik6*-Expression, also eine Bindung des b-Komplexes an den *dik6*-Promotor, durch Gelretardations- und DNase-Schutz-Analysen in Anwesenheit des bW/bE-Heterodimers nachgewiesen werden. Da bW- und bE-Proteine nicht in löslicher, biologisch aktiver Form exprimiert werden können (Romeis et al., 2000) wird für

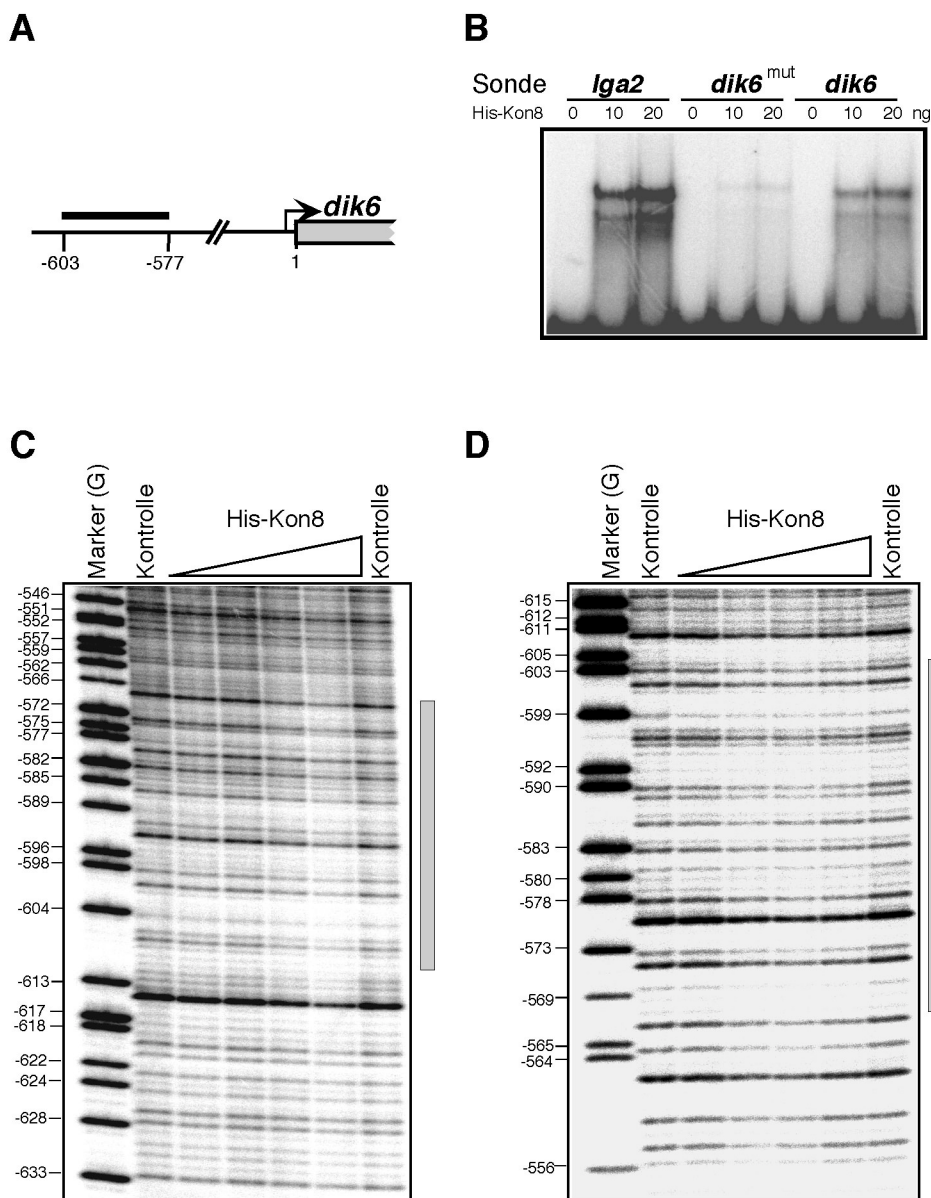
*in vitro* Experimente His-Kon8, ein biologisch aktives, verkürztes bW-bE Fusionsprotein verwendet (Romeis et al., 2000). In einem Vorversuch wurde zunächst untersucht, ob His-Kon8 die Transkription von *dik6* induzieren kann. Dazu wurde ein FB2 (*a2b2*)-Stamm benutzt, in dessen *ip*-Locus ein Konstrukt eingebracht wurde, das *his-kon8* unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors exprimiert (Brachmann, 2001). Bei der Northern-Analyse dieses Stammes konnte 3 Stunden nach Transfer in arabinosehaltiges Medium ein deutliches *his-kon8*-Signal detektiert werden, das zu diesem Zeitpunkt ein Maximum erreichte, ehe es auf ein mittleres Niveau zurückging (Abbildung 13). In diesem Stamm war die Expression von *dik6* erst 9 Stunden nach Induktion nachweisbar. Dieser Zeitpunkt ist später als im Stamm AB31 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1*), in dem schon 2 Stunden nach *b*-Induktion ein schwaches *dik6*-Signal detektiert werden kann (Abbildung 10). Dieser Befund ist mit der ebenfalls leicht verzögerten Induktion der bekannten b-regulierten Gene *frb52* und *lga2* (Brachmann, 2001) nach 3 bzw. 6 Stunden und der verzögerten Repression des b-regulierten *mfa2*-Gens nach etwa 3 bis 6 Stunden konsistent (Abbildung 13). Dies ist vermutlich auf die schon früher beobachtete geringere Aktivität von His-Kon8 im Vergleich zum bW/bE-Heterodimer zurückzuführen (Romeis et al., 1997). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass His-Kon8 die Expression von *dik6* in *U. maydis* reguliert und damit für biochemische *in vitro*-Studien geeignet ist.



**Abbildung 13: Genregulation durch His-Kon8 in *U. maydis*.** Zellen wurden in CM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  angezogen und anschließend in CM-Ara induziert. Vor Induktion und zu den angegebenen Zeitpunkten danach wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde etwa 10  $\mu$ g RNA aufgetragen. Zur Mengenkontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer für 18S rRNA spezifischen Sonde durchgeführt.

Um die Bindung von His-Kon8 an den *dik6*-Promotor *in vitro* nachzuweisen, wurden verschiedene, etwa 300 bp lange, überlappende Fragmente aus dem 5'-Bereich in Gelretardationsexperimenten getestet, die den Bereich zwischen -1.386 und +1 bp des Promotors umfassen. Dabei konnte lediglich mit einem Fragment, auf dem sich der Bereich zwischen - 638 bp und - 298 bp befindet, ein His-Kon8/DNA-Komplex nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Um den Bereich weiter einzugrenzen, wurde dieser 340 bp große *dik6* 5'-Bereich in vier überlappende Fragmente (FR1: - 638 bp bis - 496 bp, FR2: - 496 bp bis - 298 bp, FR3: - 638 bp bis - 565 bp, FR4: - 565 bp bis -298 bp) zerlegt. Von diesen wiesen nur FR1 und FR3 eine deutliche Bindung an His-Kon8 auf (Daten nicht gezeigt). In dieser Region befindet sich eine 26 bp lange Sequenz, die den bereits bekannten b-Bindestellen im *lga2*- und *frb52*-Promotor ähnelt, und damit eine mögliche Bindestelle für das bW/bE-Heterodimer darstellt. Um zu überprüfen, ob diese 26 bp große Sequenz einen Komplex mit His-Kon8 ausbilden kann, wurde in einem Gelretardationsexperiment ein Fragment eingesetzt, das den Bereich zwischen - 603 bp und -577 bp vor *dik6* umfasst (Abbildung 14A). Dabei konnte eine signifikante Bindung von His-Kon8 beobachtet werden, die fast vollständig unterbunden wird, wenn an den Positionen - 592, - 590 und - 583 drei G- zu A-Transitionen eingeführt werden (Abbildung 14B). Die G-Reste an diesen Stellen im *dik6*-Promotor stimmen mit denen der b-Bindestelle im *lga2*-Promotor überein und sind dort für die Bindung von His-Kon8 wichtig (Romeis et al., 2000).

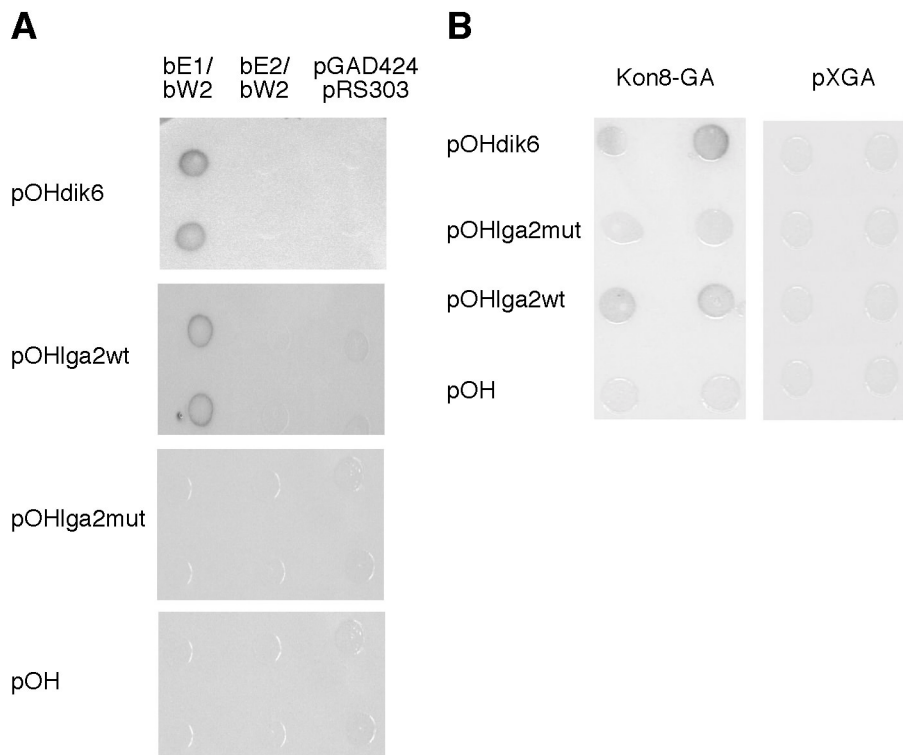
Für die weitere Charakterisierung der von His-Kon8 gebundenen Sequenz wurde mit einem Fragment, das die Region zwischen - 681 bp und - 518 bp enthält, eine DNase-Protektionsanalyse durchgeführt. Für diese Art von Experiment wird die Tatsache ausgenutzt, dass DNA-gebundene Proteine das DNA-Molekül an der Bindungsstelle vor dem Angriff der Nuklease schützen. Für diesen Versuch wurde die DNA einseitig markiert und es konnte sowohl auf dem Plus- als auch auf dem Minus-Strang eine durch die Bindung von His-Kon8 vor DNase-Angriff geschützte Region von etwa 36 bp identifiziert werden (Abbildung 14C, D). Diese schwach geschützte Region liegt zwischen - 604 bp und - 568 bp und fällt mit der 26 bp langen Sequenz des Fragments zwischen den Positionen - 603 und - 577 zusammen, von dem bereits die Komplexbildung mit His-Kon8 gezeigt werden konnte. Die b-Bindestelle liegt somit in einem Bereich des Promotors, der nur noch eine reduzierte b-abhängige *dik6*-Expression vermitteln kann, wenn weiter oberhalb liegende Sequenzen deletiert sind (siehe Abbildung 12) Möglicherweise befindet sich stromaufwärts der ermittelten b-Bindestelle noch ein regulatorisches Element eines unbekanntes Transkriptionsfaktors. Dadurch könnte die *in vivo* beobachtete reduzierte Genexpression nach Deletion des Bereiches zwischen - 816 bp und - 638 bp erklärt werden.



**Abbildung 14: Charakterisierung der b-Bindestelle im *dik6*-Promotor.** **A)** Schematische Darstellung der Lage des für die Gelretardationsanalyse verwendeten Fragments (dicker schwarzer Balken) aus dem *dik6*-Promotor. **B)** Gelretardationsanalyse mit dem *dik6*-Promotorfragment, das die wildtypische Sequenz der b-Bindestelle enthält; dem *dik6*-Promotorfragment, in dem drei Punktmutationen in die b-Bindestelle eingeführt wurden und dem *lga2*-Promotorfragment, das die b-Bindestelle *bbs1* trägt und His-Kon8, Einzelheiten siehe Text. Es treten drei verschieden große His-Kon8/DNA-Komplexe auf, was auch schon bei der Untersuchung des *lga2*-Promotors beobachtet wurde. Sie sind vermutlich mit Bindung von C-terminal verkürzten His-Kon8-Abbauprodukten an die jeweiligen DNA-Fragmente zu erklären (Romeis et al., 2000). **C)** und **D)** DNase-Protektionsanalyse des Plus- und des Minus-Strangs. His-Kon8 wurde in steigenden Konzentrationen von 9,9, 30, 90 und 270 ng/ $\mu$ l eingesetzt, weitere Einzelheiten siehe Text. Geschützte Bereiche sind durch graue Balken verdeutlicht.

Die in den Retardationsanalysen mit His-Kon8 erhaltenen Ergebnisse wurden *in vivo* in einem modifizierten Hefe Ein-Hybrid System (Romeis et al., 2000) überprüft. In diesem System sind bW- und bE-Proteine in der Lage, ein funktionelles Heterodimer zu bilden (Romeis et al., 2000). Dazu wurden ein 340 bp *dik6*-Promotorfragment, auf dem sich der

Bereich zwischen – 638 bp und – 298 bp befindet; ein 241 bp *lga2*-Promotorfragment, auf dem sich die bereits bekannte Bindestelle für das bW/bE-Heterodimer befindet sowie ein 241 bp *lga2*-Promotorfragment, auf dem sich eine b-Bindestelle befindet, die so mutiert wurde, dass sie keine Bindung mehr vermittelt (Romeis et al., 2000), in den *lacZ*-Expressionsvektor pOH (Brachmann, 2001) kloniert. Dieser Vektor enthält eine singuläre *SmaI*-Schnittstelle, die es ermöglicht die genannten Fragmente vor den *S. cerevisiae cycl1*-Basalpromotor einzusetzen. Der *cycl1*-Promotor ist transkriptionell an ein *lacZ*-Reportergen fusioniert. Die resultierenden Plasmide pOHdik6, pOHlga2wt, pOHlga2mut und pOH als Kontrolle wurden zusammen mit den Expressionsplasmiden pScE1, pScW2, pScE2 und pScKon8-GA (Romeis et al., 2000) in verschiedenen Kombinationen in Hefe transformiert. pScE1, pScW2 und pScE2 exprimieren bE1-, bW2- und bE2-Proteine.



**Abbildung 15: Bindung des bE1/bW2-Heterodimers und des Fusionsproteins Kon8-GA an die *dik6* b-Bindestelle *in vivo*.** Plasmide mit den entsprechenden Reporterkonstrukten, die ein Fragment tragen, das die *dik6* b-Bindestelle enthält (pOHdik6) oder die wildtypische *lga2* b-Bindestelle (pOHlga2wt) oder die mutierte *lga2* b-Bindestelle (pOHlga2mut) oder kein Fragment (pOH), wurden in **A**) mit Plasmiden, die bE1 (pScE1), bE2 (pScE2), bW2 (pScW2) exprimieren und mit pGAD424 und pRS303 als Kontrollen, kotransformiert. In **B**) wurden dieselben Plasmide zusammen mit einem Plasmid, welches das Fusionsprotein Kon8-GA exprimiert oder mit pXGA als Kontrolle, kotransformiert. Transformanten wurden mittels eines qualitativen Plattentests auf die Aktivität des *lacZ*-Reportergens untersucht.

Nur die Koexpression von bE1 und bW2 resultierte in einer Aktivierung des Reportergens, wenn gleichzeitig das Plasmid pOHdik6, das die Bindesequenz für das bW-bE Fusionsprotein His-Kon8 trägt, in den Hefezellen vorhanden war. In Hefezellen, die bE2- und bW2-Proteine

exprimieren, konnte keine *lacZ*-Aktivität beobachtet werden. Eine Selbstaktivierung der Reporterkonstrukte kann ausgeschlossen werden, da die beiden Ausgangsvektoren pGAD424 und pRS303, in denen die verschiedene b-Allele kloniert worden waren, in Hefezellen keine Reportergenaktivität vermitteln (Abbildung 15A).

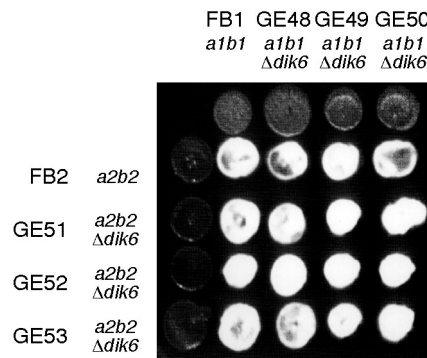
Das Kon8-Protein, das mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne versehen wurde (Kon8-GA) (Romeis et al., 2000) war ebenfalls in der Lage das Reporterkonstrukt zu aktivieren, wenn die Hefezellen das Plasmid pOHdik6 trugen. Eine Selbstaktivierung des Reportergenkonstrukts war nicht zu beobachten, da der für die Klonierung des Kon8-GA-Konstrukts verwendete Vektor pXGA (Kämper et al., 1995) nicht in der Lage war, *lacZ*-Aktivität zu induzieren (Abbildung 15 B). Die Funktionalität und Spezifität von bE/bW-Proteinen und von Kon8-GA konnte gezeigt werden, indem nur kompatible bW- und bE-Proteine eine Aktivierung des Reportergens bewirkten, wenn in den Hefezellen gleichzeitig das Plasmid pOHlga2wt mit der b-Bindesequenz des *lga2*-Promotors vorhanden war, wohingegen keines der Proteine *lacZ*-Expression induzierte, wenn das Plasmid pOHlga2mut, das eine mutierte b-Bindesequenz trägt, vorhanden war (Abbildung 15A, B).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Versuche zur Bindung des Fusionsproteins His-Kon8 bzw. des bW/bE-Heterodimers an die postulierte b-Bindestelle im *dik6*-Promotor den Schluss zu, dass es sich bei *dik6* um ein direkt b-reguliertes Gen handelt.

### 2.2.5 *dik6*-Deletionsmutanten weisen eine reduzierte Pathogenität auf

Nachdem gezeigt werden konnte, wie *dik6* reguliert wird und wo das Genprodukt lokalisiert ist, wurde zur Untersuchung der Funktion des Gens eine Deletionsmutante hergestellt. Es wurden bereits *dik6*-Deletionsmutanten hergestellt (Bohlmann, 1996), bei denen jedoch nicht das komplette Gen entfernt worden war. Daher wurde eine Deletionsmutante hergestellt, bei der in dem Stamm FB2 (*a2b2*) der 1.557 bp große ORF entfernt und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt ist. Um kompatible  $\Delta$ *dik6*-Stämme des Genotyps *a1b1* zu erhalten, wurden eine Segregationsanalyse durchgeführt. Dazu wurden Sporen aus Tumoren nach Infektion einer Mischung der FB2-Transformante GE 47 (*a2b2*  $\Delta$ *dik6*) und einem FB1- (*a1b1*) Stamm isoliert und ausgekeimt. Die daraus hervorgegangenen haploiden Sporidien wurden typisiert und konnten sowohl der Genotypklasse *a1b1*  $\Delta$ *dik6* (GE48, GE49 und GE50) als auch der Genotypklasse *a2b2*  $\Delta$ *dik6* (GE51, GE52 und GE53) zugeordnet werden. Diese *dik6*-Deletionsstämme zeigten weder im Wachstumsverhalten noch in der Zellmorphologie erkennbare Unterschiede zu Wildtyp-Stämmen (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich ihres Kreuzungsverhaltens war auf aktivkohlehaltigem Festmedium keine Differenz zu den jeweiligen Wildtyp-Stämmen zu beobachten (Abbildung 16).





**Abbildung 16: Kreuzungsverhalten der *dik6*-Deletionsmutanten.** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung der dikaryotischen Filamente wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte weiß.

In Bezug auf die Pathogenität bei Infektion von Maispflanzen zeigten Mischungen kompatibler *dik6*-Deletionsstämme im Vergleich zu Mischungen kompatibler Wildtyp-Stämme eine um 57% reduzierte Bildung von Tumoren (Tabelle 1), während die Anthocyan-Reaktion der Maispflanzen nach Injektion von kompatiblen Deletionsmutanten keine signifikanten Abweichungen zu einer Injektion von Wildtyp-Stämmen aufweist (Daten nicht gezeigt). Die von *dik6*-Nullmutanten gebildeten Tumore unterscheiden sich bezüglich ihres Aussehens, ihrer Größe und ihrer Anzahl nicht von Wildtyp-Tumoren (nicht gezeigt). Ebenso zeigten sich weder bei der Bildung von Brandsporen innerhalb der Tumore noch bei der Keimung der Sporen Unterschiede zum Wildtyp (nicht gezeigt).

**Tabelle 1: Pathogenität der *dik6*-Deletionsmutanten**

Inoculum	Infizierte Pflanzen*	Tumorbildung in %
FB1 x FB2	115	98%
GE48 x GE51	120	44%
GE49 x GE52	108	44%
GE50 x GE53	106	45%
GE37	86	74%
GE289	90	14%
GE290	91	11%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung 14 Tage nach Infektion.

Zusätzlich zu den Deletionen in den Stämmen FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) wurde in dem haploiden solopathogenen Stamm GE37 (*a1 bW2bE1, P<sub>o2tef</sub>:egfp*) in gleicher Weise wie bereits beschrieben eine *dik6*-Nullmutante erzeugt. GE37 ist ein CL13 (*a1 bW2bE1*)-Derivat und enthält im *ip*-Locus eine singuläre Kopie des Plasmids p123 (Aichinger, 2000; Basse et al., 2000), auf dem das *egfp*-Gen transkriptionell mit dem starken, konstitutiven *o2tef*-Promotor



fusioniert ist (Spellig et al., 1996). Resultierende Transformanten sollten in der Lage sind, Maispflanzen ohne vorherige Fusion erfolgreich zu infizieren, und können daher zur Analyse von Postfusions-Ereignissen dienen. Einzelinfektionen mit den Transformanten GE289 und GE290 (*a1bE1bW2 Δdik6*,  $P_{o_{2ter}}:egfp$ ) zeigten, ähnlich wie Infektionen mit Mischungen von kompatiblen *dik6*-Nullmutanten, eine Reduktion in der Zahl von Pflanzen, die Tumore ausbilden (11% bis 14% im Vergleich zu 74% bei GE37) (Tabelle 1). Da die Reduktion der Pathogenität in gleicher Weise bei den Mischungen kompatibler, haploider *dik6*-Nullmutanten als auch bei den haploiden, solopathogenen *dik6*-Nullmutanten auftritt, kann gefolgert werden, dass die Deletion von *dik6* zu einem Postfusionsdefekt führt.

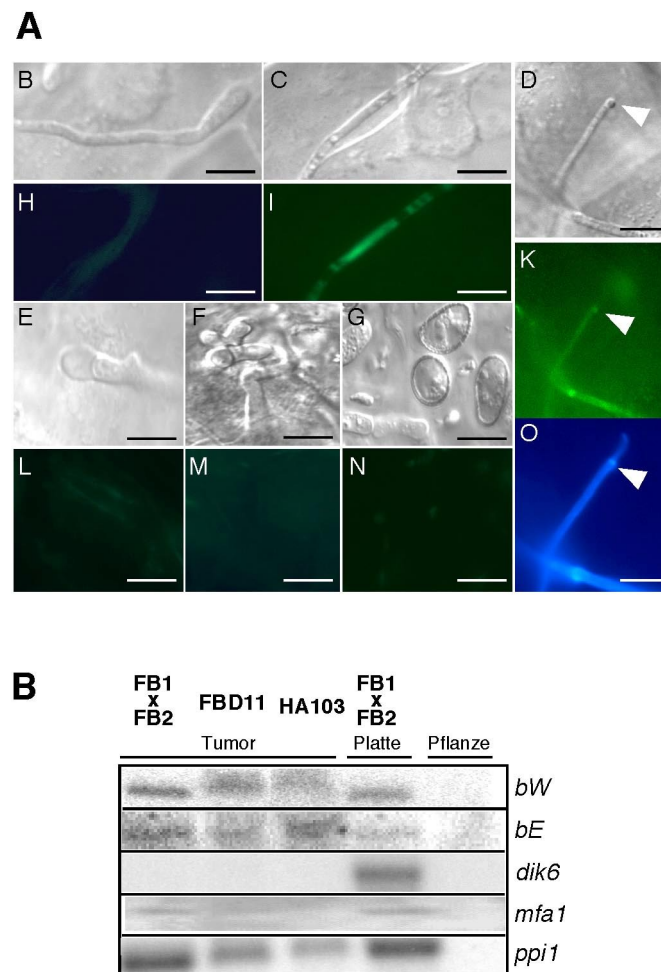
### 2.2.6 *dik6* ist in der frühen Infektionsphase exprimiert

Um herauszufinden, in welchem Infektionsstadium *dik6* exprimiert ist, wurde in einer Untersuchung der Transkription von *dik6* während der biotrophen Phase von *U. maydis* versucht, den genauen Zeitpunkt der *dik6*-Expression zu ermitteln. Dazu wurden zunächst Northern-Analysen durchgeführt. Maispflanzen wurden mit einer Mischung von FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*), dem diploiden, solopathogenen Stamm FBD11 (*a1a2b1b2*) und dem haploid solopathogenen Stamm HA103 (*a1 bW2bE1<sup>con</sup>*) infiziert und die Tumore 16 Tage nach Infektion geerntet. Anschließend wurde die Expression der Gene *dik6*, *mfa1*, *bW* und *bE* in Tumorgewebe bestimmt und mit der Expression derselben Gene in einer Mischung von Zellen der Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*), die für 24 Stunden auf aktivkohlehaltigen NM-Medium inkubiert wurden, verglichen. Als zusätzliche Kontrolle wurde RNA aus nicht-infiziertem Pflanzengewebe in die Analyse miteinbezogen. Die mRNA-Menge aus den verschiedenen Präparationen war anhand der konstitutiven Expression des *ppi1*-Gens (Bohlmann, 1996; Brachmann, 2001) normalisiert worden, so dass in allen Spuren vergleichbare Mengen an pilzlicher RNA geladen waren. In der Spur mit Pflanzen-RNA (nicht-infiziertes Gewebe) wurden ca. 30 µg geladen.

*dik6*-Expression konnte dabei nur in einer Mischung kompatibler Wildtyp-Stämme, die auf artifiziellem Medium inkubiert worden war, nachgewiesen werden. In den untersuchten Tumorgeweben konnten keine *dik6*-Transkripte detektiert werden, obwohl sowohl *bW*- als auch *bE*-Transkripte und *mfa1* nachweisbar waren (Abbildung 17B). Möglicherweise ist die *dik6*-Transkriptmenge in Tumoren so gering, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Da die geringe pilzliche Biomasse von *U. maydis* in der frühen Infektionsphase einer Maispflanze und im weiteren Verlauf der biotrophen Phase eine Untersuchung der Genexpression mit Hilfe einer Northern-Analyse nicht zulässt, es aber von besonderem Interesse war, die Expression von *dik6* auf der Pflanzenoberfläche und in den Frühstadien der Infektion zu analysieren, wurden kompatible *dik6:sgfp*-Reporterstämme hergestellt. Diese Stämme erlauben es, *dik6*-Expression während des gesamten Infektionsverlaufs in jedem Stadium zu definierten Zeitpunkten zu beobachten. Dazu wurde ein 2.448 bp großes Fragment

des *dik6* 5'-Bereichs am Translations-Startkodon von *dik6* transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen fusioniert und in den *ip*-Locus der Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) eingebracht. Von diesem Promotorfragment wurde gezeigt, dass es eine b-abhängige Regulation von *dik6* vermittelt (siehe Abschnitt 2.2.3). Mit einer Mischung der resultierenden Transformanten GE112 (*a1b1P<sub>dik6</sub>:sgfp*) und GE113 (*a2b2P<sub>dik6</sub>:sgfp*) wurden Maispflanzen infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurde Pflanzenmaterial entnommen, um die Expression von *dik6* in den frühen Stadien der Infektion fluoreszenzmikroskopisch zu analysieren. Auf der Blattoberfläche waren zugleich Sporidien, Konjugationshyphen ausbildende Sporidien und Dikarien zu sehen. Ein Teil der Dikarien bildete überdies Appressorien-ähnliche Penetrationsstrukturen aus (Abbildung 17A, Bilder C, D). Vor der Fusion zeigten die beiden haploiden Reporterstämme auf der Pflanzenoberfläche keine Fluoreszenz, wohingegen eine deutliche Zunahme der Reporterogenaktivität in einem nach Zellfusion entstandenen Dikaryon zu beobachten war (Abbildung 17A, Bilder H, I). Auch in den Appressorien-ähnlichen Strukturen eines Dikaryons konnte *dik6*-Expression nachgewiesen werden, aber nach der Penetration der Maispflanze scheint das Gen nicht mehr exprimiert zu sein, da grüne Fluoreszenz nur in dem Teil der Hyphe beobachtet werden konnte, der sich noch auf der Pflanzenoberfläche befindet (Abbildung 17A, Bilder D, K). Eine Färbung mit FungiFluor™ zeigt, dass die Spitze des penetrierenden Dikaryons bereits eingedrungen ist, während sich der distale Teil noch außerhalb der Pflanze befindet (Abbildung 17A, Bild O). Um *sgfp*-Expression in späteren Stadien der biotrophen Phase von *U. maydis* zu untersuchen, wurden Schnittpräparate von infizierten Maisblättern und Tumorgewebe angefertigt. Die dabei isolierten Stadien wurden anhand morphologischer Merkmale voneinander unterschieden und auf grüne Fluoreszenz untersucht. Dabei konnte in verzweigten dikaryotischen Hyphen, sporogenen Hyphen, unreifen und reifen Teliosporen keine Aktivität des *sgfp*-Reportergens nachgewiesen werden (Abbildung 17A, Bilder E, F, G, L, M, N).

Zusammenfassend lassen es die gezeigten Ergebnisse wahrscheinlich erscheinen, dass die Expression von *dik6* auf Stadien beschränkt ist, die nach der Fusion kompatibler Zellen auf der Pflanzenoberfläche während der frühen Infektionsphase von *U. maydis* ausgebildet werden. Möglicherweise ist aber die Expressionsstärke von *dik6* nicht ausreichend, um Fluoreszenz nach dem Eindringen in das Pflanzengewebe, das selbst Autofluoreszenz zeigt, zu detektieren.

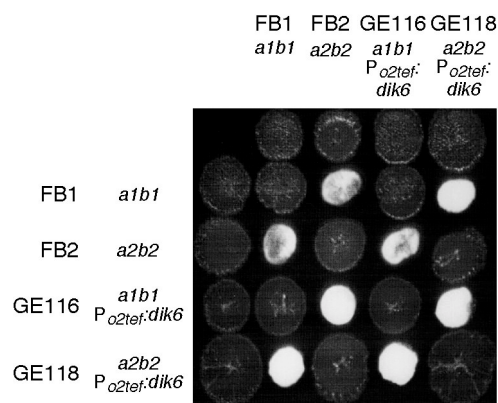


**Abbildung 17: *dik6:sgfp* Expression während der biotrophen Phase von *U. maydis*.** **A)** Die Bilder B bis G zeigen DIC-Mikroskopiebilder der *dik6:sgfp* Reporterstämme während verschiedener Infektionsstadien. Maispflanzen wurden mit einer Mischung der Reporterstämme GE112 (*alb1 P<sub>dik6</sub>:sgfp*) und GE113 (*a2b2 P<sub>dik6</sub>:sgfp*) infiziert. Nach 12 h, 24 h und 36 h und dann im Abstand von zwei Tagen nach der Infektion wurden Proben lichtmikroskopisch (DIC) auf Pilzstrukturen untersucht, die Morphologie bestimmt und daraus einzelnen Entwicklungsstadien zugeordnet. **B:** Sporidien, die 12 h nach Infektion Konjugationshyphen ausbilden; **C:** Elongierte Hyphe, die 24 h nach Infektion auf der Blattoberfläche wächst; **D:** Hyphe, die 36 h nach Infektion an ihrer Spitze eine Appressorien-ähnliche Penetrationsstruktur ausbildet (gekennzeichnet durch weiße Pfeilspitze); **E:** Dikaryon, das 5 Tage nach Infektion in der Pflanze wächst und sich verzweigt; **F:** Sporogene Hyphen, etwa 8 Tage nach Infektion; **G:** Prä- und Teliosporen eines Blatt-Tumorquerschnittpräparates, etwa 12 Tage nach Infektion; Die sGFP-Expression wurde in den Proben fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (Bilder H bis N). **O:** FungiFluor™-Färbung einer Hyphe, die 36 h nach Infektion an ihrer Spitze eine Appressorien-ähnliche Penetrationsstruktur ausbildet (gekennzeichnet durch weiße Pfeilspitze). Die Spitze der Hyphe hat die Blattoberfläche bereits penetriert und sGFP-Expression kann in diesem Teil der Hyphe nicht mehr beobachtet werden (Bild K). Der Längenmaßstab beträgt 10 µm und bezieht sich auf alle Abbildungen. **B)** Northern-Analyse der *dik6*-Expression *in planta*. Zur Isolierung von RNA aus Tumorgewebe wurden Maispflanzen mit einer Mischung aus FB1 und FB2, dem Stamm FBD11 und dem Stamm HA103 infiziert und die Tumore 16 Tage nach Infektion geerntet. Der RNA-Extraktion einer Mischung von FB1 und FB2 ging eine 48 stündige Inkubation auf CM-Aktivkohlemedium voraus. Jede Spur enthält etwa 3 µg pilzliche RNA (Erläuterungen siehe Text). Als Kontrolle wurde RNA von nicht-infizierten Maispflanzen aufgetragen. Die verwendeten Stämme sind über den Spuren angegeben. Zur Mengenkontrolle wurde der Filter mit einem Fragment des konstitutiv exprimierten Gens für die Peptidyl Prolyl *cis-trans* Isomerase (*ppi1*) hybridisiert.

## 2.2.7 *dik6*-Überexpressionsstämme weisen eine reduzierte Pathogenität auf

Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Rolle von *dik6* im Infektionsprozess wurden Überexpressionsstämme hergestellt, in denen ein transkriptionelles Fusionskonstrukt, bestehend aus dem *o2tef*-Promotor und dem *dik6*-ORF in den *ip*-Locus integriert wurde. Vor Beginn der Analyse der resultierenden Transformanten GE116 (*a1b1*,  $P_{o2tef}:dik6$ ) und GE118 (*a2b2*,  $P_{o2tef}:dik6$ ) wurde zunächst überprüft, ob auf transkriptioneller Ebene tatsächlich eine Überexpression von *dik6* erfolgt. Dazu wurde eine Northern-Analyse mit diesen Transformanten GE116 und GE118 durchgeführt. Als Kontrollen wurden die entsprechenden FB1- (*a1b1*) und FB2- (*a2b2*) Wildtypstämme verwendet. Dabei wiesen die Überexpressionsstämme eine etwa 30-fach erhöhte *dik6*-mRNA Menge im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen auf (Daten nicht gezeigt). Dieses Expressionsniveau gleicht etwa dem nach Induktion durch das bW/bE-Heterodimer.

Die entsprechenden *dik6*-Überexpressionsstämme zeigten weder im Wachstumsverhalten noch in der Zellmorphologie erkennbare Unterschiede (Daten nicht gezeigt). In Bezug auf das Kreuzungsverhalten ließ sich auf aktivkohlehaltigem Festmedium kein Unterschied zu den jeweiligen Wildtyp-Stämmen beobachten (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Kreuzungsverhalten der *dik6*-Überexpressionsmutanten.** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung der dikaryotischen Filamente wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte Weiß.

Hinsichtlich der Pathogenität wiesen Mischungen kompatibler *dik6*-Überexpressionsstämme im Vergleich zu Mischungen kompatibler Wildtyp-Stämme eine um bis zu 57% reduzierte Bildung von Tumoren auf (Tabelle 2). Die gebildeten Tumore unterscheiden sich bezüglich ihres Aussehens, ihrer Größe und ihrer Anzahl nicht von Wildtyp-Tumoren (Daten nicht gezeigt). Ebenso zeigten sich weder bei der Bildung von Brandsporen innerhalb der Tumore, noch bei der Keimung der Sporen Unterschiede zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 2: Pathogenität der *dik6*-Überexpressionsmutanten**

Inoculum	Infizierte Pflanzen*	Tumorbildung in %
FB1 x FB2	101	94%
GE116 x GE118	269	43%

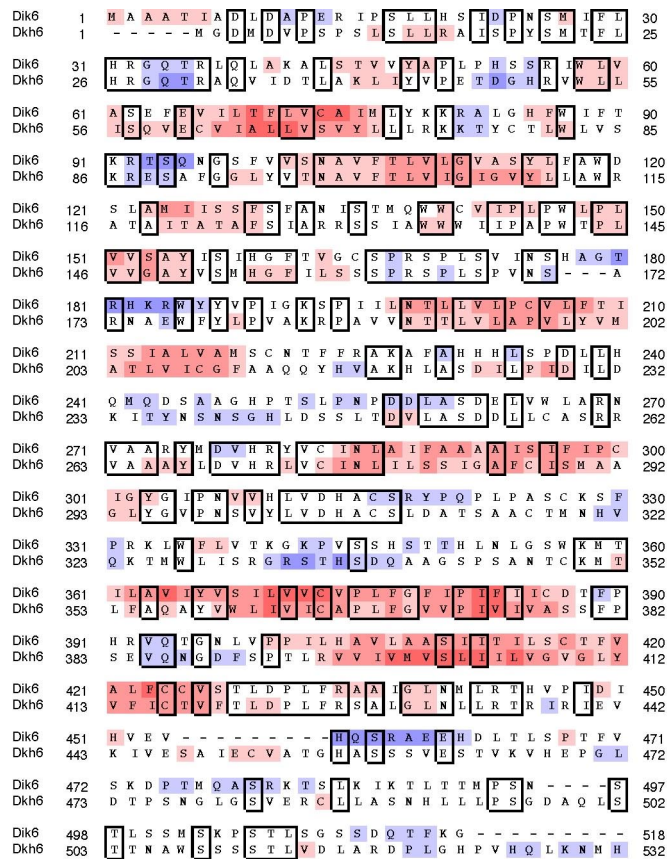
\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung 14 Tage nach Infektion.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass sich eine konstitutive *dik6*-Expression negativ auf die Pathogenität auswirkt. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass die Expression von *dik6* auf bestimmte Stadien beschränkt sein muss, damit der Pathogenitätsprozess normal ablaufen kann.

## 2.3 Identifizierung und Klonierung von *dkh6*

### 2.3.1 Klonierung von *dkh6*

Der Befund, dass die Deletion von *dik6* nicht zu einem vollständigen Verlust der Pathogenität führt, könnte erklärt werden, wenn es noch weitere Gene gibt, die für Proteine mit redundanter Funktion kodieren. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde das *U. maydis* Genom des Stammes 521 (*a1b1*) mit Hilfe des tBLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) nach Bereichen durchsucht, die für Proteine kodieren, die zu Dik6 ähnlich sind. Dabei wurde ein ORF identifiziert, der für ein putatives Protein kodiert, das 35 % identische Aminosäuren zu Dik6 aufweist (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Vergleich der Proteinsequenz von Dik6 und Dkh6.** Die Sequenzen wurden mit dem Programm CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) in Übereinstimmung gebracht und in dem Programm SeqVu 1.0.1 graphisch dargestellt. Identische Aminosäuren sind in Kästen dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren sind in roten Kästen und hydrophile Aminosäuren in blauen Kästen dargestellt.

Das korrespondierende Gen wurde *dkh6* (*dik homologous gen 6*) genannt. 933 bp stromaufwärts des *dkh6*-Translations-Startkodons befindet sich ein konvergent transkribiertes Gen (Daten nicht gezeigt). Der 1.599 bp große, intronfreie ORF von *dkh6* wurde mittels PCR aus genomischer DNA des *U. maydis* Stammes 521 (*a1b1*) amplifiziert und kloniert. Im

Rahmen des *U. maydis* Sequenzprojekt wurden von ca. 4.000 Plasmiden einer *U. maydis* cDNA-Expressionsbank, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden war (Material und Methoden, Anhang), die 3'-Enden der einklonierten cDNAs ansequenziert (J. Kämper, pers. Mitteilung). Darunter befand sich auch der Klon UG22-1a21-45a11, der eine 2.154 bp große cDNA von *dkh6* trägt. Dieser Klon enthält 442 bp 5'-untranslatierten Bereich, den 1.599 bp großen ORF und 113 bp 3'-untranslatierte Region. Alle Positionen sind vom angenommenen *dkh6*-Translations-Startpunkt berechnet. Zusätzlich wurde ein RT-PCR Experiment durchgeführt, um potenzielle Transkriptionsinitiationsstellen im *dkh6*-Promotor zu bestimmen. Dazu wurde RNA des haploiden *U. maydis* Stammes AB33 (*a2 P<sub>nar1</sub>:bW2,bE1*) nach Induktion der *b*-Gene isoliert, mit DNaseI inkubiert und revers transkribiert. Die erhaltene cDNA-Population wurde als Matrize in PCRs eingesetzt. Dabei wurde ein genspezifisches Oligonukleotid (OGW74) in Kombination mit sieben Oligonukleotiden (OGW103, OGW104, OGW105, OGW106, OGW107, OGW108, OGW109), die an den Positionen – 1.723, – 1.436, – 1.154, – 848, – 543, – 351 und – 149 stromaufwärts des angenommenen *dkh6*-Translations-Startkodons an cDNA binden können, eingesetzt. Die Verwendung von sechs der sieben Oligonukleotide zusammen mit dem genspezifischen Oligonukleotid OGW74 in PCRs zu Amplifikaten der erwarteten Größe (Daten nicht gezeigt). Das am weitesten entfernte Oligonukleotid OGW103 führte zu keinem Reaktionsprodukt. Dies deutet an, dass es *dkh6*-Transkripte gibt, die einen ungewöhnlich großen 5'-untranslatierten Bereich enthalten, der mindestens 503 bp des stromaufwärts gelegenen, konvergent transkribierten ORFs enthält.

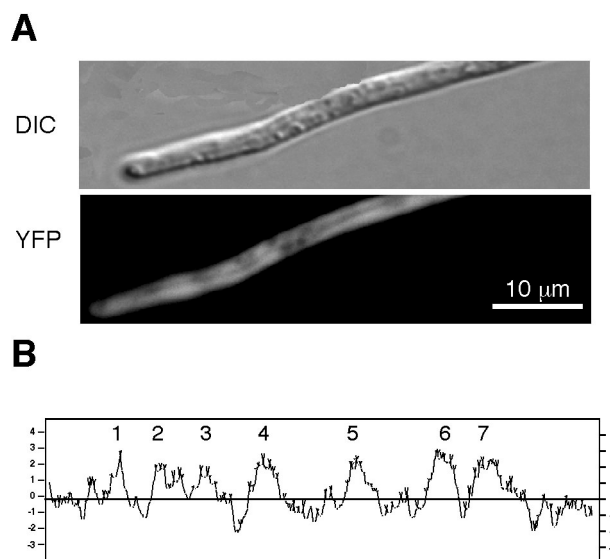
### 2.3.2 *dkh6* kodiert für ein Siebentransmembranprotein

Für Dkh6 wurden ebenso wie für Dik6 mit Hilfe des Programms BLAST2 (Altschul et al., 1990) keine Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit in öffentlichen Datenbanken gefunden werden. Eine Analyse der Proteinstruktur mit den Programmen TMPRED (Hofmann und Stoffel, 1993) und TMHMM (Krogh et al., 2001) ergab, dass Dkh6 sieben potenzielle Transmembrandomänen besitzt (Abbildung 20C). Diese Vorhersage wird durch das Ergebnis einer PROPSEARCH-Analyse unterstützt (Hobohm und Sander, 1995). Dabei wurden Ähnlichkeiten von Dkh6 zu mehreren potenziellen G-Protein gekoppelten Siebentransmembranrezeptoren hinsichtlich Aminosäurezusammensetzung, Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt mit einer Wahrscheinlichkeit von >0,87 gefunden wie z. B. das Okulare Albinismus 1 Homologe Protein der Maus (Accession Number NP\_035081) (Bassi et al., 1996) und das Dopamin Rezeptor Vorläuferprotein 1 (D-DOP1) aus *Drosophila melanogaster* (Accession Number P41596) (Gotzes et al., 1994). Mit einer Wahrscheinlichkeit von >0,8 wurden Ähnlichkeiten zu 12 Transmembrandomänenproteinen gefunden wie z.B. Npt2, das renale Natrium-abhängige Transport Protein 2 aus Mensch (Accession

Number Q06495) (Magagnin et al., 1993) und das Natrium-Phosphat-Kotransporter Protein Typ II aus Ratte (Accession Number AAF65515) (Shachaf et al., 2000).

Dkh6 ist gemäß einer Analyse des Programms PSORTII (Nakai und Horton, 1999) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,435 an der zytoplasmatischen Membran, und mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,261 im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Um diese Prognose zu verifizieren, wurde das *dkh6*-Genprodukt *in vivo* lokalisiert. Dazu wurde eine C-terminale Translationsfusion des Dkh6-Proteins mit dem gelben fluoreszierenden Protein (YGFP, Yellow Fluorescent Protein) hergestellt. Zu diesem Zweck wurde der *dkh6*-ORF an Basenpaarposition 1595 (entspricht der Aminosäureposition 532) translational mit *YGFP* fusioniert. Anschließend wurde das *dkh6::ygf*-Fusionskonstrukt transkriptionell am Translations-Startkodon mit einem 2.370 bp großen *dkh6*-Promotorfragment fusioniert, um das Plasmid pMV9 herzustellen, das in den *ip*-Locus des *U. maydis* Stammes AB31 (*a2 P<sub>cr</sub>:bW2,bE1*) inseriert wurde.

Der daraus resultierende Stamm GE287 (*a2 P<sub>cr</sub>:bW2,bE1; P<sub>dkh6</sub>:dkh6::ygf*) wurde nach Induktion der *b*-Gene mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass das Dkh6-YGFP Fusionsprotein an der zytoplasmatischen Membran lokalisiert. Dabei konnte eine überwiegend gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins über die gesamte zytoplasmatische Membran einer Hyphe beobachtet werden (Abbildung 20A, B).

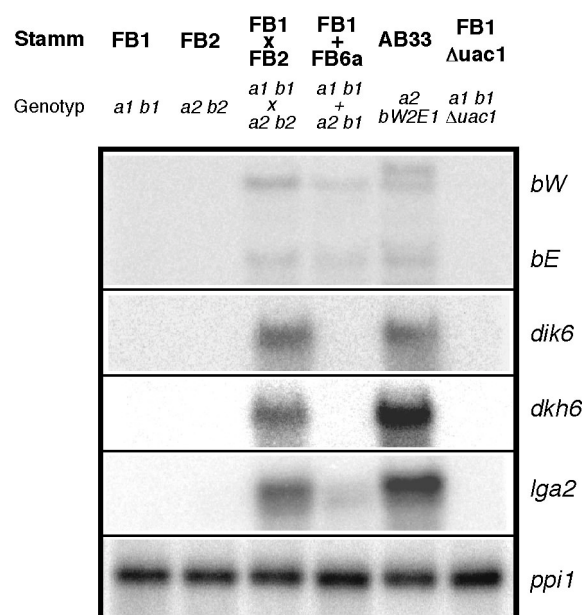


**Abbildung 20: Dkh6 ist ein Siebentransmembranprotein. A)** DIC-Mikroskopie. Der Stamm GE287 (*a2 P<sub>cr</sub>:bW2,bE1; P<sub>dkh6</sub>:dkh6::ygf*) wurde in CM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert und anschließend für 12 Stunden in CM-Ara inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels DIC-Mikroskopie an einem Axiophot II (Zeiss). Epifluoreszenz-Mikroskopie des Stammes GE287 (*a2 P<sub>cr</sub>:bW2,bE1; P<sub>dkh6</sub>:dkh6::ygf*) nach 12 Stunden Inkubation in CM-Ara. Das Dkh6::YFP Fusionsprotein lokalisiert gleichverteilt an der zytoplasmatischen Membran einer Hyphe. Der Längenmaßstab bezieht sich auf alle Abbildungen. **B)** Hydropathie-Plot des Dkh6 Proteins. Hydrophile Aminosäuren haben Werte, die größer als Null sind, hydrophobe Aminosäuren haben Werte, die kleiner als Null sind. Es sind sieben Transmembranregionen angegeben.



### 2.3.3 *dkh6* ist ein b-spezifisch reguliertes Gen

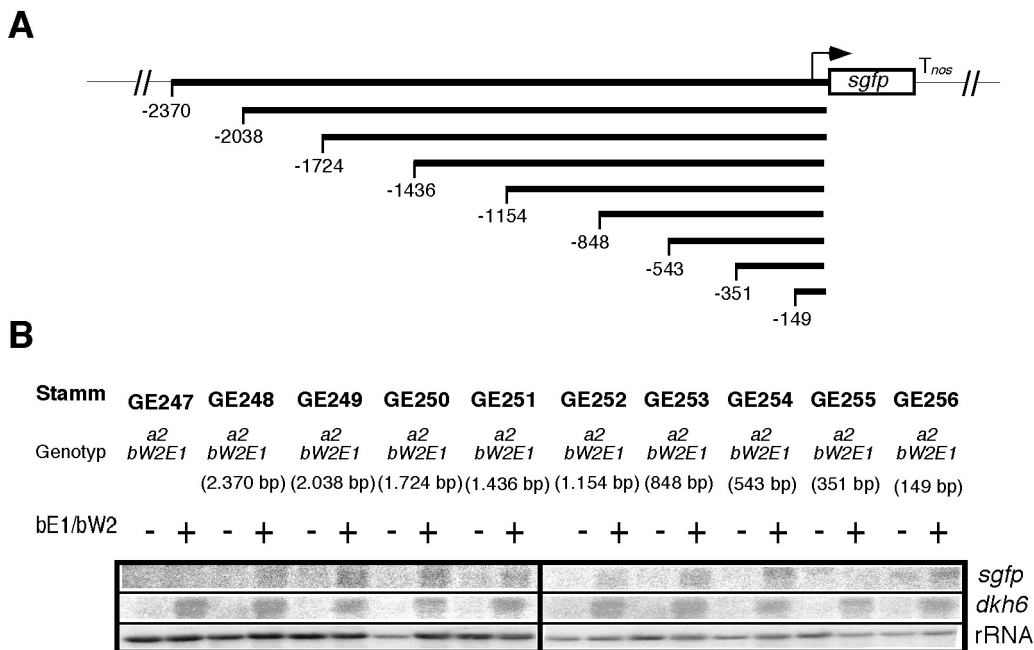
In Northern-Analysen wurde die Expression von *dkh6* in Abhängigkeit von b, Pheromonstimulation oder intrazellulärem cAMP-Spiegel untersucht. Für die Analysen wurden die Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*), eine Mischung dieser beiden Wildtyp-Stämme, die *a*- und *b*-abhängige Effekte auf die Genregulation anzeigt, eine Mischung von Zellen der Stämme FB1 (*a1b1*) und FB6a (*a2b1*) als Indikator für pheromonabhängige Regulation, der Stamm AB33 (*a2 P<sub>narl</sub>:bW2,bE1*) (Brachmann et al., 2001), der nach Induktion der *b*-Genexpression b-abhängig exprimierte Gene anzeigt und der Stamm FB1Δ*uac1* (*a1b1Δuac1*), der als Indikator für filament-spezifisch exprimierte Gene dient, verwendet. Zur Kontrolle wurde die Expression von *lga2* überprüft, das sowohl durch die *a*- als auch *b*-Genexpression induziert wird (Abbildung 21) (Romeis et al., 2000; Urban et al., 1996b). Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von *dkh6* genauso wie die von *dik6*, weder durch eine Deletion von *uac1* noch pheromonabhängig beeinflusst wird. Vielmehr werden beide Gene auf gleiche Weise b-abhängig induziert (Abbildung 21).



**Abbildung 21: *dkh6* ist ein b-spezifisch exprimiertes Gen.** Northern-Analyse der Gene *bE*, *bW*, *dik6*, *dkh6* und *lga2*. Kultivierungsbedingungen und weitere Einzelheiten siehe Text; in den Fällen von FB1 x FB2 und FB1 + FB6a wurden die Stämme getrennt angezogen und auf der NM-Aktivkohleplatte mit einer Dichte von 0,05 OD<sub>600</sub>/cm<sup>2</sup> pro Stamm gemischt. Der Stamm FB1Δ*uac1* wurde mit 6 mM cAMP angezogen, damit der filamentöse Phänotyp erst bei Wachstum auf der Aktivkohleplatte auftritt. Die verwendeten Stämme sind über den Spuren angegeben. Pro Spur wurde jeweils 10 μg RNA aufgetragen. Zur Mengenkontrolle wurde der Filter mit einem Fragment des konstitutiv exprimierten Gens für die Peptidyl Prolyl, *cis-trans* Isomerase (*ppi1*) hybridisiert.

### 2.3.4 *dkh6*-Promotordeletionsanalyse

In Abschnitt 2.3.2 wurde gezeigt, dass ein 2.370 bp langes *dkh6* 5'-Fragment die *cis*-regulatorischen Elemente enthält, die das bW/bE-Heterodimer für die Transaktivierung benötigt. Daher wurde im folgenden Versuch mittels einer sukzessiven Promotordeletionsanalyse der Bereich eingegrenzt, der eine b-abhängige Expression von *dkh6* vermittelt. Da gezeigt wurde, dass eine Promotoranalyse mit freireplizierenden Plasmiden möglich ist (siehe Abschnitt 2.2.3), wurden neun Plasmide (pGE191 bis pGE199) hergestellt, die transkriptionelle Fusionen verschieden langer *dkh6* 5'-Fragmente (2.370 bp, 2.038 bp, 1.724 bp, 1.436 bp, 1.154 bp, 848 bp, 543 bp, 351 bp und 149 bp) mit dem *sgfp*-Gen und eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion in *U. maydis* tragen (Abbildung 22A). Anschließend wurden die Plasmide in den *U. maydis* Stamm AB33 (*a2 P<sub>nari</sub>:bW2,bE1*) transformiert. Als Kontrolle wurde AB33 mit dem Vektor pNEBUC transformiert (Stamm GE247). In den resultierenden Transformanten GE247 bis GE256 führte die Induktion der *b*-Gene auf NM/Carboxin-Medium nach 24 Stunden zu filamentösem Wachstum (nicht gezeigt). Anschließend wurde die Aktivität der *dkh6:sgfp*-Promotorfusionskonstrukte auf Transkriptionsebene untersucht. Zur Kontrolle wurden die Stämme auf die Expression von *dkh6* untersucht. Dabei zeigte sich, dass bis auf den Kontrollstamm GE247 in allen Stämmen *dkh6* in Abhängigkeit der *b*-Genexpression induziert wird (Abbildung 22B).



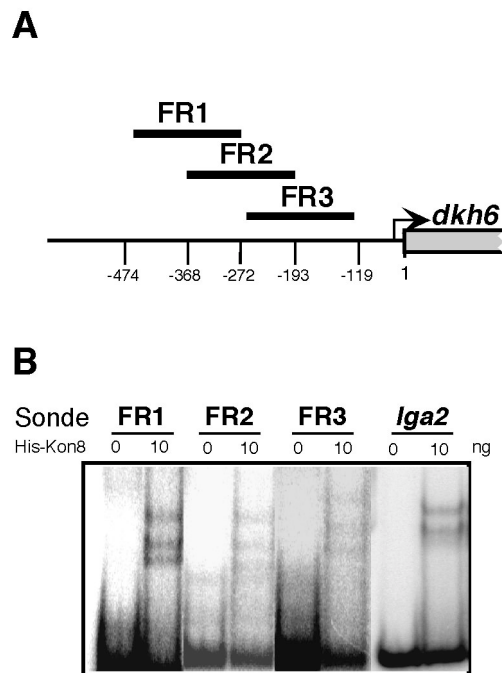
**Abbildung 22: Eingrenzung *cis*-aktiver Promotor-Elemente für eine b-abhängige Regulation von *dkh6*.** **A)** Schematische Darstellung der verschieden langen *dkh6*-Promotor:*sgfp* Reporterkonstrukte. Die entsprechenden Stämme sind: GE247 (Kontrolle), GE248 (2.370 bp), GE249 (2.038 bp), GE250 (1.724 bp), GE251 (1.436 bp), GE252 (1.154 bp), GE253 (848 bp), GE254 (543 bp), GE255 (351 bp) und GE256 (149 bp). **B)** Northern-Analyse der *dkh6*-Promotor:*sgfp* Reporterstämme. Kultivierung siehe Text; zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde 10 µg RNA geladen. Zur Mengenkontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer für 18S rRNA spezifischen Sonde durchgeführt.

In Northern-Analysen führten *dkh6*-Promotorfragmente bis zu einer Größe von 543 bp zu einer untereinander vergleichbaren Aktivität des Reportergens, wohingegen ein 351 bp *dkh6*-Promotorfragment nach *b*-Induktion das Reportergen kaum mehr induzieren konnte (Abbildung 22B). Ein 149 bp großes Promotorfragment führte bereits vor der Induktion durch ein bW/bE-Heterodimer zu einer konstitutiven *sgfp*-Expression (Abbildung 22B), die sich durch *b* nicht mehr steigern ließ. Dies wird als Indiz dafür gewertet, dass sich auf dem Bereich zwischen – 351 bp und – 149 bp potenzielle *cis*-aktive Element für negativ regulatorisch wirksame Faktoren befinden könnten.

### 2.3.5 *dkh6* ist ein direktes *b*-Zielgen

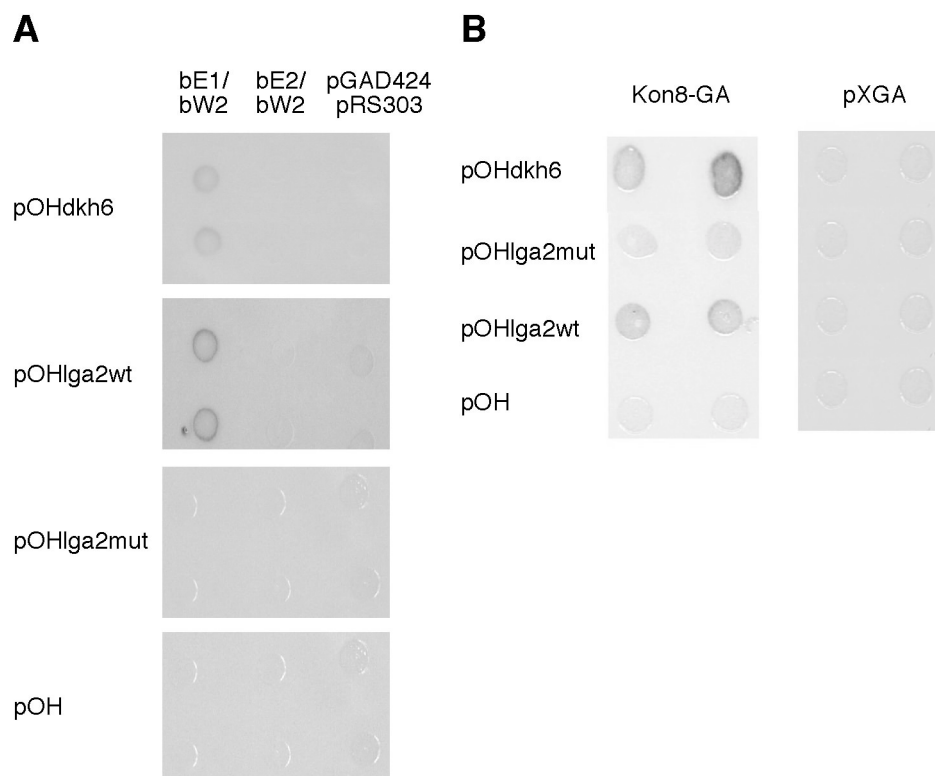
Nachdem der *dkh6*-Promotor auf den Bereich eingegrenzt werden konnte, der für eine *b*-abhängige Regulation notwendig ist, wurde, analog zum Promotor von *dik6*, der *dkh6*-Promotor durch Gelretardationsanalysen auf eine direkte Bindung des bW/bE-Heterodimers untersucht. Basierend auf den Daten der Promotordeletionsanalyse konnten durch Sequenzvergleiche zwei Bereiche auf einem 543 bp langen *dkh6* 5'-Fragment identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zu den bereits bekannten *b*-Bindestellen im *lga2*-, *dik6*- und *frb52*-Promotor aufweisen. Demnach könnte es sich um potenzielle *b*-Bindestelle handeln, von denen eine zwischen den Positionen – 479 und – 453, und die zweite zwischen – 260 bp und – 234 bp liegt. Die *b*-Bindestelle zwischen – 479 bp und – 453 bp liegt in dem *dkh6* 5'-Bereich, der den minimalen, noch *b*-abhängig regulierbaren Promotor darstellt. Die zweite angenommene *b*-Bindestelle zwischen – 260 bp und – 234 bp liegt in dem Bereich des *dkh6*-Promotors, der eine noch geringe *dkh6*-Expression bewirkt. Die Auswirkungen einer Deletion dieses Bereichs auf die *b*-abhängige Regulation konnten nicht näher analysiert werden, da die Deletion des Bereichs zu einem konstitutiv aktiven Promotor führt.

Zum *in vitro*-Nachweis der Bindung von His-Kon8 an den *dkh6*-Promotor wurden drei Fragmente, die den 5'-Bereich zwischen – 474 bp und – 119 bp umfassen, in Gelretardationsanalysen eingesetzt (Abbildung 23A). Als Kontrolle wurde ein 76 bp großes *lga2*-Promotorfragment verwendet, das die *b*-Bindestelle trägt. Es konnte mit allen 3 Fragmenten, auf denen sich der Bereich zwischen – 474 bp und – 119 bp befindet, ein His-Kon8/DNA-Komplex nachgewiesen werden (Abbildung 23B). Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass His-Kon8 an beide potenziellen *b*-Bindestellen bindet.



**Abbildung 23: Charakterisierung der b-Bindestelle im *dkh6*-Promotor.** **A)** Schematische Darstellung der Lage der für die Analyse verwendeten *dkh6*-Promotor-Fragmente FR1, FR2 und FR3. **B)** Gelretardationsanalyse der Fragmente FR1, FR2 und FR3 und dem *lga2*-Promotorfragment, das die b-Bindestelle *bbs1* trägt und His-Kon8, Einzelheiten siehe Text. Es treten drei verschieden große His-Kon8/DNA-Komplexe auf, was auch schon bei der Untersuchung des *lga2*-Promotors beobachtet wurde. Sie sind vermutlich mit Bindung von C-terminal verkürzten His-Kon8-Abbauprodukten an die jeweiligen DNA-Fragmente zu erklären (Romeis et al., 2000).

Die *in vivo* Bindung des bW/bE-Heterodimers wurde in einem modifizierten Hefe Ein-Hybrid System verifiziert (Romeis et al., 2000). Dazu wurde ein 309 bp Fragment, das die zweite b-Bindestelle zwischen den Nukleotidpositionen – 260 und – 234 enthält, in das Plasmid pOH kloniert. Das resultierende Plasmid pOHdkh6 wurde zusammen mit Expressionsplasmiden, die verschiedene *bE*- und *bW*-Allele tragen, in *S. cerevisiae* transformiert. Dabei war nur im Fall der Koexpression von bE1 und bW2 bzw. im Fall der Expression von Kon8-GA eine Induktion des *lacZ*-Reportergens zu beobachten, wenn gleichzeitig das b-Bindesequenz tragende Plasmid pOHdkh6 in den Zellen vorlag (Abbildung 24A, B). Als Kontrolle wurden die Klonierungsvektoren in Hefe transformiert, wobei in keinem Fall eine Aktivierung des Reportergens auftrat (Abbildung 24A, B). Dies zeigt, dass es sich bei *dkh6* um ein weiteres durch das bW/bE-Heterodimer direkt reguliertes Gen handelt.



**Abbildung 24: Bindung des bE1/bW2-Heterodimers und des Fusionsproteins Kon8-GA an die *dkh6* b-Bindestelle *in vivo*.** Plasmide mit den entsprechenden Reporterkonstrukten, die ein Fragment tragen, das die *dkh6* b-Bindestelle enthält (pOHdkh6) oder die wildtypische *lga2* b-Bindestelle (pOHlga2wt) oder die mutierte *lga2* b-Bindestelle (pOHlga2mut) oder kein Fragment (pOH), wurden in **A** mit Plasmiden, die bE1 (pScbE1), bE2 (pScbE2), bW2 (pScbW2) exprimieren und mit pGAD424 und pRS303 als Kontrollen, kotransformiert. In **B** wurden dieselben Plasmide zusammen mit einem Plasmid, welches das Fusionsprotein Kon8-GA exprimiert oder mit pXGA als Kontrolle, kotransformiert. Transformanten wurden mittels eines qualitativen Plattentests auf die Aktivität des *lacZ*-Reportergens untersucht.

### 2.3.6 *dkh6* ist ein essentielles Gen

Da die Regulation von *dhk6* durch den b-Komplex der von *dik6* ähnlich ist und beide Proteine 35% identische Aminosäuren aufweisen, wurden *dkh6*-Deletionsmutanten hergestellt, um die Frage zu klären, welche Funktion *dkh6* hat. Dazu wurde in die Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) das Plasmid pGE145 eingebracht, in dem der 1.599 bp große ORF vollständig entfernt und durch eine Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt ist. Mittels einer Ganz-Zell-PCR wurden 96 Transformanten jedes Stammes auf das Vorliegen des *dkh6*-Nullallels durchmustert, um anschließend jeweils 24 Kandidaten in einer Southern-Analyse auf homologe Rekombination zu überprüfen. Dabei stellte sich heraus, dass in keinem Fall das *dkh6*-Wildtypallel durch ein homologes Rekombinationsereignis gegen das *dkh6*-Nullallel ausgetauscht wurde (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob *dkh6* möglicherweise ein essentielles Gen ist, wurde in dem diploiden, pathogenen Stamm FBD11 (*a1a2b1b2*) mit

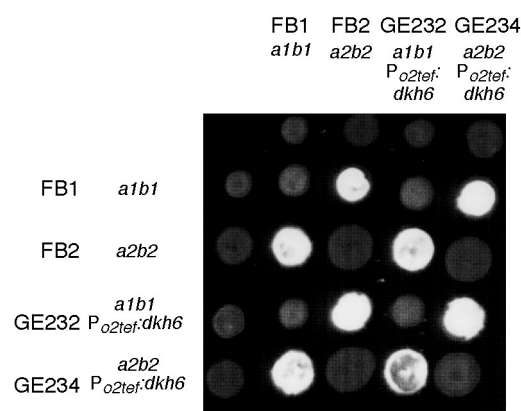
Hilfe von pGE145 ein *dkh6*-Wildtypallel gegen ein Nullallel ausgetauscht. Mit der resultierenden Transformante GE158 (*a1a2b1b2dkh6/Δdkh6*) wurden Maispflanzen infiziert und nach der Bildung von Sporen wurde eine Segregationsanalyse der nach dem Auskeimen hervorgegangenen Sporidien durchgeführt. Von Vereinzelungsausstrichen der Nachkommen von 5 Sporen wurden jeweils 12 Einzelkolonien auf Phleomycin-Resistenz überprüft. Von den 60 Sporidien erwiesen sich 21 als Phleomycin-resistent. In einer anschließenden Genotypisierung wurde für 2 Sporidien ein *a1b1*-, für 9 Sporidien ein *a2b2*-, für 4 Sporidien ein *a2b1*- und für 3 Sporidien ein *a1b2*-Geotyp ermittelt, 3 Sporidien erwiesen sich als diploid und wurden daher von weiteren Analysen ausgeschlossen. In einer anschließenden Southern-Analyse zeigte sich, dass alle 18 untersuchten Phleomycin-resistenten Sporidien ein Fragment, das der Größe des *dkh6*-Wildtypallels entspricht, aufweisen. Zusätzlich enthielten 15 der 18 Sporidien noch die Fragmente, die nach homologer Rekombination den Austausch des Wildtypallels anzeigen (Daten nicht gezeigt).

Die phänotypische Analyse von essentiellen Genen ist durch die Erzeugung von konditional letalen Mutanten möglich. Zur Herstellung solcher Mutanten wird am Translations-Startpunkt ein induzierbarer/reprimierbarer Promotor inseriert, um auf diese Weise die Expression des entsprechenden ORFs gezielt zu kontrollieren. In *U. maydis* wurde dies bislang erfolglos für *uku70* durchgeführt, da der verwendete *crg1*-Promotor unter reprimierten Bedingungen in den entsprechenden Transformanten noch eine sehr schwache Basalaktivität aufwies (A. Jamnischek, J. Kämper, pers. Mitteilung). Um diese Problematik, die möglicherweise durch eine Änderung der Chromatinstruktur am *crg1*-Promotor entstanden ist, da der Promotor in einen heterologen Genlocus inseriert worden ist, zu umgehen, wurde der Stamm GE278 (*a2b2 Δnar1::dkh6*) hergestellt, in dem der ORF von *dkh6* mit Hilfe des Plasmids pGE176 in den endogenen *nar1*-Locus inseriert wurde, wobei das Nitratreduktase-Gen *nar1* deletiert wurde. Anschließend wurde das endogene *dkh6*-Gen mit Hilfe des Plasmids pGE145 deletiert. Die Analyse des Phänotyps der Transformanten führte jedoch nach dem Abschalten des *nar1*-Promotors zu keinem signifikanten Phänotyp (Daten nicht gezeigt), was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass der *nar1*-Promotor auch in seinem natürlichen chromosomalen Kontext durch  $\text{NH}_4^+$  nicht völlig reprimiert ist und daher eine sehr geringe Anzahl an *dkh6*-Transkripten in den Zellen vorhanden sind, die ausreicht um die *dkh6*-Deletion zu kompensieren. Dies wäre im Einklang mit der Beobachtung, dass in haploiden *U. maydis* Zellen das *dkh6*-Gen so schwach basal exprimiert ist, dass es nur mittels RT-PCR nachgewiesen werden kann (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse lassen es wahrscheinlich erscheinen, dass *dkh6* ein essentielles Gen ist, da ein ähnlicher Befund mit dem essentiellen *U. maydis hsp70*-Gen beobachtet wurde (Holden et al., 1989).

### 2.3.7 *dkh6*-Überexpression

Um eventuell Rückschlüsse auf die Funktion von *dkh6* ziehen zu können, wurden Stämme hergestellt, die *dkh6* konstitutiv exprimieren. Dazu wurde der 1.599 bp große *dkh6*-ORF transkriptionell am Translations-Startkodon mit dem starken, konstitutiven *o2tef*-Promotor fusioniert, um das Plasmid pGE169 herzustellen, das anschließend in den *ip*-Locus der Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) integriert wurde. Die entsprechenden Transformanten GE232 (*a1b1P<sub>o2tef</sub>:dkh6*) und GE234 (*a2b2P<sub>o2tef</sub>:dkh6*) zeigen im Vergleich zu den Ausgangsstämmen keine Unterschiede im Wachstumsverhalten und in ihrer Zellmorphologie (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls konnte kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp bei Kreuzungstests festgestellt werden (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Kreuzungsverhalten der *dkh6*-Überexpressionsmutanten.** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung der dikaryotischen Filamente wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte Weiß.

Pflanzeninfektionen mit Mischungen der Stämme GE232 (*a1b1P<sub>o2tef</sub>:dkh6*) und GE234 (*a2b2P<sub>o2tef</sub>:dkh6*) zeigten keine Änderung in der Pathogenität im Vergleich zu Wildtypstämmen (Tabelle 3) und führten zur Bildung normaler Tumore mit Brandsporen, die auch beim Auskeimen keinen Phänotyp zeigen (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 3: Pathogenität der *dkh6*-Überexpressionsmutanten**

Inoculum	Infizierte Pflanzen*	Tumorbildung in %
FB1 x FB2	81	98%
GE232 x GE234	78	97%

\*Angabe ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung 14 Tage nach Infektion.

Somit kann *dkh6* auch nach den Versuchen mit Überexpressionsstämmen keine eindeutige Funktion in *U. maydis* zugeordnet werden.

## 2.4 Isolierung von Komponenten einer b-vermittelten Regulationskaskade

Um ein tieferes Verständnis der Regulation durch das bW/bE-Heterodimer in *U. maydis* zu erhalten, war es interessant, weitere Komponenten der postulierten b-vermittelten Regulationskaskade zu isolieren. Dazu wurde ein Stamm hergestellt, in dem das direkt b-regulierte Gen *dik6* und die beiden b-regulierten Gene *dik1* und *egl1* gleichzeitig als Reportergene verwendet werden können. Mittels UV-Mutagenese dieses Reporterstammes können potenzielle Repressoren von b-regulierten Genen gefunden werden. Der gleiche Reporterstamm eignet sich auch für die Identifizierung von Transkriptionsaktivatoren von b-regulierten Genen, die mögliche Kofaktoren des bW/bE-Heterodimers sind.

### 2.4.1 Konstruktion eines *U. maydis* dreifach-Reporterstammes

Für den Reporterstamm wurde *egl1* als endogenes Reportergen verwendet. *dik1* wurde transkriptionell mit dem *egfp*-Gen und *dik6* transkriptionell mit dem *pyr6*-Gen fusioniert. Die Expression der Endoglukanase EGI kann leicht in einem Test auf Festmedien, die Carboxymethylcellulose (CMC) enthalten, nachgewiesen werden (Quadbeck-Seeger et al., 2000; Schauwecker et al., 1995).

In dem Stamm FB1 (*a2b2*) wurde der 615 bp große ORF von *dik1* vollständig entfernt und durch das *egfp*-Gen und eine Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt. Das *egfp*-Gen wurde dabei transkriptionell mit dem *dik1*-Translations-Startkodon fusioniert. Anschließend wurde der 1.557 bp große *dik6*-ORF vollständig entfernt und durch das *pyr6*-Gen und eine Nourseothricin-Resistenzkassette so ersetzt, dass eine transkriptionelle Fusion von *pyr6* am *dik6* Translations-Startkodon entstand. Das *U. maydis pyr6* Gen kodiert für das Enzym Orotidin-5'-phosphat Decarboxylase (ODC) (Kronstad et al., 1989) und ist das homologe Gen zu *URA3* in *S. cerevisiae* (Boeke et al., 1984). *ura3*- und *pyr6*-Deletionsmutanten sind in der Pyrimidin-Biosynthese defizient und daher nicht in der Lage auf Vollmedium zu wachsen (Boeke et al., 1984). Deshalb müssen  $\Delta ura3$ -Stämme von *S. cerevisiae* mit Uracil,  $\Delta pyr6$ -Stämme von *U. maydis* hingegen mit Cytidin supplementiert werden. Für *U. maydis* wurde gezeigt, dass  $\Delta pyr6$ -Zellen nach Zugabe von Uracil gegenüber Wildtyp-Stämmen einen deutlichen Wachstumsnachteil besitzen (A. Brachmann, pers. Mitteilung). Gleichzeitig weisen *ura3*- bzw. *pyr6*-Deletionsmutanten Resistenz gegenüber 5-Fluor-Orotsäure (5-FOA) auf (Boeke et al., 1984). Ähnlich wie in *S. cerevisiae* kann *pyr6* als ein gegenselektionierbares Markersystem verwendet werden.

Um *pyr6* als Reportersystem verwenden zu können, wurde in den Stamm GE70 (*a2b2* $\Delta dik1:egfp$ ,  $\Delta dik6:pyr6$ ) ein *pyr6*-Nullallel eingekreuzt. Dazu wurden Maispflanzen mit einer Mischung der Stämme GE70 und CH1 (*a1b1* $\Delta pyr6$ ) (C. Hohenlohe, pers. Mitteilung) infiziert. Von ausgekeimten Sporen wurden insgesamt 12 Segreganten isoliert, die



Phleomycin- und Nourseothricin-resistent und zugleich Cytidin-auxotroph und resistent gegen 5-FOA waren. Die Segreganten wurden noch mittels Southern-Analyse auf das Vorliegen eines *pyr6*-Nullallels überprüft (Daten nicht gezeigt).

Um sicherzugehen, dass die eingebrachten Reportersysteme in den Nachkommen funktionell sind, wurden GE95-Zellen (*a2b1Δdik1:egfp*,  $\Delta$  *dik6:pyr6*,  $\Delta$  *pyr6*) mit einem freireplizierenden Plasmid pGE118, das *bE1*- und *bW2*-Allele unter der Kontrolle des *nar1*-Promotors und zusätzlich eine Carboxin-Resistenzkassette trägt, transformiert. Durch die Expression der verschiedenen *b*-Allele wuchsen die Transformanten auf  $\text{NO}_3^-$ -haltigen Medien filamentös (Daten nicht gezeigt). Das *dik6:pyr6*- und das *dik1:egfp*-Promotorfusionskonstrukt wurden aktiviert und *egl1*-Expression induziert, so dass die Transformanten in der Lage waren auf Medien ohne Zugabe von Cytidin zu wachsen, grüne Fluoreszenz zeigten und Endoglukanase-Aktivität aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Auf Medien, die  $\text{NH}_4^+$  enthielten, konnten die Transformanten nur unter Zugabe von Cytidin wachsen und wiesen weder grüne Fluoreszenz noch Endoglukanase-Aktivität auf (Daten nicht gezeigt).

## 2.4.2 Isolierung von negativ regulatorischen Faktoren der *dik6*-Expression

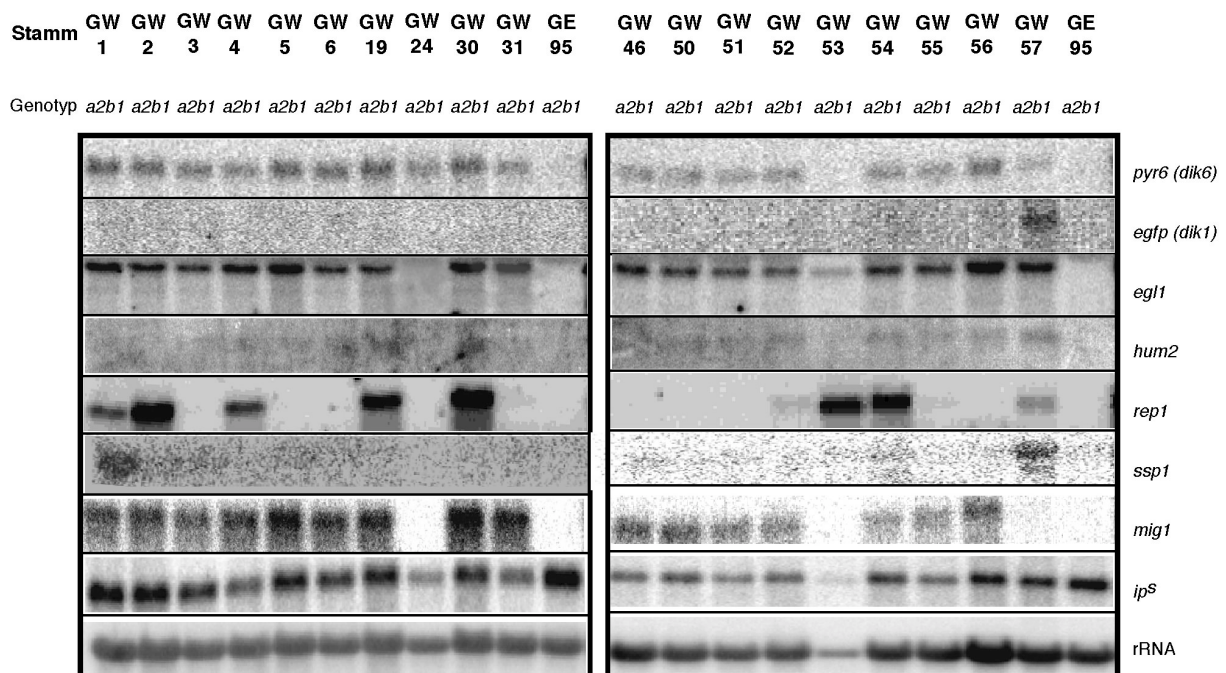
Da die *dik6*-Promotoranalyse bereits gezeigt hatte, dass das *dik6*-Gen negativ reguliert wird und andererseits bekannt war, dass weder Rum1 noch Hda1 diese negative Regulation vermitteln (Quadbeck-Seeger et al., 2000; M Reichmann, J. Kämper, pers. Mitteilung), wurde eine Mutagenese des Stammes GE95 durchgeführt. Werden in diesem Stamm Repressoren der *dik6*-Expression inaktiviert, sollte es zur Expression des *dik6:pyr6* Reportergens und damit zur Bildung des *pyr6*-Genprodukts kommen. Diese Mutanten sollten auf Medium ohne Cytidin wachsen und können gleichzeitig durch die Expression der weiteren Reportergene (*dik1:egfp* und *egl1*) charakterisiert werden.

Zunächst wurde in einem Vorexperiment die UV-Dosis für die Mutagenese so eingestellt, dass 0,1 – 1% der Zellen überlebten, was theoretisch zu einer Mutation pro Zelle führen sollte (Banuett, 1991; Holliday, 1974). Insgesamt wurden  $1 \times 10^9$  GE95-Zellen mit einer UV-Dosis von 23 – 35 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt und auf PD-Medium für 72 Stunden bei 28°C im Dunkeln inkubiert, woraus insgesamt 18 prototrophe UV-Mutanten resultierten. Als Kontrolle wurden  $1 \times 10^{10}$  nicht UV-bestrahlte GE95-Zellen ausplattiert. Dabei konnte eine stabile, spontane Mutante (GW24) isoliert werden, die prototroph war. Die induzierte Mutationsrate lag in den GE95-Zellen bei  $1,8 \times 10^{-8}$  und damit um den Faktor 180 höher als die spontane Mutationsrate. Die 19 Mutanten wurden anschließend phänotypisch analysiert. Dabei konnten bei Wachstum auf NM-, PD- und CM-Medium keine auffallenden morphologischen Merkmale beobachtet werden, außer dass bei allen Mutanten nach 2 bis 3 Tagen Inkubation bei 28°C eine Braunfärbung der Kolonien auftrat (Daten nicht gezeigt).

Die Expression des *dik6:pyr6* Reporterkonstrukts kann auch auf ein aktives bW/bE-Heterodimer zurückzuführen sein, da bereits ein Aminosäureaustausch in den variablen Regionen von bW oder bE zur Dimerisierung von Proteinen des gleichen Allels führen kann (Kämper et al., 1995). Um auszuschließen, dass Mutationen in bW oder bE entstanden waren, wurde überprüft, ob die UV-Mutanten noch mit dem Wildtyp-Stamm FB6b (*alb2*) kreuzen können und ob sie von dem Wildtyp-Stamm FB1 (*alb1*) durch Pheromon stimuliert werden können. Dabei war nur bei Mischungen der UV-Mutanten (*a2b1*) mit dem Stamm FB6b (*alb2*) eine erfolgreiche Kreuzungsreaktion in Form eines weißlich erscheinenden Luftmyzels zu beobachten und keine der UV-Mutanten wuchs aufgrund einer Pheromonstimulation filamentös (Daten nicht gezeigt). Bei Pflanzeninfektionen war zudem keine der getesteten Mutanten in der Lage, ohne Kreuzungspartner Tumore zu induzieren. Mischungen mit dem Wildtyp-Stamm FB6b (*alb2*) führten hingegen in allen Fällen zur Tumorbildung (Daten nicht gezeigt). Durch diese Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass durch die UV-Mutagenese die Spezifität des *b1*-Allels des Reporterstammes GE95 (*a2b1Δdik1:egfp, Δdik6:pyr6, Δpyr6*) geändert wurde und für die Expression des vom *dik6*-Promotor kontrollierten *pyr6*-Gens verantwortlich ist.

In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurde beobachtet, dass bei den Mutanten GW53 und GW57 auch das *dik1:egfp* Fusionskonstrukt aktiviert ist (Daten nicht gezeigt). In einem EGI-Plattentest wiesen alle Mutanten bis auf GW24 EGI-Aktivität auf (Daten nicht gezeigt).

Im Zuge der weiteren Untersuchung der UV-Mutanten wurde eine Northern-Analyse durchgeführt, um die Ergebnisse der phänotypischen Analyse zu überprüfen. Als Kontrolle wurde RNA des für die Mutagenese verwendeten Stammes GE95 (*a2b1Δdik1:egfp*, *Δdik6:pyr6*, *Δpyr6*) verwendet. Dabei zeigte sich, dass in allen Mutanten *pyr6* Expression nachzuweisen ist, wobei die Expression in der Mutante GW53 am Detektionslimit liegt (Abbildung 26, Tabelle 4).



**Abbildung 26: Expressionsanalyse von haploiden, *dik6*-exprimierenden UV-Mutanten.** Die verwendeten UV-Mutanten und Stämme sind über den Spuren angegeben. Die UV-Mutanten wurden vor RNA-Extraktion 24 h in PD-Medium inkubiert, der Kontrollstamm GE95 (*a2b1Δdik1:egfp*, *Δdik6:pyr6*, *Δpyr6*) wurde im selben Medium, das zusätzlich noch mit 100 µg/ml Cytidin supplementiert wurde, angezogen. Es wurden 10 µg RNA pro Spur aufgetragen. Zur Mengenkontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer für 18S rRNA spezifischen Sonde durchgeführt.

Da die Mutante aber in der Lage ist, ohne Cytidin-Zugabe zu wachsen, kann angenommen werden, dass *pyr6* exprimiert wird. Möglicherweise ist das sehr schwache Signal auf die geringe RNA-Menge zurückzuführen, die in der Spur geladen ist. Dieselbe Ursache könnte auch für das nicht nachweisbare *egfp*-Transkript in der Mutante zutreffen. In die Northern-Analysen wurden die beiden direkten b-regulierten Gene *lga2* und *frb52*, die b-abhängig regulierten Gene *egl1*, *hum2* und *rep1*, sowie die stadienspezifisch induzierten Gene *ssp1*, *mig1*, *pig3* und *pig4* miteinbezogen (Aichinger, 2000; Basse et al., 2000; Huber, 2001). Dabei

wurde beobachtet, dass sich die Mutanten in ihrem Expressionsmuster der gestesteten Gene voneinander unterscheiden (Abbildung 26, Tabelle 4, Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 4: Klassifizierung der UV-Mutanten nach ihrem Expressionsmuster**

UV-Mutante	<i>pyr6</i> ( <i>dik6</i> )	<i>egfp</i> ( <i>dik1</i> )	<i>egl1</i>	<i>hum2</i>	<i>rep1</i>	<i>ssp1</i>	<i>mig1</i>	<i>ip<sup>s</sup></i>	<i>frb52</i>	<i>lga2</i>	<i>pig3</i>	<i>pig4</i>
GW57	+	+	+	+/-*	+	+	-	+	-	-	-	-
GW1	+	-	+	+/-*	+	+	+	+	-	-	-	-
GW31	+	-	+	+/-*	-	-	+	+	-	-	-	-
GW52	+	-	+	+	+/-*	-	+	+	-	-	-	-
GW55	+	-	+	+	+/-*	-	+	+	-	-	-	-
GW2	+	-	+	+/-*	+	-	+	+	-	-	-	-
GW4	+	-	+	+/-*	+	-	+	+	-	-	-	-
GW19	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
GW30	+	-*	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
GW53	+/-*	+/-*	+	+/-*	+	-	+/-*	+	-	-	-	-
GW54	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
GW3	+	-	+	+/-*	-	-	+	+	-	-	-	-
GW5	+	-	+	+/-*	-	-	+	+	-	-	-	-
GW6	+	-	+	+/-*	-	-	+	+	-	-	-	-
GW46	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
GW50	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
GW51	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
GW56	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
GW24	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

gestrichelte Linie grenzen die einzelnen Klassen der UV-Mutanten voneinander ab

\* Die Expression konnte anhand der durchgeführten Northernanalysen nicht eindeutig festgestellt werden,

die verschiedenen Klassen der UV-Mutanten sind durch gestrichelte Linie voneinander getrennt

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mutanten nach dem Expressionsmuster der getesteten Gene in 6 Gruppen eingeteilt werden können (Tabelle 4), was darauf hinweist, dass mindestens 6 diskrete Mutationen induziert wurden. Da die Mutante GW24 spontan entstanden ist und nur *pyr6* exprimiert, könnte dies bedeuten, dass sie eine *cis*-Mutation im *dik6*-Promotor trägt, die zur *pyr6* Expression führt. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die in den Mutanten betroffenen, negativ regulatorischen Faktoren der *dik6*-Expression teilweise die Expression anderer Gene beeinflussen.

### 2.4.3 Komplementation der UV-Mutanten GW1, GW52, GW53, GW56 und GW57

Die Mutanten GW1, GW52, GW53, GW56 und GW57 wurden ausgewählt, da sie jeweils Vertreter einer der sechs nach dem Expressionsmuster eingeteilten Gruppen sind. Die Mutante GW24 wurde nicht weiterbearbeitet. Um auszuschließen, dass eine bislang noch nicht charakterisierte Mutation in *hda1* für die Deregulation der Genexpression in den Mutanten GW1, GW52, GW53, GW56 und GW57 verantwortlich ist, wurden die 5 Mutanten mit einem freireplizierenden Plasmid, das das *hda1*-Gen trägt, transformiert. Keine von jeweils 12 untersuchten Transformanten zeigte Wachstum auf 5-FOA-haltigen Medien, das heißt Komplementation durch Hda1 hatte nicht stattgefunden.

Um zu untersuchen, ob die UV-induzierten Mutationen, die zur Deregulation von *dik6* führten, dominant oder rezessiv sind, wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt. Jeweils 96 der aus der Kreuzung der Mutanten GW1, GW52, GW53, GW56 und GW57 mit dem Wildtyp-Stamm FB6b (*a1b2*) hervorgegangenen haploiden Sporidien wurden auf prototrophes Wachstum getestet. Dabei wurden für die Segreganten folgende Verhältnisse der Aufspaltung hinsichtlich prototrophem - auxotrophem Wachstum ermittelt: GW1 56:40, GW52 52:44, GW53 51:45, GW56 60:36 und GW57 62:34. Aus diesen Verhältnissen kann abgeleitet werden kann, dass der Phänotyp der Mutanten vermutlich auf einer einzelnen, rezessiven Mutation beruht.

Anschließend wurden die 5 Mutanten mit einer geordneten, freireplizierenden Cosmidbank (Material und Methoden), die aus 40 Pools von je 96 einzelnen Cosmiden besteht, transformiert. Die 3.840 Cosmide reichen bei einer Genomgröße von *U. maydis* von etwa 20 Mbp und einer durchschnittlichen Länge der Cosmid-DNA-Fragmente von 40 kb theoretisch aus, um ein gesuchtes Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,999 finden zu können (Clarke und Carbon, 1976). Die Transformanten wurden auf Hygromycin- und Cytidin-haltigem Medium selektioniert und anschließend auf Wachstum auf Cytidin- und 5-FOA-haltigen Medien getestet. Im Fall einer erfolgreichen Komplementation sollten die Transformanten in der Lage sein, auf diesen Medien zu wachsen. So erhaltene Klone wurden anschließend auf EGI-Aktivität getestet. Falls auch die Deregulation von *egl1* durch dasselbe Cosmid komplementiert werden kann, wäre das ein sicherer Hinweis, dass das Cosmid die entsprechende Mutation der UV-Mutante komplementiert.

Für die Mutanten GW1, GW52, GW53 und GW56 und konnten jeweils zwei Transformanten und für die Mutante GW57 eine Transformante isoliert werden, die diesen Kriterien entsprechen. Die unterschiedlichen Cosmide wurden aus den entsprechenden Transformanten isoliert und erneut in die Mutantenstämme transformiert. Nach Re-Transformation der Cosmide konnten nur pCos1-1, pCos53-19 und pCos57-44 in den Mutanten GW1, GW53 bzw. GW57 erneut die Deregulation von *dik6* und *egl1* aufheben. Nach dem Ansequenzieren der 5'- und 3'-Enden der drei Cosmide konnte die gesamte

Sequenz für die beiden Cosmide pCos53-19 und pCos57-44 aus dem sequenzierten *U. maydis* Genom extrahiert werden. Für pCos1-1 ließen sich hingegen nur etwa 24 kb Sequenz von einem Ende ableiten, da das andere Ende an den nicht sequenzierten Telomerbereich des Chromosoms II angrenzt (J. Kämper, pers. Mitteilung).

Keiner der ORFs, die auf den Cosmiden enthalten sind, ließ durch die Annotation einen Rückschluss auf ein mögliches Kandidatengen zu. Um den komplementierenden ORF zu identifizieren müssten Subklonen hergestellt werden, mit deren Hilfe der Bereiche auf den jeweiligen Cosmiden eingengt werden können. Aus Zeitgründen konnten im Rahmen dieser Arbeit die dafür nötigen Experimente nicht mehr durchgeführt werden.

#### 2.4.4 Isolierung von Aktivatoren der *dik6*-Expression nach Transformation des Stammes GE95 mit einer cDNA-Expressionsbank

Genetische und biochemische Versuche haben gezeigt, dass *dik6* ein direktes b-Zielgen ist, das positiv reguliert wird. Daher schien dieses Gen geeignet, um nach Transkriptionsaktivatoren zu suchen, die entweder unabhängig von bW/bE-Heterodimeren *dik6*-Expression bewirken und/oder als mögliche Kofaktoren des bW/bE-Heterodimers agieren. Von mehreren Homeodomänenproteinen ist gezeigt worden, dass sie mit Kofaktoren interagieren, die einerseits die Spezifität bei der Bindung an DNA modulieren (Elble und Tye, 1991; Jarvis et al., 1989; Stamataki et al., 2001), andererseits aber auch selbst in der Lage sind an DNA zu binden (Stamataki et al., 2001).

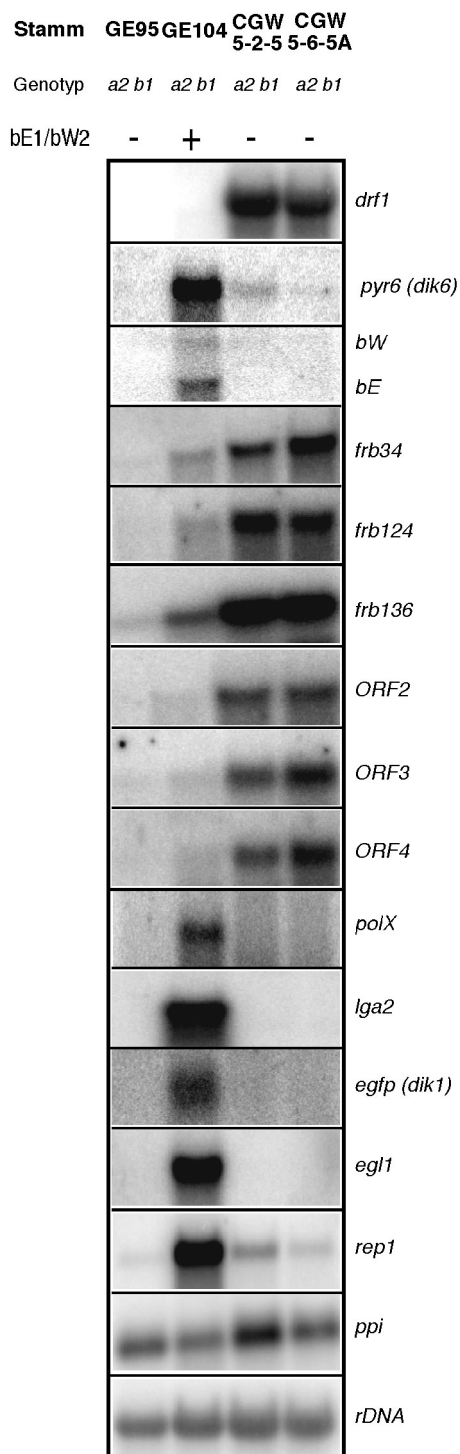
Dazu sollten Gene, die die Transkription von *dik6* in Abwesenheit von b stimulieren können, durch das Einbringen einer im Rahmen dieser Arbeit hergestellten cDNA-Expressionsbank (Material und Methoden, Anhang) in den *U. maydis* Stamm GE95, isoliert werden. Dazu wurden 3 µg Plasmid-DNA der 9 verschiedenen Fraktionen der cDNA-Expressionsbank in GE95-Zellen transformiert und auf Minimal-Regenerationsmedium selektiert. Dabei sollten Zellen nur dann wachsen, wenn sie ein Plasmid tragen, dessen cDNA für ein Protein kodiert, das am *dik6*-Promotor aktivierend auf die Transkription von *pyr6* wirkt. Unter theoretisch  $1,8 \times 10^6$  transformierten *U. maydis* Zellen waren 4 Transformanten (GWC4-1 bis GWC4-4), die cDNA-Plasmide der Fraktion 4 (Fragmentgröße: 900 bis 1.200 bp) enthalten, und 6 Transformanten (GWC5-1 bis GWC5-6), die cDNA-Plasmide der Fraktion 5 (Fragmentgröße: 1.200 bis 1.500 bp) enthalten, in der Lage ohne Zugabe von Cytidin zu wachsen. Nach Vereinzlungsausstrichen wuchsen alle Transformanten auf NM-Medium mit Hygromycin. Da GWC4-1, GWC4-3, GWC4-4 und CGW5-1 in einem weiteren Test aber nicht sensitiv auf 5-FOA reagierten, wurden diese Transformanten nicht weiter untersucht (Daten nicht gezeigt). Aus den restlichen Transformanten wurden die cDNA-Plasmide isoliert und analysiert. Dabei zeigte sich, dass aus den Transformanten CGW4-2, CGW5-3, CGW5-4, CGW5-5 und CGW5-6 konkatemere Plasmide reisoliert wurden (Anhang, Tabelle 10). Zudem enthalten drei der Plasmide zwei unterschiedliche cDNA-Fragmente und ein weiteres drei cDNA-Fragmente (Anhang, Tabelle 10). Die reisolierten Plasmide wurden sequenziert (Anhang, Tabelle 11) und einzeln in GE95-Zellen transformiert, um zu überprüfen, welches der Plasmide Wachstum ohne Zugabe von Cytidin bei den Transformanten vermittelt. Nur mit den Plasmiden pcDNA5-2-5 oder pcDNA5-6-5A wurden Transformanten erhalten, die zum einen sehr gutes Wachstum auf NM-Medium mit Hygromycin und zum anderen Sensitivität auf 5-FOA zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Restriktionsanalyse und die Sequenzierung der in diesen Plasmiden enthaltenen cDNA-Fragmente zeigte, dass es sich um dasselbe 1.688 bp große Fragment handelt, das einen ORF von 1.500 bp umfasst, der von einem 48 bp großen 5'-untranslatierten Bereich und einem 137 bp großen 3'-untranslatierten Bereich flankiert wird. Der ORF kodiert für ein putatives, 500 Aminosäuren großes Protein, das als

Drf1 (Dik gene Regulating Factor 1), bezeichnet wurde. Eine Analyse mit dem PSI-BLAST-Programm (Altschul et al., 1997) ergab, dass Drf1 Ähnlichkeit zu Pho80p aus *S. cerevisiae* (Madden et al., 1988; Toh-e und Shimauchi, 1986), zu dem Protein Preg aus *Neurospora crassa* (Kang und Metzberg, 1993) und zu verschiedenen hypothetischen Preg-ähnlichen Proteinen aus verschiedenen Organismen hat. Die Ähnlichkeit beschränkt sich auf den Bereich zwischen Aminosäureposition 130 und 280, in dem die Identität zu Pho80p und zu Preg und hypothetischen Preg-ähnlichen Proteinen anderer Organismen zwischen 32 und 37% liegt. Eine Analyse von Drf1 mit dem Programmen SMART (Schultz et al., 2000; Schultz et al., 1998) ordnet den Bereich zwischen Aminosäure 150 und 250 in die Familie der Cyclinbox-Proteine ein (Gibson et al., 1994). Mitglieder dieser Proteinfamilie sind neben der Regulation des Zellzyklus auch an Genregulationsprozessen beteiligt (Hicks und Raikhel, 1995; Poon und Hunter, 1995).

#### 2.4.5 Charakterisierung der Transformanten CGW5-2-5 und CGW5-6-5A

Für eine weitere Analyse wurden die zwei unabhängigen Transformanten CGW5-2-5 und CGW5-6-5A ausgewählt, um eventuell auftretende Unterschiede zwischen Stämmen mit frei replizierenden Plasmiden zu ersehen. Es wurde eine Northern-Analyse durchgeführt, um einerseits die Ergebnisse der phänotypischen Analyse zu überprüfen und andererseits Drf1 auf seine von der Domänenstruktur nahegelegte genregulatorische Wirkung zu testen. Als Kontrolle wurde RNA des für die Mutagenese verwendeten Stammes GE95 (*a2b1Δdik1:egfp*, *Δdik6:pyr6*, *Δpyr6*) und RNA desselben Stammes, der zuvor mit dem freireplizierenden Plasmid pGE118 transformiert worden war, verwendet. Dieses Plasmid trägt das *bE1*- und *bW2*-Allel, wobei beide Allele vom  $\text{NH}_4^+$ -reprimierbaren und  $\text{NO}_3^-$  induzierbaren *nar1*-Promotor kontrolliert werden. Wie erwartet zeigt der Stamm GE95 kein *pyr6* Signal und der Stamm GE104, in dem die kompatiblen *bE1*- und *bW2*-Allele exprimiert wurden, ein deutliches *pyr6* Signal (Abbildung 27). In den beiden Transformanten CGW5-2-5 und CGW5-6-5A ist ein deutlich geringeres *pyr6*-Signal detektierbar. Da die Transformanten ein *b1*-Allel tragen, sind die *pyr6*-Signale auf die starke *drf1*-Expression zurückzuführen (Abbildung 27). *dik6* ist das einzige der getesteten direkt b-regulierten Gene, das auch durch *drf1* beeinflusst wird. Sowohl die Transkripte für *lga2* als auch *frb52* können nur im Stamm GE104 nachgewiesen werden. Ebenso werden die weiteren b-regulierten Gene *dik1*, respektive *egfp*, *egl1*, *rep1* und *hum2* nicht von *drf1* beeinflusst. Eine übermäßige *drf1* Expression induziert allerdings die Expression der Gene *frb124* und *frb34*, *frb136*, *orf2*, *orf3* und *orf4* (Abbildung 27). Die letztgenannten Gene gehören zum *cab*-Locus (controlled by *a* and *b* mating type loci), einem 18,1 kb DNA-Abschnitt mit Genen, die ein ähnliches Expressionsprofil zeigen (Brachmann, 2001). Die Expression dieser Gene ist genauso wie die von *frb124* bei Pheromon-Stimulation induziert und alle Gene werden zudem durch ein aktives bW/bE-Heterodimer reprimiert (Brachmann, 2001).





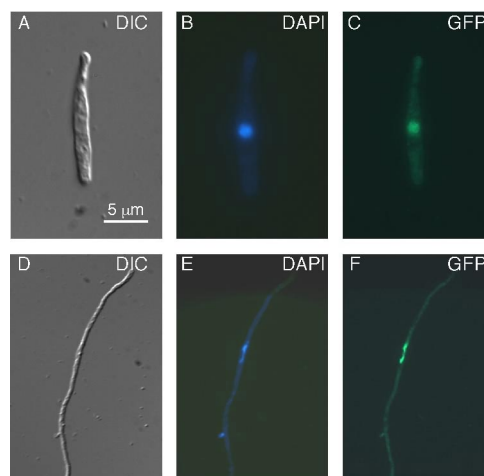
**Abbildung 27: Expressionsanalyse von *drf1*-Überexpressionsstämmen.** Die verwendeten Stämme sind über den Spuren angegeben. Die Stämme CGW5-2-5 und CGW5-6-5A wurden vor RNA-Extraktion 24 h in NM-Medium mit 100 µg/ml Hygromycin inkubiert, der Stamm GE104 in NM-Medium mit 2 µg/ml Carboxin und der Kontrollstamm GE95 wurde in NM-Medium, das zusätzlich noch mit 100 µg/ml Cytidin supplementiert wurde, angezogen. Es wurden 10 µg RNA pro Spur aufgetragen. Zur Mengenkontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer für 18S rRNA spezifischen Sonde und mit einem Fragment des konstitutiv exprimierten Gens für die Peptidyl Prolyl, *cis-trans* Isomerase (*ppi1*) durchgeführt.

Unter den in diesem Versuch gewählten Bedingungen kann bei den Genen *frb34*, *frb124* und *frb136* die Repression durch das bW/bE-Heterodimer nicht beobachtet werden, was darauf zurückzuführen ist, dass die Gene eine zu geringe basale Expression im Stamm GE95 aufweisen. *orf1* kann unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Brachmann, 2001).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Überexpression von *drf1* ein spezifisches Set von b-regulierten Genen beeinflusst. Drf1 führt zur Aktivierung des b-induzierten Gens *dik6* als auch zur Aktivierung der sechs Gene im *cab*-Locus sowie zur Aktivierung von *frb124*.

## 2.4.6 Drf1 ist im Kern lokalisiert

Um die Annahme zu überprüfen, dass es sich Drf1 um ein regulatorisches Protein handelt, wurde Drf1 in der Zelle lokalisiert. Erste Hinweise auf eine mögliche Lokalisierung gab eine Computeranalyse mit dem Algorithmus des Programms PSORTII (Nakai und Horton, 1999; Nakai und Kanehisa, 1992) nach dem sich Drf1 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,552 im Kern befindet. Um dem nachzugehen, wurde das Plasmid pGE220, das eine translationale Fusion des *egfp*-Gens mit dem ORF von *drf1* trägt, in einfacher Kopie in den *ip*-Locus des *U. maydis* Stammes AB31 (*a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE1*) eingebracht. Dieser Stamm ermöglicht es, das eGFP::Drf1 Fusionsprotein in Sporidien und in einem b-abhängigen Filament zu lokalisieren.



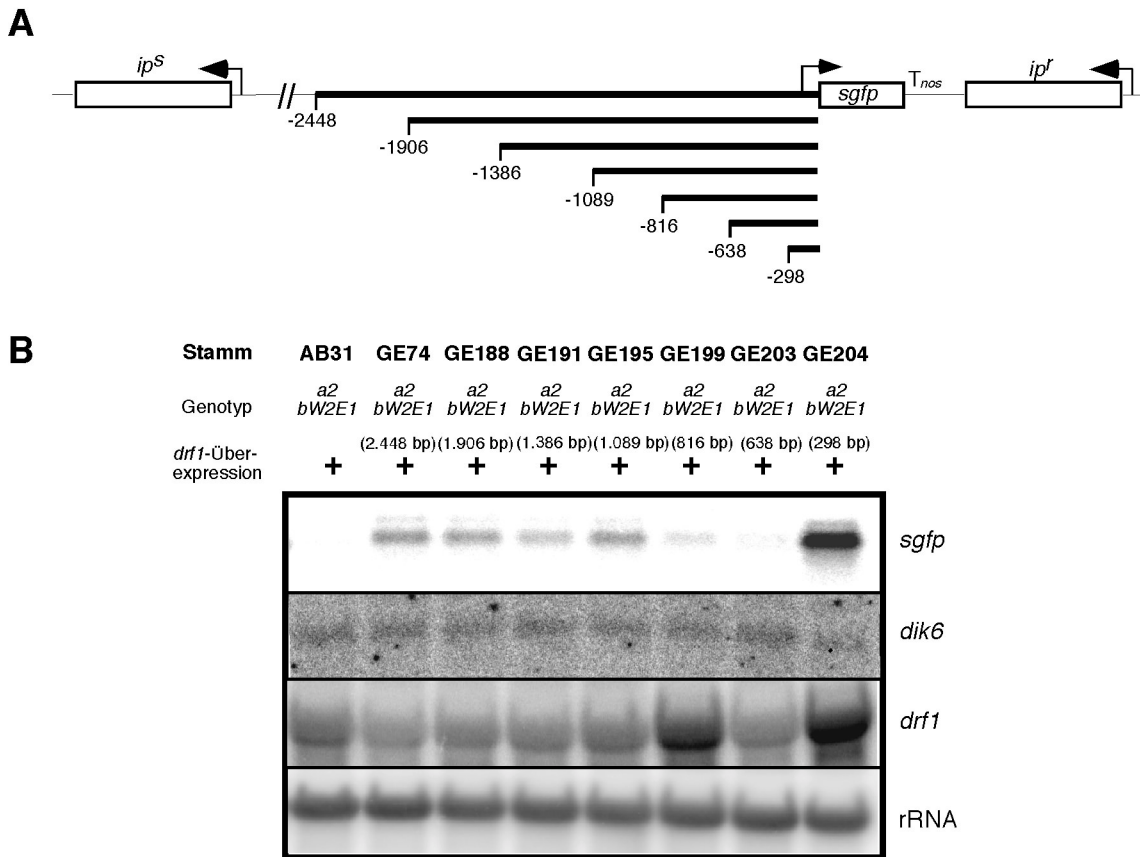
**Abbildung 28: Drf1 lokalisiert im Zellkern.** Der Stamm GE279 (*a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE1, P<sub>o2tef</sub>:egfp::drf1*) wurde in CM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert und anschließend für 12 h in CM-Ara inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels DIC-Mikroskopie und Epifluoreszenz-Mikroskopie an einem Axiophot II (Zeiss) jeweils vor und 12 h nach Induktion der *b*-Genexpression. A: DIC-Mikroskopie einer Sporidie in CM-Glc; B: Fluoreszenzmikroskopie einer Sporidie, deren Kern zur Kontrolle mit DAPI gefärbt wurde; C: Epifluoreszenz-Mikroskopie einer Sporidie, deren Kern durch die Anwesenheit des EGFP::Drf1-Fusionsproteins grün gefärbt ist; D: DIC-Mikroskopie einer Hyphe, 12 h nach *b*-Geninduktion in CM-Ara; E: Fluoreszenzmikroskopie einer Hyphe, deren Kern zur Kontrolle mit DAPI gefärbt wurde; F: Epifluoreszenz-Mikroskopie einer Hyphe, deren Kern durch die Anwesenheit des EGFP::Drf1-Fusionsproteins grün gefärbt ist. Der Längenmaßstab bezieht sich auf alle Abbildungen und beträgt 5 µm.

Die resultierende Transformante GE279 ( $a2 P_{crg1}:bW2, bE1, P_{o2tef}:egfp::drf1$ ) wurde in CM-Medium mit Glucose bis  $OD_{600} \approx 0,5$  angezogen und anschließend in das gleiche Medium mit Arabinose überführt, was zu einer Induktion der Expression von *bW2* und *bE1* führt.

Vor und 12 Stunden nach Induktion wurden Zellaliquots entnommen und mikroskopisch untersucht (Abbildung 28A, D). Sowohl in Sporidien als auch in Filamenten konnte beobachtet werden, dass sich eGFP-Drf1 im Kern befindet, da die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins mit der blauen Fluoreszenz des DNA-spezifischen DAPI-Farbstoffs überlagert (Abbildung 28B, C und E, F). Ein aktives bW/bE-Heterodimer hat damit keinen Einfluss auf den Kernimport von Drf1.

#### **2.4.7 Drf1 und das bW-bE Fusionsprotein His-Kon8 regulieren *dik6*-Expression über gemeinsame Promotorbereiche**

Die Expression von *dik6* wird einerseits nach Überexpression von Drf1 und andererseits vom aktiven bW/bE-Heterodimer induziert. Dabei ist der *dik6*-Promotorbereich zwischen – 816 bp und – 298 bp für die Regulation durch bW/bE-Heterodimere wichtig. Um herauszufinden, welcher Bereich des *dik6*-Promotors die regulatorischen Elemente für eine Kontrolle durch Drf1 enthält, wurde eine Promotordeletionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden die *U. maydis* Stämme GE74, GE188, GE191, GE195, GE199, GE203 und GE204 mit dem Plasmid pcDNA5-2-5 transformiert (Abbildung 29A). Dieses Plasmid enthält den ORF von *drf1* unter der Kontrolle des starken, konstitutiven *hsp70*-Promotors (Holden et al., 1989) und vermittelt dadurch eine *drf1*-Überexpression. Die resultierenden Transformanten wurden in CM-Medium mit Glucose und Hygromycin bis  $OD_{600} \approx 0,6$  angezogen, um aus dem Zellmaterial die Expression des *sgfp*-Reportergens auf Transkriptionsebene zu analysieren. Unter diesen Bedingungen wurde gezeigt, dass die Expression der *bE1*- und *bW2*-Allele reprimiert ist und die Expression des *dik6:sgfp*-Reportergenkonstrukt nicht induziert werden kann (siehe Abschnitt 2.2.3). Als Kontrolle wurde der Stamm AB31 ( $a2 P_{crg1}:bW2, bE1$ ), der ebenfalls mit dem Plasmid pcDNA5-2-5 transformiert wurde, verwendet. Zunächst wurden Northern-Analysen durchgeführt. Dabei konnten, wie erwartet, in allen Stämmen starke Signale für *drf1* detektiert werden (Abbildung 29B). Da die *b*-Genexpression unter den Versuchsbedingungen reprimiert ist, muss in allen Stämmen die Induktion der *dik6* Expression durch eine *drf1*-Überexpression induziert sein.



**Abbildung 29: Eingrenzung *cis*-aktiver Promotor-Elemente für eine *Drf1*-abhängige Regulation von *dik6*.** **A)** Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *ip*-Locus nach singularer homologer Integration der verschieden langen *dik6*-Promotor:*sgfp* Reporterkonstrukte. Die entsprechenden Stämme sind: AB31, GE74 (2.448 bp), GE188 (1.906 bp), GE191 (1.386 bp), GE195 (1.089 bp), GE199 (816 bp), GE203 (638 bp) und GE204 (298 bp). Alle Stämme wurden mit pcDNA5-2-5 transformiert. **B)** Northern-Analyse der *dik6*-Promotor:*sgfp* Reporterstämme. Kultivierung siehe Text; zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde 10 µg RNA geladen. Zur Mengenkontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer für 18S rRNA spezifischen Sonde durchgeführt.

In den Stämmen GE74, GE188, GE191, GE195, die *dik6*-Promotorfragmente von - 2.448 bp, - 1.906 bp, - 1.386 bp und - 1.089 bp tragen, konnte eine vergleichbare *sgfp*-Expression nachgewiesen werden, wohingegen Promotorfragmenten einer Länge von 816 bp und 638 bp eine sehr deutliche Abnahme der Transkriptmenge des Reportergens bewirkten (Abbildung 29B). Ein *dik6*-Promotorfragment von 298 bp führte zu einer stärkeren Expression des Reportergens (Abbildung 29B).

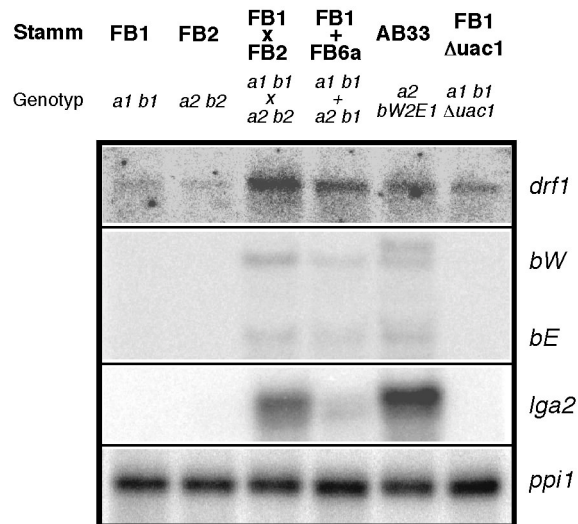
Die Ergebnisse der Promotordeletionsanalyse zeigen, dass die für eine *Drf1*-abhängige Expression notwendigen regulatorischen Elemente zwischen - 1.089 bp und - 298 bp liegen und demnach mit den für eine b-abhängige Regulation notwendigen *cis*-aktiven Elemente, die zwischen -816 bp und -298 bp liegen, überlappen.



### 2.4.8 Expressionsanalyse von *drf1*

Um mögliche Einflüsse der *a*- und *b*-Paarungstyploci auf die Expression von *drf1* zu untersuchen, wurde eine Northern-Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Expression von *drf1* in einer Mischung von FB1- (*a1b1*) und FB2- (*a2b2*) Zellen am höchsten und in Sporidien nur basal ist (Abbildung 30). Da in einer Mischung kompatibler Wildtyp-Stämme regulatorische Effekte einerseits durch Pheromonstimulation und andererseits durch die Bildung funktioneller bW/bE-Heterodimere nach Zellfusion entstehen, wurden Kontrollen zur Analyse herangezogen. Eine Mischung von Zellen der Stämme FB1 (*a1b1*) und FB6a (*a2b1*) diene als Indikator für pheromonabhängige Regulation und ermöglicht so eine Unterscheidung zum regulatorischen Einfluss von aktiven bW/bE-Heterodimeren auf die Expression von *drf1*. Für die Untersuchung des Einflusses der *b*-Gene wurde der Stamm AB33 (*a2 P<sub>nar1</sub>:bW2, bE1*) verwendet und indikativ für filamentspezifisch exprimierte Gene der Stamm FB1Δ*uac1* (*a1b1Δuac1*) verwendet, da er b-unabhängig filamentös wächst (Gold et al., 1994a).

Die Expressionsanalyse zeigte, dass die pheromonabhängige Regulation zusammen mit dem b-Komplex synergistisch auf die Expression von *drf1* wirken (Abbildung 31). Die *drf1*-Expression in dem Stamm FB1Δ*uac1* ist etwa vergleichbar zu der in den Stämmen FB1 und FB2.

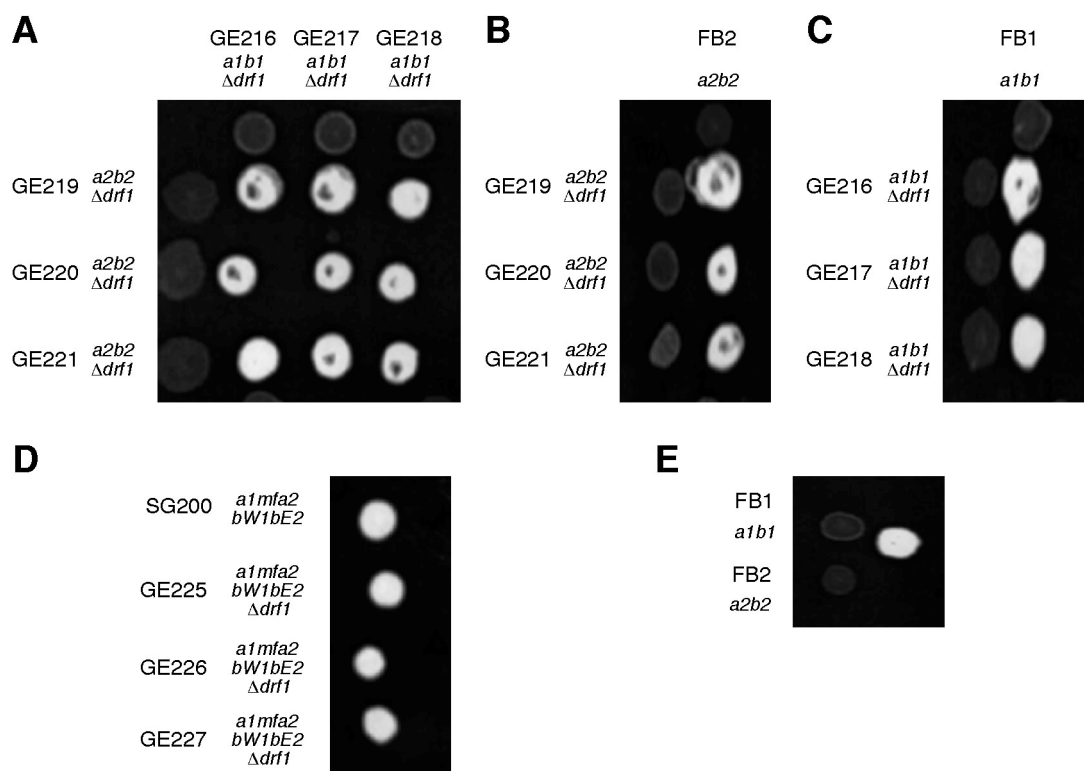


**Abbildung 30: Northern-Analyse der Expression von *drf1* unter Kreuzungsbedingungen.** Einzelheiten zu den Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 2.3.3 und Abbildung 21.

## 2.4.9 *drf1*-Deletion

Zur Funktionsanalyse von *drf1* wurden Deletionsmutanten hergestellt, bei denen in den Stämmen FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) der 1.503 bp große ORF vollständig entfernt und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Zusätzlich wurde in dem solopathogenen Stamm SG200 (*a1mfa2bW2bE1*), der ohne vorherige Fusion Maispflanzen infizieren kann, der *drf1*-ORF deletiert, um einen möglichen Einfluss von *drf1* auf Postfusions-Ereignisse zu analysieren. Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von *drf1* auf die b-induzierte Filamentbildung wurde ein *drf1*-Nullallel in den Stamm AB31 (*a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE1*) eingeführt.

Die entsprechenden Transformanten GE216, GE217 und GE218 (*a1b1Δdrf1*) sowie GE219, GE220 und GE221 (*a2b2Δdrf1*) differieren weder im Wachstum noch in der Zellmorphologie offensichtlich von Wildtyp-Stämmen (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich ihres Kreuzungsverhalten auf aktivkohlehaltigem Festmedium und im Bezug auf Pathogenität unterscheiden sie sich auch nicht von den jeweiligen Ausgangsstämmen (Abbildung 31A, B, C und Tabelle 5).



**Abbildung 31: Kreuzungsverhalten der *drf1*-Deletionsmutanten.** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung der dikaryotischen Filamente wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte weiß.

**Tabelle 5: Pathogenität der *drf1*-Deletionsmutanten**

Inoculum	Infizierte Pflanzen*	Tumorbildung in %
FB1 x FB2	26	100%
GE216 x GE219	49	90%
GE217 x GE220	50	84%
GE218 x GE221	47	85%
SG200	55	98%
GE225	42	93%
GE226	50	98%
GE227	41	93%

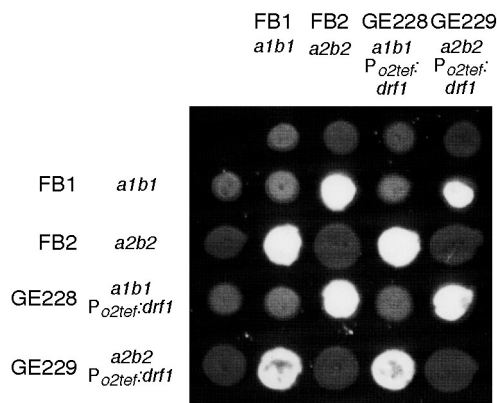
\*Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung 14 Tage nach Infektion.

Ebenso sind die von *drf1*-Deletionsmutanten hervorgerufenen Tumore weder in der Größe noch in der Anzahl von Wildtyp-Tumoren unterschiedlich (Daten nicht gezeigt). Auch die SG200 (*a1mfa2bW2bE1*) *drf1*-Deletionsmutanten (GE225, GE226 und GE227) sind in der Lage, filamentös auf aktivkohlehaltigem Festmedium zu wachsen und unterscheiden sich in ihrem pathogenen Potenzial nicht vom Ausgangsstamm (Abbildung 31D, Tabelle 5). Bei der Transformante GE222 (*AB31Δdrf1*) konnte auch kein Einfluss von *drf1* während der b-abhängigen Filamentbildung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Damit wurde zwar für *drf1* eine Rolle bei der Regulation einiger b-abhängiger Gene gezeigt, die allerdings keinen Einfluss auf den Infektionsprozess hat.

#### 2.4.10 Überexpression von *drf1*

Durch die Überexpression von *drf1* kann die Expression der Gene *dik6*, *frb34*, *frb124*, *frb136*, *orf2*, *orf3* und *orf4* beeinflusst werden. Da von *dik6* gezeigt wurde, dass eine konstitutive Expression zu einer Reduzierung der Pathogenität führt, wurde untersucht, ob die Überexpression von *drf1* möglicherweise auch einen Einfluss auf die Pathogenität hat. Dazu wurde der ORF von *drf1* transkriptionell mit dem starken, konstitutiven *o2tef*-Promotor fusioniert und das resultierende Plasmid pGE167 in einfacher Kopie in den *ip*-Locus der Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) eingebracht. Die resultierenden Transformanten GE228 (*a1b1 P<sub>o2tef</sub>;drf1*) und GE229 (*a2b2 P<sub>o2tef</sub>;drf1*) unterschieden sich weder im Bezug auf ihr Wachstumsverhalten noch hinsichtlich ihrer Zellmorphologie von den Ausgangsstämmen (Daten nicht gezeigt). Ebenso war das Kreuzungsverhalten auf aktivkohlehaltigem Festmedium nicht gestört (Abbildung 32).





**Abbildung 32: Kreuzungsverhalten der *drf1*-Überexpressionsmutanten.** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung der dikaryotischen Filamente wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte weiß.

Bei Pflanzeninfektionen zeigte sich allerdings, dass nur 43 % aller Pflanzen, die mit einer Mischung von GE228 (*a1b1 P<sub>o2tef</sub>:drf1*) und GE229 (*a2b2 P<sub>o2tef</sub>:drf1*) infiziert waren, Tumore ausbilden konnten (Tabelle 6). Die sich entwickelnden Tumore waren von Tumoren, die von einer Mischung aus FB1 und FB2 induziert worden waren, nicht zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt), und isolierte Sporen waren in der Lage wieder auszukeimen (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 6: Pathogenität der *drf1*-Überexpressionsmutanten**

Inoculum	Infizierte Pflanzen*	Tumorbildung in %
FB1 x FB2	81	98%
GE228 x GE229	69	43%

\*Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung 14 Tage nach Infektion.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Überexpression von *drf1* einen negativen Effekt auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis* hat.



## 3. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *U. maydis*. Dies sollte erlauben, weitergehende Einblicke in b-vermittelte Genregulationsprozesse in *U. maydis* zu gewinnen. Unter den bereits bekannten b-regulierten Genen *dik6*, *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1* konnte nur *dik6* als ein direkt durch das bW/bE-Heterodimer reguliertes Gen eingeordnet werden. *dik6* kodiert für ein Siebentransmembranprotein, dessen Verlust zu einer attenuierten Pathogenität von *U. maydis* Stämmen führt. Mittels eines *in silico* Ansatzes wurde *dik6* aufgrund der 35%igen Identität seines Genproduktes zu Dik6 isoliert. Auch dieses Gen unterliegt einer direkten Kontrolle durch das bW/bE-Heterodimer. Durch die simultane Verwendung von *dik6*, *dik1* und *egl1* als Reportergene konnten sowohl potentielle negative Regulatoren als auch ein Aktivator, *drf1* isoliert werden. Bei Überexpression von Drf1 wurde die Transkription von *dik6*, *frb124* und der Gene im *cab*-Locus spezifisch aktiviert.

### 3.1 b-regulierte Gene

#### 3.1.1 b-regulierte Gene lassen sich bezüglich ihres Expressionsmusters in diskrete Klassen einteilen

Für die bekannten b-regulierten Gene *dik6*, *dik1*, *hum2*, *egl1* und *rep1* konnte bislang nicht eindeutig gezeigt werden, ob sie nur aufgrund des aktiven b-Komplexes oder aufgrund des Morphologiewechsels differentiell exprimiert werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit ermöglichten nun eine entsprechende Klassifizierung. Für *dik6*, *dik1* und *egl1* konnte gezeigt werden, dass sie nicht in einem Stamm exprimiert werden, der aufgrund einer Deletion des *uac1*-Gens konstitutiv filamentös wächst (Gold et al., 1994a). Im Gegensatz dazu wurden *hum2* und *rep1*, die beide für hydrophobe Oberflächenproteine kodieren, in diesem b-unabhängigen Filamenttyp exprimiert. Die erste Gruppe von Genen wurde daher als b-spezifisch klassifiziert, das heißt die Expression dieser Gene ist mit dem Auftreten des b-spezifischen Filaments gekoppelt. *hum2* und *rep1* zählen hingegen zu den allgemein filament-spezifischen Genen, da ihre Expression auch in einem b-unabhängigen Filament beobachtet wird. Da die Expression von *rep1* auch durch Pheromon induziert ist, erscheint es möglich, dass das *rep1*-Genprodukt als strukturelle Komponente, die der Zellwand Hydrophobizität verleiht, auch bei der Bildung von Konjugationshyphen eine Rolle spielt. *hum2* und *rep1* können daher in Zukunft als Markergene Aufschlüsse über allgemeine Prozesse bei der

Filamentbildung liefern. Mutanten mit Deletionen der aktivierenden Komponenten des cAMP-Signalweges wachsen vermutlich aufgrund ihres erniedrigten, intrazellulären cAMP-Spiegels filamentös (Gold et al., 1994a; Regenfelder et al., 1997). Daher wurde spekuliert, dass auch in dikaryotischen Filamenten die cAMP-Konzentration erniedrigt sein sollte (Gold und Kronstad, 1994; Kronstad, 1997). Entsprechend könnte die Expression der b-filamentspezifisch exprimierten Gene *dik6*, *dik1* und *egl1*, außer durch den aktiven b-Komplex, auch durch ein erniedrigtes, intrazelluläres cAMP-Niveau, im Dikaryon beeinflusst werden.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein  $\Delta ubc1$ -Stamm hergestellt, der *bW2*- und *bE1*-Gene trägt, die ausgehend vom *nar1*-Promotor exprimiert werden. Ohne *b*-Geninduktion weisen Zellen dieses Stammes denselben “multiple budding”-Phänotyp auf, der auch durch die exogene Zugabe von cAMP zu Wildtyp-Zellen beobachtet wird und eine Aktivierung des cAMP-Signalweges anzeigt. Nach Induktion der *b*-Genexpression zeigte der Stamm weder in Flüssig- noch auf Festmedium das typische b-Filament, bei dem leere Hyphenabschnitte durch Septen abgeschnürt werden, so dass die Filamente unipolar weiterwachsen können (Brachmann, 2001; Steinberg et al., 1998). Da *dik6*, *dik1* und *egl1* in diesem Stamm, der nicht mehr die typischen Merkmale eines b-Filaments aufweist, exprimiert werden, können sie als b-spezifisch und filament-unabhängige Gene klassifiziert werden.

Der hergestellte Stamm zeigt einen interessanten Phänotyp. Einige der am Pol einer Mutterzelle vorhandenen Tochterzellen trennen sich ab, wohingegen die noch verbleibenden Knospen beginnen, filamentös auszuwachsen, ohne dass Septen zur Abtrennung von leeren Abschnitten eingezogen werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass der cAMP-Signalweg b-abhängiges, filamentöses Wachstum negativ reguliert und andererseits der b-Komplex den cAMP-Weg reprimiert. Dieser Regulationsmechanismus würde dem in einem Modell zur Kontrolle des dimorphen Wachstums von *U. maydis* Zellen vorgeschlagenen Konzept entsprechen (Gold et al., 1994a), dass sich die Kontrollmechanismen für die beiden unterschiedlichen Wachstumsformen, das heißt hefeähnliches Wachstum aufgrund eines aktiven cAMP-Signalweges, und filamentöses Wachstum aufgrund des aktiven b-Komplexes, gegenseitig inhibieren, um die Vitalität von Zellen zu gewährleisten.

Die mit dem erzeugten Stamm durchgeführten Experimente lassen den Schluss zu, dass der b-Komplex den cAMP-Signalweg unterhalb von *Adr1* negativ beeinflusst, indem er den “multiple budding”-Phänotyp unterdrückt und filamentöses Wachstum der Knospen induziert. Demnach könnte das bW/bE-Heterodimer den aktiven cAMP-Signalweg überspielen und auf transkriptioneller Ebene Gene induzieren, die von cAMP-abhängigen Mechanismen reprimiert werden.

Eine Beeinflussung des cAMP-Signalweges durch den aktiven b-Komplex konnte in einem Fall bereits gezeigt werden. Ein aktives bW/bE-Heterodimer führte auf transkriptioneller Ebene zu einer vierfachen Reduktion von *adr1*-Transkripten (Brachmann, 2001). Als Folge ist es denkbar, dass cAMP-Signale weniger effizient auf *Adr1*-abhängige Prozesse übertragen

werden, da die PKA als Effektormolekül nicht in ausreichender Menge vorhanden ist. Dazu passt der Befund, dass in einem Stamm, der ein aktives bW/bE-Heterodimer konstitutiv exprimiert und filamentös wächst, einen hohen cAMP-Spiegel aufweist (Krüger, 1999).

Es sind aber noch eine weitere Reihe von Szenarien denkbar, in denen der b-Komplex die cAMP-Kaskade negativ regulieren könnte: z. B. die Rekrutierung eines Repressorkomplexes, der die Expression cAMP-abhängig regulierter Gene reprimiert. Mit Ssq1 wurde in *U. maydis* ein zu Ssn6p aus *S. cerevisiae* homologes Protein isoliert (Loubradou et al., 2001). In Hefe kann Ssn6p zusammen mit vier Tup1p-Molekülen (Redd et al., 1997) einen Komplex ausbilden, der als genereller Transkriptionsrepressor wirkt (Smith und Johnson, 2000). Dieser Komplex kann z. B. von den heterodimeren Homeodomänenproteinen Mata1p und Mat $\alpha$ 2p zur Repression von Genen rekrutiert werden (Johnson, 1995). Es wird angenommen, dass Ssq1 in *U. maydis* die gleiche Funktion erfüllt und antagonistisch zur cAMP-Kaskade wirkt. Interessanterweise ist die Transkription der Gene des *cab*-Locus durch eine aktive cAMP-Kaskade induziert, und durch den aktiven b-Komplex reprimiert (Brachmann, 2001). Ebenso wäre es denkbar, dass das bW/bE-Heterodimer eine spezifische Phosphatase aktiviert, die von Adr1 phosphorylierte Protein inaktiviert, wodurch eine Signalweiterleitung unterbunden wird.

### 3.1.2 *dik6* und *dkh6* sind direkte Zielgene des bW/bE-Heterodimers

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von genetischen und biochemischen Experimenten gezeigt, dass *dik6* und *dkh6* direkte Zielgene des bW/bE-Heterodimers sind. Die Deletion von Fragmenten aus dem *dik6*- und *dkh6*-Promotorbereich, die die b-Bindestellen enthalten, führte zu einer signifikanten Reduktion der Induktion beider Gene und dieselben Fragmente vermittelten in einem Hefe Ein-Hybrid System eine bW2/bE1-abhängigen Aktivierung des *lacZ*-Reportergens. Des Weiteren bildeten Fragmente (*bbs3* im Promotor von *dik6* und *bbs4* im Promotor von *dkh6*), die Ähnlichkeiten zu den bereits bekannten b-Bindestellen von *lga2* (*bbs1*) und *frb52* (*bbs2*) aufweisen (Abbildung 33), mit einem bW-bE Fusionsprotein spezifische Protein/DNA-Komplexe aus. Vergleicht man die vier b-Bindestellen miteinander, so stellt man fest, dass die b-Bindestellen untereinander zwischen 11 und 17 identische Basenpaare aufweisen und alle nur 7 identische Basenpaare gemeinsam haben. In allen Sequenzen ist das Basentriplett TGA im Abstand von 8 bis 9 Basenpaaren auffällig. Zieht man noch Basenpaare, die diesem Basentriplett benachbart sind, für eine Analyse heran, so zeigt sich, dass ein zum *hsg*-Motiv aus *S. cerevisiae*, an das das Mata1p/Mat $\alpha$ 2p-Heterodimer bindet (Goutte und Johnson, 1988), ähnliches Motiv in den vier b-Bindestellen vorhanden ist. Möglicherweise könnte dies ein Hinweis auf eine evolutionäre Konservierung des Regulationsmechanismus von Homeodomänenproteinen sein. Interessanterweise enthält keine der b-Bindestellen die Tetranukleotid-Konsensussequenz ATTA, von der gezeigt ist, dass sie mit hochkonservierten Aminosäuren innerhalb der Homeodomäne verschiedener Homeodomänenproteine interagiert (Gehring et al., 1994b). Jedoch muss dazu angemerkt

werden, dass bE1 als ein essentieller Partner des heterodimeren b-Komplexes zur Klasse der atypischen Homeodomänenproteine gehört (Bürglin, 1994), die einige Aminosäuren, von denen angenommen wird, dass sie für den Kontakt mit der DNA wichtig sind, nicht aufweisen.

	—		—
<i>lga2</i>	C A T G A T G A G A A G T G T G A C A G A C T G T G -		
<i>frb52</i>	A A T G A T C A G C A G A A T G A C A C G C T - T G C		
<i>dkh6</i>	G T T G A A G C G A A G C - T G A C A A G G A C A A T		
<i>dik6</i>	C G T G A C G A C A A T C G T G A A T C A C G A A T -		

**Abbildung 33: Vergleich der b-Bindestellen im *dkh6*-, *dik6*-, *frb52*- und im *lga2*-Promotor** Die durch Bindung von His-Kon8 ermittelten Sequenzen sind dargestellt. Identische Nukleotide zwischen den Sequenzen sind durch graue Kästen hinterlegt. Die schwarzen Balken bezeichnen die TGA-Basentriplets.

Sowohl für *dik6* als auch für *dkh6* können zusätzliche *cis*-regulatorische Elemente postuliert werden. Bei der Promotordeletionsanalyse konnte beobachtet werden, dass die Deletion des Bereichs zwischen – 816 bp und – 638 bp im Fall von *dik6*, und die Deletion des Bereichs zwischen – 543 bp und – 351 bp im Fall von *dkh6* zu einer signifikanten Reduktion der Geninduktion durch das bW/bE-Heterodimer führt. Für das stromaufwärts der *bbs3*-liegende Fragment im *dik6*-Promotor wurde in Gelretardationsexperimenten weder Bindung an das bW-bE Fusionsprotein nachgewiesen noch weist das Fragment Ähnlichkeiten zu *bbs*-Motiven auf, wohingegen im Fall von *dkh6* auf dem stromaufwärts von *bbs4* liegenden Fragment ein Element mit geringer Ähnlichkeit zu den bekannten b-Bindestellen zu finden ist (nicht gezeigt) und DNA/Proteinkomplexe mit dem bW-bE Fusionsprotein beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Geninduktion von *dik6* und *dkh6* nach der Deletion der stromaufwärts von *bbs3* und *bbs4* liegenden Fragmente wäre, dass eine kooperative Bindung mehrerer bW/bE-Heterodimere an den *dik6*- bzw. *dkh6*-Promotor erfolgt. Die im Experiment komplexierten DNA-Fragmente enthalten demnach die b-Bindestellen mit der höchsten Affinität. Weitere potentielle, stromaufwärts liegende b-Bindestellen würden eine niedrige Affinität aufweisen und nur durch kooperative Bindung besetzt werden. Im Fall von *dkh6* konnte eine Bindung des bW-bE Fusionsproteins an ein stromaufwärts von *bbs4* liegendes Fragment gezeigt werden, im Fall von *dik6* hingegen nicht. Eine Erklärung wäre, dass die im Fall von *dik6* in Gelretardationsexperimenten getesteten Fragmente einzeln untersucht wurden, weshalb für stromaufwärts von *bbs3* gelegene Fragmente zwischen – 1.089 bp und – 816 bp sowie – 816 bp und – 638 bp vor dem Translations-Startpunkt von *dik6* keine Protein/DNA-Komplexe nachgewiesen werden konnten. Für die Möglichkeit einer kooperativen Bindung spricht auch der Befund, dass die interne Deletion eines der obenangeführten 5'-Regionen keinen Einfluss, die Entfernung des Bereichs zwischen – 1.089 bp und – 638 bp hingegen die Aktivität des Promotors deutlich reduzierte (nicht gezeigt). Für die Regulation der *lga2*-Expression wird ein ähnliches Modell

der kooperativen Bindung von bW/bE-Heterodimeren diskutiert (T. Walther, J. Kämper, pers. Mitteilung), da eine *lga2*-Promotoranalyse zeigte, dass die Deletion eines 34 bp großen Fragments, das stromaufwärts an das Promotorfragment angrenzt, das die b-Bindestelle enthält, zu einem signifikanten Rückgang der *lga2*-Expression führt (T. Walther, J. Kämper, pers. Mitteilung). Vergleicht man die stromaufwärts der b-Bindestellen im Promotor von *lga2*, *dik6* und *dkh6* liegenden DNA-Sequenzen, findet man interessanterweise mehrere Abschnitte, die identische Nukleotide aufweisen (Abbildung 34).

```

lga2 -305 -----GAAACTCGCTTCG--CGTTTTCTGGTGGGACCCA--274
dik6 -816 GATCAAAGCATCCTTGCAGCGAGATCAGTGCCTGTTGTGGCGCAAACCGT-767
dkh6 -513 GATCGTGCACTACTGGCA--TCGTTTTAGACCTCCTTCTCGTTGACAACGG-466

lga2 -273 GACGCATGTATAACGCAGCTGTGCGCTCGAGCCTC-TGAGAGGCGTTTCT-225
dik6 -766 GTTAGCCGAACAAGACCAGAGTGCAAGGATGCTGGATGATGTTTCGTTTAT-717
dkh6 -465 TTGCGGACTGGAAGGCGCCGGGGCGCTCAAGCGGCACAAGCTTGGGTTTA-416

lga2 -224 TGCAAGCTGTCTGGGCCTCC-TCAAGAGTGTATTGTTCC-ACTTTCATG-A-178
dik6 -716 TGATTTGACCCAGCCCAATGTCAACAGGACAGCGTGCC-GAGTCCAAGGA-668
dkh6 -415 ACGTTTTCGCAAATTGCGCCAACAAGCCGCTCTTAGACCTGCGCTTGGGCC-372

```

**Abbildung 34: Vergleich der DNA-Sequenz von Fragmenten, die distal der b-Bindestellen im *lga2*-, *dik6*-, und im *dkh6*-Promotor liegen.** Identische Nukleotide sind durch graue Kästen hinterlegt. Die Angabe der Nukleotidpositionen bezieht sich auf die Translationsstartstelle des jeweiligen Gens.

Möglicherweise stellen diese Basenabfolgen *cis*-regulatorische Elemente für weitere Transkriptionsfaktoren und/oder b-Bindestellen dar. Um dies herauszufinden, könnten weitergehende Analysen wie z. B. DNaseI-Protektionsexperimente oder das Hefe Ein-Hybrid System herangezogen werden. Für andere Homeodomänenproteine wurde beschrieben, dass nur schwache Übereinstimmungen von deren Bindesequenzen gefunden wurden. In zwei verschiedenen Enhancern des *fushi tarazu*-Gens (*ftz*) wurden Sequenzen gefunden, die sich nur gering ähneln und vom fushi tarazu-Protein (Ftz) gebunden werden (Pick et al., 1990). Zudem konnte gezeigt werden, dass vor allem strukturelle Voraussetzungen und weniger eine bestimmte Sequenz für die Spezifität von Homeodomänen wichtig ist (Billeter, 1996; Billeter et al., 1996).

Zusammengenommen zeigen die ermittelten Ergebnisse, dass von den derzeit vorliegenden Daten noch keine eindeutige Konsensussequenz für b-Bindestellen abgeleitet werden kann. Jedoch kann angenommen werden, dass die Isolierung und Charakterisierung weiterer direkter b-Zielgene dazubeitragen wird, eine Konsensussequenz zu ermitteln, mit der eine Genom-weite Suche nach b-Zielgenen durchgeführt werden kann.

### 3.1.3 *dik6* und *dkh6* werden nicht in der späten Infektionsphase exprimiert

Die Analyse der *dik6*-Expression zeigte, dass das Gen möglicherweise nur so lange während der frühen Infektionsphase in *U. maydis*-Zellen exprimiert ist, bis die dikaryotische Hyphe in die Wirtspflanze eingedrungen ist. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass das bW/bE-Heterodimer während der frühen Infektionsphase aktiv ist, da beobachtet wurde, dass das *mfa1*-Gen einer Repression und das *lga2*-Gen in diesem Stadium einer Induktion durch den aktiven b-Komplex unterliegt (Aichinger, 2000). In darauf folgenden Stadien der Infektion bis hin zur Sporenbildung kann keine *dik6*-Expression nachgewiesen werden. Da die Fluoreszenzintensität des verwendeten sGFP-Proteins gering war und diese bei der Mikroskopie von Pflanzenpräparaten zum Teil noch weiter abgeschwächt wird, könnte dies die Beobachtung, dass *dik6* nur während der frühen Infektionsphase exprimiert ist, auch erklären. Im Fall von *dik6* konnte jedoch gezeigt werden, dass eine stadienspezifische Expression wichtig ist, um die volle pathogene Entwicklung zu gewährleisten. Die Überexpression von *dik6* führt zu einer signifikanten Reduktion der pathogenen Entwicklung. Wegen der geringen Aktivität des *dkh6:sgfp* Reporterkonstrukts konnte eine Analyse der *dkh6*-Expression während der frühen Infektionsphase nicht durchgeführt werden (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Northern-Analysen lassen es wahrscheinlich erscheinen, dass *dik6* und *dkh6* stadienspezifisch exprimiert sind, da in Tumorgewebe einer Infektion mit HA103, einem Stamm, der bW2 und bE1 konstitutiv exprimiert, weder die Expression von *dik6* noch die Expression von *dkh6* (nicht gezeigt) nachgewiesen werden kann. Eine Möglichkeit dafür könnte sein, dass aufgrund der geringen Menge an Pilz-RNA in Tumorgewebe der Nachweis von *dik6* und *dkh6* schwierig ist. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die b-regulierten Gene *lga2*, *egl1* und *dik1* im Tumorgewebe einer Kreuzung kompatibler Wildtyp-Stämme exprimiert werden (Quadbeck-Seeger et al., 2000). Dieser Befund spricht dafür, dass das bW/bE-Heterodimer auch in den späten Infektionsstadien als Regulator der pathogenen Entwicklung wirkt. Es wird daher vermutet, dass die beobachtete Reduktion der *dik6*- und *dkh6*-Expression von unbekanntem, negativ wirkenden Faktoren bewirkt wird. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass die Analyse des *dik6*- und *dkh6*-Promotors zeigte, dass in beiden Fällen negativ regulatorisch wirkende Elemente vorhanden sind (siehe Abschnitt 2.2.3 und 2.3.4).



### 3.1.4 *dik6*-Expression wird negativ reguliert

Im *dik6*-Promotor wird die negative Regulation über ein Element zwischen den Nukleotidpositionen – 638 und – 298 vermittelt. Um negativ regulatorische Faktoren der *dik6*-Expression zu identifizieren, wurde eine UV-Mutagenese durchgeführt. Die 19 Mutanten exprimierten nicht nur *dik6* in der Abwesenheit eines aktiven bW/bE-Heterodimers, sondern mit *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1* auch weitere b-abhängig exprimierte Gene sowie die stadienspezifisch induzierten Gene *ssp1* und *mig1*. Die Mutanten konnten aufgrund ihres unterschiedlichen Expressionsmusters in sechs Gruppen eingeteilt werden, und drei UV-Mutanten konnten durch drei unterschiedliche Cosmide komplementiert werden. Dies lässt erkennen, dass verschiedene Gene ausgeschaltet wurden, und deutet einen komplexen Repressionsmechanismus an.

In *U. maydis* wurden mit Hda1 und Rum1 Repressoren isoliert, die möglicherweise Komponenten eines gemeinsamen Komplexes sind (Quadbeck-Seeger et al., 2000). Beide Proteine beeinflussen vermutlich durch Modulation der Chromatinstruktur die Expression der b-abhängig induzierten Gene *dik1*, *egl1*, *hum2* und *rep1*. Da sich die Phänotypen der in dieser Arbeit isolierten UV-Mutanten hinsichtlich der deregulierten Gene sowohl vom Phänotyp einer *hda1*- als auch *rum1*-Mutante unterscheiden und mit *hda1* keine Komplementation der Mutanten zu beobachten war, spricht dafür, dass es in *U. maydis*, ähnlich wie in anderen eukaryontischen Zellen (Struhl et al., 1998; Varga-Weisz und Becker, 1998) weitere Repressorkomplexe gibt, die durch die Mutagenese inaktiviert wurden.

## 3.2 Die Rolle von *dik6* und *dkh6* bei der Pathogenität

### 3.2.1 *dik6* kodiert für putatives Membranprotein, das ein Virulenzfaktor in *U. maydis* ist

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

*dik6* ist demnach ein Virulenzfaktor in *U. maydis*, da die Deletion des Gens keinen Einfluss auf das vegetative Wachstum von *U. maydis* Zellen hat, aber zu einer Reduktion der pathogenen Entwicklung führt.

Die Expression von *dik6* ist auf die initiale Phase der Interspezieskommunikation begrenzt, in der vermutlich spezifische Erkennungsprozesse für eine erfolgreiche Wirt-Pathogeninteraktion stattfinden. Dik6 könnte als integrales Siebentransmembranprotein ein Rezeptor für Pflanzensignale sein. Über solche Signale, die den Erkennungsprozess zwischen

Wirt und Pathogen vermitteln, ist wenig bekannt (Kolattukudy et al., 1995). Es werden sowohl physikalische als auch chemische Signalen postuliert, die Entwicklungsprozesse bei Pilzen steuern, die mit der Pathogenität einhergehen (Kolattukudy et al., 1995). Einige Pathogene, wie z. B. *Uromyces appendiculatus*, der Erreger des Rosts bei Bohnen, erkennt topologische Strukturen auf der Blattoberfläche (Hoch et al., 1987), das Reispathogen *Magnaporthe grisea* und das Avocadopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* erkennen die hydrophobe Oberfläche ihrer Wirtspflanzen (DeZwaan et al., 1999; Kim et al., 2000), wohingegen andere phytopathogene Pilze chemische Signale wahrnehmen (Flaishman und Kolattukudy, 1994). Von diesen sind langkettige Fettsäuren als Abbauprodukte der pflanzlichen Cuticula bekannt, die *C. gloeosporioides*, dem Erreger der Anthraknose bei Avocados, als Signal zur Sporenkeimung und zur Appressorienbildung dienen (Podila et al., 1993), oder phenolische Substanzen (Chapela et al., 1991), die verschiedene Vertreter der Familie der Xylariaceen (Saprophytische Pilze auf Borke oder Holz) als Signal zur Sporenkeimung nutzen, oder gasförmige Substanzen wie Ethylen, das eine zentrale Rolle bei der Reifung von Avocados und Bananen spielt und als Signal für den Beginn der pathogenen Entwicklung von *C. gloeosporioides* und *Colletotrichum musae* (Flaishman und Kolattukudy, 1994) diskutiert wird. Da Siebentransmembranrezeptoren verschiedenste Signale wie Licht, Peptidhormone, Pheromone, morphogene Substanzen oder Chemoattraktanten wahrnehmen (Brzostowski und Kimmel, 2001), kann über das Signal, das von Dik6 perzipiert wird, nur spekuliert werden. Falls Bestandteile der Cuticula als Signale dienen, wäre eine Möglichkeit z. B. fett- und wasserlösliche Komponenten von Maisblättern zu extrahieren, chromatographisch aufzutrennen und mit Hilfe der BIAcore-Plattform eine mögliche biomolekulare Interaktion mit Dik6 nachzuweisen. (Rich und Myszka, 2001). Von besonderem Interesse wäre es, herauszufinden, welche Komponenten Dik6 nachgeschaltet sind. Möglicherweise könnte ein heterotrimeres G-Protein an Dik6 assoziiert sein (siehe Abschnitt 3.2.2), das wiederum ein Signal auf ein MAP-Kinasemodul überträgt. In *U. maydis* sind bislang mehrere Komponenten von MAP-Kinasemodulen isoliert und charakterisiert worden (Banuett und Herskowitz, 1994; Brachmann, 2001; Mayorga und Gold, 1999; Müller et al., 1999; P. Müller, R. Kahmann, pers. Mitteilung). Von diesen scheint die MAP-Kinase Kpp6 ein interessanter Kandidat zu sein, da der Phänotyp von *kpp6*-Deletionsmutanten dem von *dik6*-Deletionsmutanten ähnelt und beide Gene von b reguliert werden (Brachmann, 2001) und vermutlich nur während der frühen Infektionsphase von *U. maydis* exprimiert sind (A. Brachmann, pers. Mitteilung).

Die attenuierte Virulenz von *dik6*-Mutanten wäre dann aufgrund einer fehlenden Wahrnehmung eines Pflanzensignals erklärbar. Würde *dik6* aber eine essentielle Komponente des postulierten Erkennungsprozesses sein, wäre ein kompletter Verlust der Pathogenität zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp könnte sein, dass die Funktion von Dik6 von einem alternativen Weg übernommen wird, oder dass ein Protein mit redundanter Funktion Dik6 ersetzt. Ein mögliches Protein hierfür könnte Dkh6 sein, das

aufgrund seiner 35%igen Ähnlichkeit auf Aminosäureebenen mit Hilfe eines *in silico* Ansatzes in dieser Arbeit isoliert wurde. Von Dkh6 wurde gezeigt, dass es ebenfalls ein heptahelicales Transmembranprotein ist. Jedoch können derzeit keine Aussagen über eine mögliche redundante Funktion getroffen werden, da das korrespondierende Gen *dkh6* essentiell ist.

### 3.2.2 Sind Dik6 und Dkh6 G-Protein gekoppelte Siebentransmembranproteine?

Weder für Dik6 noch für Dkh6 konnte in Datenbanken ein ähnliches Protein gefunden werden. Eine Computeranalyse ergab, dass beide Proteine 7 Membran-spannende Regionen aufweisen und der Algorithmus des PROSEARCH-Programms identifizierte Ähnlichkeiten zu mehreren G-Protein gekoppelten Siebentransmembranproteinen verschiedener Spezies. Diese Rezeptoren gehören alle zur Klasse der Rhodopsin-ähnlichen Siebentransmembranrezeptoren (Karchin R., 2001), die mit heterotrimeren G-Proteinen assoziiert sind. Nach Bindung eines stimulierenden Moleküls kommt es in dem Rezeptor zu einer Konformationsänderung, die zu einer Aktivierung des G-Proteins führt. Daraufhin dissoziiert GDP von der  $\alpha$ -Untereinheit ab und GTP wird gebunden, was zu einer Abdissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Das Signal kann von beiden Untereinheiten auf weitere Signalkaskadekomponenten übertragen werden (Oliveira et al., 1999). Bei den Vertretern der Pilze sind bei *S. cerevisiae* und *S. pombe* G-Protein gekoppelte Siebentransmembranrezeptoren bekannt, die Pheromone und Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen als Signale, perzipieren (Versele et al., 2001). Für Dik6 und Dkh6 kann eine Rolle bei der Pheromonwahrnehmung ausgeschlossen werden, da die Deletion von *dik6* zu keiner Änderung im Kreuzungsverhalten führte und *dkh6* ein essentielles Gen ist. Darüber hinaus sind die Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2 in *U. maydis* bekannt und sehr gut charakterisiert (Bölker et al., 1992). Die Deletion der Gene *GPRI* in *S. cerevisiae* und *git3* in *S. pombe* führt zu keinem auffälligen Phänotyp, so dass ausgehend von diesen Befunden nicht ausgeschlossen werden kann, dass Dik6 oder Dkh6 zu dieser Klasse von Rezeptoren gehört. Allerdings sollte in diesem Fall zu erwarten sein, dass sowohl Dik6 als auch Dkh6 Ähnlichkeiten zu den untereinander sehr ähnlichen Proteinen Gpr1p und Git3 aufweisen (Versele et al., 2001).

Dik6 kann, ähnlich wie Dkh6, keiner der bekannten Klassen G-Protein gekoppelter Rezeptoren zugeordnet werden, weist aber, im Gegensatz zu Dkh6, zwei konservierte Cystein-Reste auf, die für G-Protein gekoppelte Rezeptoren charakteristisch sind. Diese Cysteine sind zum Teil auch in anderen Siebentransmembranrezeptoren zu finden (Wendland et al., 1995) und liegen in der dritten Transmembrandomäne sowie in der zweiten extrazellulären Schlaufe und sind vermutlich für die Stabilisierung der Sekundärstruktur der Rezeptoren wichtig (Baldwin, 1994). Das Vorhandensein der Cystein-Reste kann aber nicht als sicheres Indiz dafür gewertet werden, dass ein Siebentransmembranprotein mit einem heterotrimeren G-Protein assoziiert ist. Da sowohl Dik6 als auch Dkh6 an der

zytoplasmatischen Membran lokalisiert sind, liegt die Vermutung nahe, dass beide Proteine G-Protein gekoppelte Siebentransmembranrezeptoren sein könnten. Neben einer überwiegend gleichmäßigen Verteilung des Dik6::eGFP- und des Dkh6::YGFP-Fusionsprotein über die zytoplasmatische Membran war das Dik6::eGFP-Fusionsprotein auch mit frühen Endosomen assoziiert (nicht gezeigt). Dieses Muster der Lokalisierung ist ähnlich zu dem der Pheromonrezeptoren in *S. cerevisiae* (Hicke, 1999; Hicke und Riezman, 1996; Roth und Davis, 1996). In diesem Pilz wird die Aktivität der Pheromonrezeptorproteine über die Menge, die sich an der Membran befindet, moduliert. Durch Endozytose und nachfolgende Degradation in der Vakuole kann die Menge des Rezeptors schnell reduziert werden. Möglicherweise wird auch die Aktivität des Dik6-Protein auf diese Weise reguliert. Auch bei dem Reispfadenpilz *M. grisea* ist gezeigt, dass die Aktivität des potenziellen Membranproteins Pth11p, das 9 Transmembrandomänen aufweist, für die Wahrnehmung hydrophober Oberflächen auf Reispflanzen benötigt wird. Dieses Protein wird nach der Appressorienbildung und dem Eindringen des Pilzes in die Wirtspflanze internalisiert und in Vakuolen transportiert (DeZwaan et al., 1999).

Es wird spekuliert, dass *M. grisea* die Aktivität des Membranproteins Pth11 über diesen Weg moduliert. Es wäre daher interessant das Dik6::eGFP Fusionsprotein in haploiden *U. maydis* Sporidien zu exprimieren und zu untersuchen, ob nach Infektion von Maispflanzen Unterschiede in der Lokalisation auftreten.

In *U. maydis* sind bislang vier Gene für  $\alpha$ -Untereinheiten von G-Proteinen (*gpa1* bis *gpa4*), ein Gen für die  $\beta$ -Untereinheit (*bpp1*) und ein Gen für die  $\gamma$ -Untereinheit (*gpg1*) isoliert worden (Regenfelder et al. 1997; A. Leibbrandt, P. Müller und R. Kahmann, pers. Mitteilung). Des Weiteren lieferte die Analyse des Genoms keine Anhaltspunkte für Gene, die weitere Komponenten heterotrimerer G-Proteine kodieren (J. Kämper, pers. Mitteilung). Deletionsmutanten der Gene *gpa1*, *gpa2* oder *gpa4* zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp in Bezug auf das Kreuzungsverhalten und die pathogene Entwicklung (Regenfelder et al., 1997). Die Deletion von *gpa3* führte dazu, dass Zellen konstitutiv filamentös wachsen, nicht mehr auf das Pheromon eines Kreuzungspartners reagieren und apathogen sind (Regenfelder et al., 1997). *bpp1*-Deletionsmutanten wachsen filamentös, sind aber nicht apathogen (A. Leibbrandt, P. Müller, R. Kahmann, pers. Mitteilung) und von *gpg1*-Deletionsmutanten ist bislang bekannt, dass sie ebenfalls konstitutiv filamentös wachsen (P. Müller und R. Kahmann, pers. Mitteilung).

Da die beobachteten Phänotypen der Deletionsmutanten von Komponenten heterotrimerer G-Proteine in *U. maydis* nicht den Phänotypen von *dik6*- bzw. *dkh6*-Deletionsmutanten ähneln, so dass Rückschlüsse auf eine mögliche genetische Interaktion gemacht werden können, kann derzeit die Frage, ob Dik6 bzw. Dkh6 mit einem G-Protein gekoppelt sind, nicht beantwortet werden. Jedoch fehlt in vielen anderen Organismen auch noch der Beweis, dass postulierte Siebentransmembranrezeptoren mit einem G-Protein assoziiert sind. Oftmals

wurde von dem Befund, dass ein Siebentransmembranprotein identifiziert worden war, aus einem Analogieschluss heraus postuliert, dass das entsprechende Protein mit einem G-Protein assoziiert ist. Bislang ist noch kein Siebentransmembranprotein bekannt, das nicht mit einem G-Protein gekoppelt ist (G. Vriend, pers. Mitteilung). Es sind aber mittlerweile G-Protein gekoppelte Siebentransmembranrezeptoren bekannt, die unabhängig von G-Proteinen Signale weiterleiten (sogenannte G-0-Rezeptoren) (Brzostowski und Kimmel, 2001). Dabei wird z. B. der C-Terminus von Rezeptormolekülen phosphoryliert, um über Adaptormoleküle ein MAP-Kinasemodul zu rekrutieren (Luttrell et al., 1999). Es wäre daher denkbar, dass in *U. maydis* ein ähnlicher Mechanismus existiert.

Eine Möglichkeit herauszufinden, ob Dik6 oder Dkh6 mit einem der vier G $\alpha$ -Proteine gekoppelt ist, wäre die Verwendung des "split ubiquitin"-Systems, einem modifizierten Hefe Zwei-Hybrid-System (Johnsson und Varshavsky, 1994). Im Gegensatz zum herkömmlichen Zwei-Hybrid-System können in dieses System z. B. membranlokalisierte Proteine ohne vorhergehende Modifikationen eingesetzt werden, da eine mögliche Interaktion an der zytoplasmatischen Membran und im Zytoplasma stattfindet, so dass das Köderprotein dazu nicht in den Kern transportiert werden muss. Dabei wird Dik6 bzw. Dkh6 und jeweils eines der Gpa-Proteine in Hefezellen exprimiert, wobei Gpa1, Gpa2, Gpa3 sowie Gpa4 mit der N-terminalen Hälfte eines Ubiquitinmoleküls translational fusioniert werden und Dik6p mit der C-terminalen Hälfte eines Ubiquitinmoleküls und dem Hefe Ura3p oder eGFP (Laser et al., 2000). Bindet nun eines der Gpa-Fusionsproteine an das Köderprotein Dik6, rekonstituieren die beiden Hälften des Ubiquitinmoleküls ein sogenanntes Ubiquitin-ähnliches Molekül, das von Ubiquitin-spezifischen Proteasen erkannt und über den sogenannten "N-end rule"-Weg abgebaut wird (Varshavsky et al., 2000). Im Fall einer Protein-Protein Interaktion sind Hefezellen somit in der Lage auf 5-FOA-haltigem Medium zu wachsen bzw. verlieren ihre grüne Fluoreszenz. Für den Fall, dass Dik6 bzw. Dkh6 G-0-Rezeptoren sind, könnten dieses System auch für die Suche nach Komponenten, die, außer einem G-Protein, an die Rezeptoren binden, eingesetzt werden.

Eine interessante Alternative zu dem Hefesystem wäre, dieses System analog in *U. maydis* zu etablieren. Aufgrund seiner großen Ähnlichkeit zum Hefe-Ubiquitin (T. Martin, J. Kämper, pers. Mitteilung) kann das *U. maydis* Ubiquitin analog eingesetzt werden. Zudem ist mit dem *U. maydis* *pyr6*-Gen das homologe Gen zu *URA3* bekannt und wurde in dieser Arbeit als gegenselektionierbarer Marker etabliert. Die Etablierung des Systems in *U. maydis* hat den Vorteil, dass endogene Komponenten, die möglicherweise für eine erfolgreiche Interaktion benötigt werden, in den Zellen vorhanden sind.

### 3.2.3 Kann Dik6 die Funktion von Dkh6 übernehmen?

Der Phänotyp von *dik6*-Deletionsmutanten legte zum einen die Vermutung nahe, dass ein alternativer Signaltransduktionsweg das von Dik6 wahrgenommene Signal überträgt, oder, dass ein Gen in *U. maydis* existiert, dessen Genprodukt die Funktion des Dik6 Proteins übernehmen könnte. Durch das Vorliegen der Sequenzdaten des zu 90% entschlüsselten Genoms von *U. maydis* konnte aufgrund seiner 35%igen Ähnlichkeit zu Dik6 das Dkh6 Protein gefunden und das korrespondierende Gen *dkh6* isoliert werden.

Der Befund, dass *dkh6* ein essentielles Gen ist, wurde von den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, *dkh6*-Deletionsmutanten zu erzeugen, abgeleitet. In allen untersuchten Fällen wiesen Transformanten eine deletierte und eine intakte Kopie von *dkh6* auf. Dieses Phänomen war früher schon bei den essentiellen *U. maydis* Genen *hsp70*, *dyn1*, *srp1* und *uku70* in beobachtet worden (Holden et al., 1989; W. Enard, A. Jamnischek, pers. Mitteilung). Welche Mechanismen dies ermöglichen ist allerdings völlig unbekannt. Ebenso war der Versuch, ein entsprechendes Nullallel durch Segregation eines diploiden Stammes in die resultierenden Meioseprodukte einzuführen, erfolglos. Die analysierten Sporidien sind vermutlich aneuploid, da sie kein filamentöses Wachstum zeigen, aber sowohl die natürliche als auch die deletierte Kopie des *dkh6*-Gens aufweisen. Um einen Hinweis auf die mögliche Funktion von *dkh6* zu erhalten, wurde eine *dkh6*-Deletionsmutante erzeugt, in der das *dkh6*-Gen unter der Kontrolle des *nar1*-Promotors reguliert exprimiert werden kann. Jedoch schien die Restaktivität des *nar1*-Promotors unter reprimierenden Bedingungen auszureichen, um die Letalität zu kompensieren.

Um die Frage zu klären, ob die Überexpression von *dik6* den Verlust von *dkh6* funktionell komplementieren könnte, wurde versucht *dkh6* in Zellen zu deletieren, die *dik6* unter der Kontrolle des starken, konstitutiven *o2tef*-Promotors (Spellig et al., 1996) exprimieren. Alle daraus resultierenden Transformanten wiesen wiederum sowohl die natürliche als auch die deletierte Kopie des *dkh6*-Gens auf. Möglicherweise hat die Expressionsstärke von *dik6* nicht ausgereicht, um den Verlust von *dkh6* zu komplementieren. Eine Möglichkeit zu zeigen, dass die beiden Genprodukte eine redundante Funktion haben, wäre zu versuchen, durch die Überexpression von *dkh6* den Pathogenitätsdefekt von *dik6*-Deletionsstämmen zu restaurieren.

Da gezeigt wurde, dass Dkh6 an der zytoplasmatischen Membran lokalisiert ist, aber weder Aussagen über eine mögliche Kopplung des Siebentransmembranproteins an heterotrimere G-Proteine getroffen noch Deletionsmutanten erzeugt werden konnten, wird Dkh6 als heptahelicales Transmembranprotein klassifiziert, dessen Funktion in Sporidien und im Hinblick auf die Pathogenität aufgrund der rezessiven Letalität von noch nicht geklärt werden konnte.

Eine interessante Spekulation ist, dass Dkh6 an der Wahrnehmung von Nährstoffen beteiligt ist. Diese Hypothese wird von dem Befund unterstützt, dass, zusätzlich zu einer b-abhängigen

Regulation, die Expression von *dkh6* nur auf bestimmten Festmedien nachgewiesen werden kann (nicht gezeigt). Ein Verlust von *dkh6* würde zu einer Unterbrechung der Signalweiterleitung führen, was z. B. die Arretierung des Zellzyklus und das Absterben der Zellen zur Folge hätte.

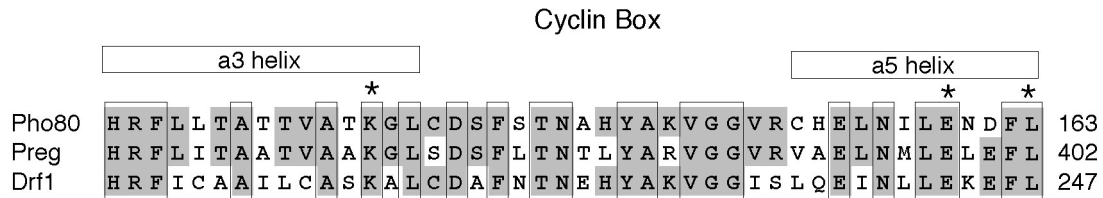
### 3.3 Drf1 beeinflusst die Expression von Genen der b-vermittelten Regulationskaskade

#### 3.3.1 Drf1 wirkt indirekt auf die Expression b-abhängig regulierter Gene

Durch das Einbringen einer cDNA-Expressionsbank in einen dreifach-Reporterstamm wurde in dieser Arbeit nach Transkriptionsaktivatoren gesucht, die unabhängig von einem aktiven b-Komplex die Expression von *dik6* beeinflussen. Mit *drf1* wurde dabei ein Gen isoliert, das in Sporidien schwach exprimiert ist und in einer Kreuzung haploider Sporidien etwa 20fach induziert ist. Bei der Expressionsanalyse zeigte sich auch, dass *drf1* a-abhängig exprimiert ist. Von der isolierten cDNA wurde ein putatives Protein abgeleitet, das ein Leucin-Zipper Motiv besitzt, welches in vielen regulatorischen Proteinen vorkommt und deren Dimerisierung vermittelt (Busch und Sassone-Corsi, 1990). Drf1 weist zwischen den Aminosäurepositionen 150 und 250 eine etwa 100 Aminosäuren große Cyclindomäne auf (Gibson et al., 1994), die auch in Proteinen wie z. B. Pho80p aus *S. cerevisiae* (Toh-e und Shimauchi, 1986) oder Preg aus *N. crassa* (Kang und Metzenberg, 1993) vorkommt (Abbildung 35). Proteine mit einer Cyclindomäne können zusammen mit einer Cyclin-abhängigen Kinase an der Regulation des Zellzyklus, aber auch an genregulatorischen Prozessen beteiligt sein (Hicks und Raikhel, 1995; Poon und Hunter, 1995; Tanaka und Okayama, 2000). Von Pho80p aus *S. cerevisiae* ist gezeigt, dass es zusammen mit der Cyclin-abhängigen Kinase Pho85p einen Komplex bildet, der den Transkriptionsfaktor Pho4p phosphoryliert und ihn dadurch inaktiviert (Uesono et al., 1992). Preg aus *N. crassa* wirkt zusammen mit Pgov negativ regulatorisch auf den Transkriptionsfaktor Nuc-1 (Kang, 1993). Sowohl Pho4p als auch Nuc-1 regulieren Gene, die Komponenten für die Phosphataufnahme in *S. cerevisiae* bzw. *N. crassa* kodieren (Kang und Metzenberg, 1990; O'Neill et al., 1996).

Eine Rolle für Drf1 als Komponente eines Komplexes mit einer Cyclin-abhängigen Kinase, der wiederum einen Transkriptionsfaktor aktiviert oder inaktiviert, könnte daher wahrscheinlich sein. Ob dieser postulierte Drf1/Cdk-Komplex an der Regulation von Komponenten eines Phosphataufnahmesystems beteiligt ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Jedoch scheint es eher unwahrscheinlich, da Drf1 als positiver Aktivator der *dik6*-Expression gefunden wurde und sich im Verlauf der weiteren Analyse von Transformanten, die *drf1* stark überexprimieren, herausstellte, dass Drf1 nicht nur die Expression von *dik6* beeinflusst, sondern auch die Expression der cAMP-induzierten und b-reprimierten *cab*-

Locusgene *orf1*, *frb136*, *orf2*, *orf3*, *frb34* und *orf4* und die Expression von *frb124*. Weder *dik6* noch die sechs *cab*-Locusgene oder *frb124* kodieren für Proteine, die Ähnlichkeit zu bekannten Komponenten haben, die an der Aufnahme und dem Metabolismus von Phosphat beteiligt sind (Brachmann, 2001).



**Abbildung 35: Vergleich der Proteinsequenz der konservierten Cyclin-Box von Pho80p, Preg und Drf1.** Identische Aminosäuren zwischen zwei Proteinen sind durch grauen Kästen hinterlegt, identische Aminosäuren zwischen drei Proteinen sind mit einem Kasten versehen. Mit einem Stern wurden Aminosäuren versehen, die, in Analogie zur Co-Kristallstruktur von CyclinA-Cdk2 (Jeffrey et al., 1995), mit einer Cyclin-abhängigen Kinase interagieren würden. Oberhalb des Proteinvergleichs sind die Positionen der potentiellen a3 und a5 alpha-Helices, die in der CyclinA-Kristallstruktur vorhanden sind, eingezeichnet. Zahlen geben die Aminosäureposition, bezogen auf den Translations-Startpunkt des entsprechenden Proteins, an.

Es wurde gezeigt, dass Drf1, ähnlich wie das bW/bE-Heterodimer positiv auf die Expression von *dik6* wirkt und die Transkription der Gene *orf1*, *frb136*, *orf2*, *orf3*, *frb34*, *orf4* und *frb124* aktiviert, die vom bW/bE-Heterodimer wiederum reprimiert werden. Um Hinweise auf den Mechanismus der Genregulation durch Drf1 zu erhalten, wurde Drf1 zum einen überexprimiert und zum anderen mittels einer Promotordeletionsanalyse der Bereich auf dem *dik6*-Promotor eingegrenzt, der für eine Drf1-abhängige Regulation notwendig ist. Im Gegensatz zum bW/bE-Heterodimer konnte für Drf1 keine Bindung an den *dik6*-Promotor beobachtet werden (nicht gezeigt). Dieser Befund und die Ähnlichkeit von Drf1 zu Proteinen mit Cyclinboxen lässt vermuten, dass Drf1 Gene nicht direkt reguliert, sondern indirekt auf die Genexpression von *dik6* und vermutlich auch indirekt auf die Expression von *orf1*, *frb136*, *orf2*, *orf3*, *frb34*, *orf4* und *frb124* wirkt. Für eine solche Regulation ist es vorstellbar, dass Drf1 über seine Cyclin-Domäne mit einer Cyclin-abhängigen Kinase interagiert und in einem Komplex Zielproteine, wie z. B. einen Transkriptionsfaktor, aktiviert. Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert dann die Expression von *dik6*, von *frb124* und die Expression der *cab*-Locusgene. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass die Überexpression von *drf1* zu einer 57%igen Reduktion der Pathogenität führt. Dieser Phänotyp könnte darauf zurückzuführen sein, dass Drf1 zusammen mit einer Cyclin-abhängigen Kinase als genereller Faktor der Transkriptionskontrolle wirkt. Zudem wurde gezeigt, dass Cyclin/Cdk-Komplexe sowohl die basale Transkriptionsmaschinerie als auch spezielle genregulatorische Prozesse beeinflussen können (Hengartner et al., 1998; Tanaka und Okayama, 2000). Im Fall der Überexpression würde somit eine abundante Aktivität eines Drf1/Cdk-Komplexes zu einer Deregulation von Genen führen, die zu bestimmten

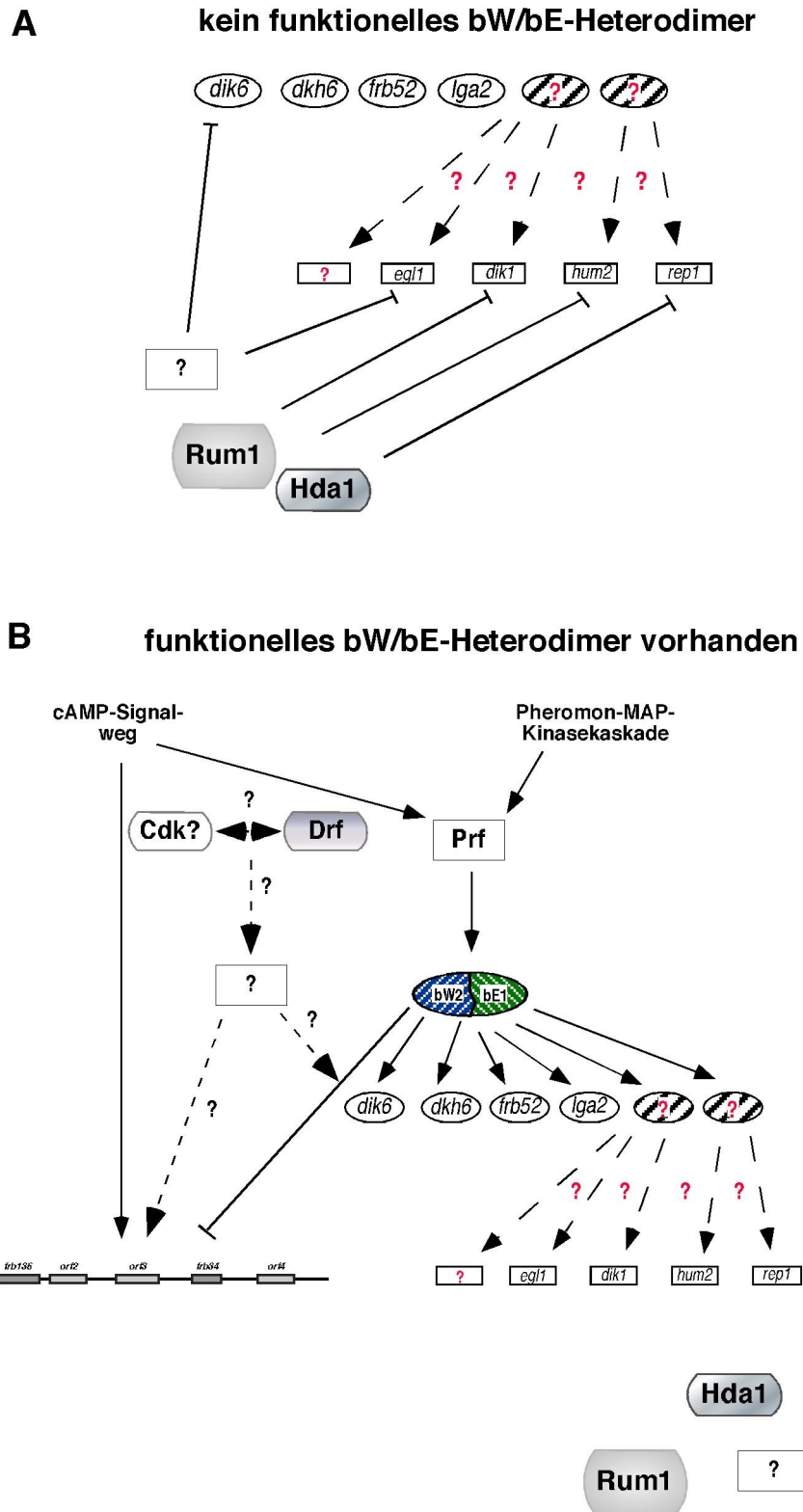


Zeitpunkten des Pathogenitätsprogramms nicht exprimiert werden sollten, wodurch die pathogene Entwicklung gestört wird.

Interessanterweise zeigte die Promotordeletionsanalyse auch, dass der Bereich zwischen den Nukleotidpositionen – 1089 und – 302, der die *cis*-regulatorischen Elemente für eine Drf1-abhängige Regulation enthält, mit dem Bereich, der für eine b-abhängige Regulation benötigt wird (– 816 bis – 638) überlappt. Dieses Ergebnis kann erklärt werden, wenn man annimmt, dass ein postulierter Transkriptionsfaktor, der von einem Drf1/Cdk-Komplex aktiviert wird, unabhängig vom bW/bE-Heterodimer oder als Koaktivator des bW/bE-Heterodimers wirkt und an dieselben oder benachbarte Bindestellen im *dik6*-Promotor bindet. So ist z. B. in *D. melanogaster* gezeigt, dass das Homeodomänen-Protein Ftz sowohl alleine als Transkriptionsregulator von z. B. Segmentpolaritätsgenen wirkt als auch zusammen mit dem Protein Ftz-F1 interagiert, das seinerseits auch alleine als Transkriptionsfaktor wirken kann (Ohno et al., 1994; Yussa et al., 2001). Es wird spekuliert, dass durch die Interaktion der beiden Proteine das Homeodomänen-Protein Ftz spezifische Zielgene unter einer theoretisch großen Anzahl regulieren kann. Die große Anzahl von Zielgenen ergibt sich aus der Tatsache, dass die Sequenz, die von Homeodomänen-Proteinen auf der DNA von Zielgenen gebunden wird, oft nur wenige Nukleotide umfasst und sehr flexibel ist (Yussa et al., 2001). Ein weiteres Beispiel für eine Interaktion von Homeodomänenproteinen mit Kofaktoren ist die Interaktion von Mox1 und Mox2 mit Pax1 und Pax2 in der Maus, die auf diese Weise ein spezifisches Set von Genen aktivieren (Stamatakis et al., 2001). Jedes der vier Proteine ist aber auch in der Lage, alleine Genexpression zu bewirken. Um das Modell zu beweisen, wäre es interessant, mögliche Interaktionspartner von Drf1 zu suchen. Dazu kann ein Hefe Zwei-Hybrid Ansatz oder eine biochemische Vorgehensweise gewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits mit mehreren Epitopen versehene *drf1*-Konstrukte hergestellt (nicht gezeigt), mit deren Hilfe Komplexe biochemisch aufgereinigt werden könnten.

### 3.3.2 Modell zur Vorstellung der b-vermittelten Regulationskaskade in *U. maydis*

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Vorstellung der b-vermittelten Regulationskaskade in *U. maydis* muss das in Abbildung 4 dargestellte Modell erweitert werden, da es zusätzliche regulatorisch wirkende Komponenten außer acht lässt. In Abbildung 36 ist daher ein Modell für die Vorstellung der Wirkungsweise der b-vermittelten Regulationskaskade in *U. maydis* gezeigt. Die Expression der *b*-Gene wird im Dikaryon nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors Prf1 induziert. Prf1 wird durch eine aktive Pheromon-MAP-Kinasekaskade und den cAMP-Signalweg aktiviert. Das bW/bE-Heterodimer ist der zentrale Regulator des filamentösen Wachstums und der Pathogenität in *U. maydis*. Es reguliert eine große Anzahl von Genen direkt oder über eine b-vermittelte Regulationskaskade indirekt (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Modell zur Vorstellung einer b-vermittelten Regulationskaskade in *U. maydis*.** Es sind jeweils nur die wichtigsten an den jeweiligen Prozessen beteiligten Regulatoren angegeben. Angenommene Effekte, für die bislang keine experimentelle Bestätigung vorliegt, sind durch gestrichelte Pfeile mit Fragezeichen dargestellt. Bislang unbekannte Komponenten sind durch Rechtecke mit Fragezeichen dargestellt.

Dabei kann der aktive b-Komplex die Expression von Genen entweder induzieren oder reprimieren. Mit Hilfe von *U. maydis*-Stämmen, in denen eine regulierte Expression von bW und bE verschiedener Allele möglich ist, wurde gezeigt, dass die bekannten b-regulierten Gene in einer zeitlichen Reihenfolge induziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit und der Arbeit von A. Brachmann (2001) konnte eine Korrelation zwischen dem Expressionszeitpunkt eines Gens nach Induktion durch das bW/bE-Heterodimer und der Art der Regulation durch das bW/bE-Heterodimer hergestellt werden. Für die früh induzierten Gene *lga2*, *frb52*, *dik6*, die ein bis zwei Stunden nach der b-Geninduktion exprimiert werden, wurde eine direkte Regulation durch den aktiven b-Komplex gezeigt. Daraus wurde geschlossen, dass die spät b-induzierten Gene *egl1*, *rep1*, *hum2* und *dik1*, die etwa drei bis sechs Stunden nach der b-Genexpression induziert werden, indirekt durch den b-Komplex reguliert sind. Interessanterweise unterliegen die indirekt b-regulierten Gene *egl1*, *rep1*, *hum2* und *dik1* in haploiden Sporidien der Repression durch Hda1 und Rum1, die aber nach der Bildung eines aktiven b-Komplexes im Dikaryon aufgehoben wird (Abbildung 36). In dieser Arbeit wurden mehrere Mutanten isoliert, in denen Genprodukte inaktiviert wurden, die ebenfalls negativ regulatorisch auf die Expression der Gene *egl1*, *rep1*, *hum2* und *dik1*, aber auch auf die Expression von *dik6* in Sporidien wirken. Mit *drf1* wurde ein Gen isoliert, dessen Genprodukt vermutlich indirekt als Aktivator der Transkription von *dik6*, der sechs *cab*-Locusgene *orf1*, *frb136*, *orf2*, *orf3*, *frb34* und *orf4* sowie von *frb124* wirkt (Abbildung 36). Drf1 vermittelt seine regulatorische Wirkung über einen postulierten Transkriptionsfaktor, der unabhängig oder möglicherweise als Kofaktor des bW/bE-Heterodimers agieren kann. Mit Ausnahme von *dik6* wird die Transkription der genannten Gene von einer aktivierten cAMP-Signalkaskade aktiviert und vom funktionellen b-Komplex reprimiert (Abbildung 36).

Die Rolle der Drf1-vermittelten Genregulation könnte sein, dass im Zusammenspiel mit der aktiven cAMP-Signalkaskade die Expression der sechs Gene des *cab*-Locus und von *frb124*, von deren putativen Genprodukten angenommen wird, dass sie alle an der Synthese und Modifikation von Oligosacchariden beteiligt sind, nach der Zellfusion effizient induziert werden. Das bW/bE-Heterodimer und die aktive MAP-Kinasekaskade reprimieren wiederum die Expression dieser Gene, da sie vermutlich für weitere Schritte der Infektionsphase nicht benötigt werden.

Des Weiteren aktiviert der Drf1-vermittelte Regulationsmechanismus zusammen oder unabhängig vom b-Komplex die Expression von *dik6*, um eine effektive Transkription sicherzustellen. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zeigen, dass die b-vermittelte Regulationskaskade ein komplexes regulatorisches Netzwerk darstellt. Mit putativen, negativ regulatorisch wirkenden Genprodukten und *drf1* wurde sie um zwei Komponenten erweitert (Abbildung 36). Von besonderem zukünftigen Interesse wird es sein, ob die Gene, die in den erzeugten UV-Mutanten inaktiviert sind, für Komponenten des postulierten Hda1/Rum1-Repressorkomplexes kodieren oder zu einem bislang unbekanntem Komplex gehören. Die Rolle der Drf1-vermittelten Expression der *cab*-Locusgene ist im Hinblick auf die

antagonistische Regulation dieser Gene durch den cAMP-Signalweg und die MAP-Kinasekaskade sehr interessant. Die Identifizierung des postulierten Transkriptionsfaktors könnte helfen, Einblicke in die differentielle Regulation zu erhalten.

# 4. Material und Methoden

## 4.1 Material und Bezugsquellen

### 4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

#### Chemikalien

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

#### Puffer und Lösungen

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

#### Medien

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

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

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

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

PD-Medium:

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

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

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

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974):

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

AM Ammonium-Minimalmedium (Holliday, 1974):

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

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

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

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

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

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

100 mg Thiamin  
50 mg Riboflavin  
50 mg Pyridoxin  
200 mg Kalziumpantothenat  
500 mg p-Aminobenzoensäure  
200 mg Nikotinsäure  
200 mg Cholinchlorid  
1000 mg myo-Inositol  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Regenerationsagar (Schulz et al., 1990):

- a) Top-Agar:  
1,5% (w/v) Bacto-Agar  
1 M Sorbitol  
in YEPS<sub>L</sub>-Medium
- b) Bottom-Agar:  
wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum,  
5-FOA in einer Konzentration von (500 µg/ml).

CM-CC aktivkohlehaltiges Vollmedium

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

6 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
10 g Casamino Acids  
1 g DNA  
2 g Yeast Extract  
20 ml Vitamin-Lösung  
250 ml Salz-Lösung  
10 g Aktivkohle  
20 g Bacto-Agar  
mit H<sub>2</sub>O auf 960 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
40 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 2%)

PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium:

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

CMC-Medium:

5 g Yeast Extract  
4 g Pepton  
4 g Saccharose  
2% Carboxymethylcellulose  
1,5 % BiTec-Agar  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Carboxymethylcellulose-Lösung:

40 g Carboxymethylcellulose  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und bei 4°C lagern

Für Medien mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle (CM-Ara, NM-Ara und NM-Ara) wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml), ClonNAT (150 µg/ml), Phleomycin (40 µg/ml), Cytidin (100 µg/m) und 5-FOA (750 µg/m). (Im Fall der Selektion mit Phleomycin und 5FOA auf Festmedien muss zusätzlich Tris-Cl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt werden, da ansonsten das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird bzw. der Agar aufgrund der Ansäuerung durch 5-FOA nicht mehr fest wird.)

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden folgende Medien verwendet:

Drop-out Mix:

2 g Alanin  
2 g Arginin  
2 g Asparagin  
2 g Cystein  
2 g Glutamin  
2 g Glutaminsäure  
2 g Glycin  
2 g Inositol  
2 g Isoleucin  
2 g Lysin  
2 g Methionin  
0,2 g p-Aminobenzoensäure  
2 g Phenylalanin  
2 g Prolin  
2 g Serin  
2 g Tyrosin  
2 g Valin

Glucose-Minimalmedium (Kaiser et al., 1994):

1,55 g Drop-out Mix  
5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20 g Glucose  
1,7 g Yeast Nitrogen Base  
mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt und sterilfiltrieren

Raffinose-Minimalmedium (Kaiser et al., 1994):

1,55 g Drop-out Mix  
5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20 g Galaktose  
10 g Raffinose  
1,7 g Yeast Nitrogen Base  
Mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt und sterilfiltrieren

YEPD-Medium (Kaiser et al., 1994):

10 g Yeast Extract  
20 g Pepton  
mit H<sub>2</sub>O auf 960 ml aufgefüllt  
nach dem Autoklavieren:  
40 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 2%)  
Mit 800 ml 1,4 % BiTec-Agar auf 1000 ml aufgefüllt

Die Hefe-Minimalmedien enthalten kein Adenin (200 mg/l), Aspartat (100 mg/l), Histidin (20 mg/l), Leucin (100 mg/l), Threonin (200 mg/l), Tryptophan (20 mg/l) und Uracil (20 mg/l). Diese Aminosäuren wurden je nach Bedarf vor dem Sterilfiltrieren in der in Klammern stehenden Menge eingewogen. Für Glucose- und Raffinoseminimal-Festmedium wurden 800 ml BiTec-Agar in einer Endkonzentration von 1,4% zu 200 ml Glucose- bzw. Raffinoseminimalmedium zugegeben. Für YEPD-Festmedium wurde BiTec-Agar in einer Endkonzentration von 1,4% zugegeben.

## Enzyme

Restriktionsenzyme und T4-RNA Ligase wurden von NEB Biolabs bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen Superscript Reverse Transkriptase (Gibco), *Taq* DNA-Polymerase (Laborpräparation) und *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene).

## Verwendete Kits und sonstiges Material

Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen) zur Anreicherung von polyA<sup>+</sup> RNA, Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) für die Synthese des cDNA-Zweitstrangs, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETsorb Kit zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, Large-Construct Kit (Qiagen) zur Präparation von Plasmid-DNA, die frei von verunreinigender, genomischer DNA ist, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, Gigapack® III Gold Packaging Kit (Stratagene) zur Verpackung von Cosmid-DNA in λ-Phagen, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (NEB Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden und Microspin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

## 4.1.2 Oligonukleotide

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

### REV24

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC

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

### UNI24

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG

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

### T7-24

GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG

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

### SP6-24

CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG

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

### OGW2

GAT CCA AGC TTC CCA TGG CGC CAT GTC ATG AGT

GGC TGC A

Liegt am 5'-Ende der *mfa2*-Terminatorregion, führt eine *NsiI*-Schnittstelle ein.

### OGW3

ACG CGT CGA CAT GGA TAA GGA GAA TAT CAG G

Liegt am 3'-Ende der *mfa2*-Terminatorregion, führt eine *SalI*-Schnittstelle ein.

### OGW4

AAA AGG CCT TTA ATT AAG GCG CGC CGT CAT TCG TGA TTC TAG

Liegt am 5'-Ende der UARS, führt eine *StuI*-, *AscI*- und *PacI*-Schnittstelle ein.

### OGW5

AAA AGG CCT TTA ATT AAG GCC GGA TAC GGC CTA CCG ATC CTC GAT CAA AC

Liegt am 3'-Ende der UARS, führt eine *StuI*- und *PacI*-Schnittstelle ein.

### OGW6

CCC CAG CTG CCC GGT CGG CAT CTA CTC

Verwendet zur Erzeugung einer *PvuII*-Schnittstelle am 5'-Ende des *sc*-Promotors in pSMUT.

### OGW8

CCC CAG CTG CCC GGT CGG CAT CTA CTC

Verwendet zur Erzeugung einer *PvuII*-Schnittstelle am 3'-Ende des *hph*-ORFs in pSMUT.

### OGW13

GGA ATT CAT ATG TCA TTG CCC CCC AC

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*- und *EcoRI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *sc*-Promotors in pSMUT.

### OGW14

CAG CGG CCG CCC ACT TCG ACT ACT CC

Verwendet zur Erzeugung einer *NotI*-Schnittstelle am 5'-Ende des *sc*-Promotors in pSMUT.

### OGW17

GAC ATT GGG GAG TTC AGC GAG AGC

Liegt im *hph*-ORF und führt eine Punktmutation ein, so dass ein *EcoRI*-Schnittstelle verloren geht.

### OGW23

GTC TCG TTC AAG TCA TCC

Liegt im ORF von *dik1*.

### OGW24

CTA GTC TGG GTG TTG ATG

Liegt im ORF von *dik1*.

### OGW26

GAG GAT CCC GCC CGG GAG AGA G

Verwendet für das LA-5'-RACE Experiment, wurde an sscDNA-Moleküle ligiert.

### OGW27

TCC CGG GCG GGA TCC TC

Verwendet zur cDNA-Zweitstrangsynthese für das LA-5'-RACE Experiment, ist komplementär zu OGW26.

### OGW29

TCT CGT TGT TCG GCT CAC

Liegt im *dik1*-Locus.

### OGW30

TGT CAC GAA CCG CGA ACG

Liegt im *dik6*-Locus.

### OGW31

CGG CCC ATT CAC GAT TCG

Liegt im *dik6*-Locus.

### OGW32

CGA ATC GTG AAT GGG CCG

Liegt im *dik6*-Locus.



**OGW33**

CTG GTG ACA TTG GGC TGG  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OGW34**

AGC AGC TCC TCA CAG ACG  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OGW35**

TGC TTG GCA GCC CTT CAC  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OGW36**

TTG GGC GAG CAA GAA GGC  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OGW38**

TCC TCA CAG ACG CCT TGC  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OGW40**

AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT  
Wurde zur cDNA-Zweitstrangsynthese eingesetzt, ist komplementär zu OGW44

**OGW42**

CCG GAA TTC GGC CAT TAA GGC CCA ATT TAT CAG  
ACA ATC TG  
Wurde verwendet, um am 5'-Ende des bakteriellen *gfp*-Gens eine *EcoRI*- und *SfiI*-Schnittstelle zu erzeugen.

**OGW43**

ACG CGT CGA CGG CCG AGG CGG CCT TAA AGC TCA  
TCA TGT TTG  
Wurde verwendet, um am 3'-Ende des bakteriellen *gfp*-Gens eine *SalI*- und *SfiI*-Schnittstelle zu erzeugen.

**OGW44**

AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT AAG  
GCC GGG  
Wurde verwendet, um als Adaptor-Oligonukleotid der Reversen Transkriptase während der cDNA-Erststrangsynthese den Wechsel der Matrize zu ermöglichen, führt eine *SfiI*-Schnittstelle ein.

**OGW45**

ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG TTT TTT  
TTT TTT TTT TGA CGA TC  
Wurde für die cDNA-Erststrangsynthese verwendet, führt eine *SfiI*-Schnittstelle ein.

**OGW46**

GAT GCA GTC CTT GAC AAC  
Liegt im *dik1*-Locus.

**OGW47**

GTA CCG GTC TGT GCA CAC  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW48**

TCT GAC CCT TCC GTT GCC  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW49**

CGA TCA TCG CTA TCG GCC  
Liegt im *pyr6*-Locus.

**OGW50**

TCC CAG CCA TAT GGC AGC AG  
Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startkodon von *dik6*.

**OGW51**

GTA GAG GGA TGA CGC ACC  
Liegt im ORF von *dik6*.

**OGW52**

GCT GCG TCG ATC ATC ACG  
Liegt im ORF von *dik6*.

**OGW53**

GCG GCC GCT TCA AGG CCT TGG TGC  
Verwendet zur Erzeugung einer *NotI*-Schnittstelle am Translations-Stopkodon von *dik6*.

**OGW54**

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

**OGW55**

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

**OGW56**

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

**OGW57**

TCT GAC CCT TCC GTT GCC  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank, verwendet als inneres Oligonukleotid zur Amplifikation von 3'-Enden.

**OGW58**

GAT CCT GTC GAT TCG TGA TTC ACG ATT GTC GTC  
ACG GAG GCG  
Enthält eine 26 bp große Sequenz aus dem *dik6*-Promotor, die die *bbs* trägt. Ist komplementär zu OGW59.

**OGW59**

AAT TCG CCT CCG TGA CGA CAA TCG TGA ATC ACG  
AAT CGA CAG  
Enthält eine 26 bp große Sequenz aus dem *dik6*-Promotor, die die *bbs* trägt. Ist komplementär zu OGW58.

**OGW60**

GAT CCT GTC GAT TCG TGA TTT ATG ATT GTC GTT  
ACG GAG GCG

Enthält eine 26 bp große Sequenz aus dem *dik6*-Promotor, die die *bbs* trägt, wobei drei Punktmutationen eingefügt wurden. Ist komplementär zu OGW61.

**OGW61**

AAT TCG CCT CCG TAA CGA CAA TCA TAA ATC ACG  
AAT CGA CAG

Enthält eine 26 bp große Sequenz aus dem *dik6*-Promotor, die die *bbs* trägt, wobei drei Punktmutationen eingefügt wurden. Ist komplementär zu OGW60.

**OGW62**

TGC CGA GTC CAA GGA TGC

Liegt im *dik6*-Promotor.

**OGW64**

TGA AGG GCT GCC AAG CAC

Liegt im *dik6*-Promotor.

**OGW65**

TGG TGT GGG GTC AAA GCG

Liegt im *dik6*-Promotor.

**OGW66**

GAT GAT AAG CGG TCA AAC ATG

Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden Cosmid-Bank, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW67**

CCT TTC GTC TTC AAG AAT TCG

Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden Cosmid-Bank, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW70**

ACA TCT CGC TCT CGG CCT ATC

Liegt im ORF von *drf1*, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW71**

CTG CGA TGT CAT CCA AGG GTT C

Liegt im ORF von *drf1*, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW72**

TTC TAC TTG CCG GTA GCC

Liegt im ORF von *dkh6*, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW73**

TTC TAG TCC GCG ATC TCC

Liegt im ORF von *dkh6*, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW74**

ACA GGC GCA AGA ACG AGG

Liegt im ORF von *dkh6*, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW75**

TGA GGC CAG ATG CTT GGC

Liegt im ORF von *dkh6*, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW76**

AGG CGC GCC CGG TGT ACT TGA GGT CCG

Liegt im *dkh6*-Locus, verwendet zur Erzeugung einer *AscI*-Schnittstelle.

**OGW77**

AGC GGC CGC GTT TTC GTG CTG TTT CGC CTG

Verwendet zur Erzeugung einer *NotI*-Schnittstelle am 5'-Ende des *dkh6*-ORFs.

**OGW78**

AGC GGC CGC CTT GGG CTT TCC AAT CAT CCA TC

Verwendet zur Erzeugung einer *NotI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *dkh6*-ORFs.

**OGW79**

GTT AAT TAA TTG CGA CTT CCG CAT CTG

Liegt im *dkh6*-Locus, verwendet zur Erzeugung einer *PacI*-Schnittstelle.

**OGW80**

CAT ATG GGA GAC ATG GAC GTA CC

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startkodon von *dkh6*.

**OGW81**

AGC GGC CGC TCA ATG CAT GTT TTT GAG TTG GTG

Verwendet zur Erzeugung einer *NotI*-Schnittstelle am Translations-Stopkodon von *dkh6*.

**OGW82**

CAT ATG GTT TTC GTG CTG TTT CGC CTG

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *dkh6*-Promotors.

**OGW83**

TGC GTC GCT GCG TCA AGC

Liegt im *drf1*-Locus.

**OGW84**

CAC GGC CTG AGT GGC CTT CAG ACA ACA GCG ACA  
ACC C

Verwendet zur Erzeugung einer *SfiI*-Schnittstelle am 5'-Ende des *dkh6*-ORFs.

**OGW85**

TGC TTT GGG CGT TGC GAG

Liegt im *drf1*-Locus.

**OGW86**

GTG GGC CAT CTA GGC CGC TTG CAT GCT CCT CGC C

Verwendet zur Erzeugung einer *SfiI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *dkh6*-ORFs.

**OGW87**

TCG CTG TTG TCT CAT ATG ATG GAA TCC GTC

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startkodon von *drf1*.

**OGW88**

AAT GCA TCG CAC AGC GCC  
Liegt im ORF von *drf1*.

**OGW89**

CAC CGT CAA CAA CGT CGG  
Liegt im ORF von *drf1*.

**OGW90**

CCG ACT TTG GCG TAG TGC  
Liegt im ORF von *drf1*.

**OGW91**

AAG CGG CCG CTT TAC TTG AC  
Liegt im *nos*-Terminator.

**OGW92**

ATT CAT ATG GTG AGC AAG GGC GAG  
Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startkodon von *sgfp*, *egfp*, *cgfp*, *ygfp*.

**OGW93**

ACG CTG AAC TTG TGG CCG  
Liegt im ORF von *sgfp*, *egfp*, *cgfp*, *ygfp*, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW94**

ATA GTT TAA ACG CGG CCG CGT GCT CGA CAC ACA GCA G  
Liegt im *dkh6*-Promotor, verwendet zur Erzeugung einer *NotI*-Schnittstelle

**OGW95**

ATG GTC AGG GTG GGA TGC  
Liegt im *dkh6*-Locus.

**OGW96**

TCG CAA GAC CGG CAA CAG  
Liegt im *nos*-Terminator, wurde zur Sequenzierung verwendet.

**OGW97**

AGA CAA CAT CAT CCA CGG G  
Liegt im *o2tef*-promotor, verwendet zur Sequenzierung.

**OGW98**

AAC GGT GGA TCC AGC GTC  
Liegt im *drf1*-Locus.

**OGW99**

AGG AGC ATG CAC TCG AGT TGG CGA GGA GG  
Verwendet zur Erzeugung einer *XhoI*-Schnittstelle am Translations-Stopkodon von *drf1*, wodurch dieses zerstört wird.

**OGW100**

GAA TTC AAG CTT CAT ATG ATG GAA TCC GTC TCA TCC  
Verwendet zur Erzeugung einer *EcoRI*-, *HindIII*- und *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startkodon von *drf1*.

**OGW101**

TGC TCT AGA TGC GTT GCG TTT CGC TGC  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW102**

TGC TCT AGA GAA GCA CCA CTC AAC GGC  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW103**

TGC TCT AGA GAG TGC CGA ATT GGC TGC  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW104**

TGC TCT AGA ACG AGG TCG ACA ATG CGC  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW105**

TGC TCT AGA GCA TCG ATG CTC CCT TCC  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW106**

TGC TCT AGA AGC CGA CTG TTG TGC GAC  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW107**

TGC TCT AGA GTC TTT GGC TAG CCA CGG  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW108**

TGC TCT AGA GTC GCA CGT CTG ACG TGG  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW109**

TGC TCT AGA GAT GTG TAC TCA GAT GGC  
Liegt im *dkh6*-Promotor, führt am 5'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle ein.

**OGW117**

GCA CGC GAT GCG TAA GAA C  
Liegt im *pyr6*-Locus.

**OGW118**

GGT TGG GAC GCC TAT CTG  
Liegt im *pyr6*-Locus.

***NotI-PmlI-NotI* Linker**

GCG GCC GCA CGT GCG GCC GC  
Verwendet zur Herstellung von pGE75.

**OAN3**

CTC TCG CTA TCC TCA GCC  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OAN4**

TGT TGG ACG GCA TGG TGG  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OAN34**

AGA GGG ATG ACG CAC CAC  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OAN35**

GTG TAT GCA CCC CTT CCG  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OAN36**

CCA TCG CTG CTG CAT TCC  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OAN37**

CAG CCA TTC GAT CCC AGC  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OAN38**

CCT GGA CTG CCA ATC ACG  
Liegt im *dik6*-Locus.

**OAN87**

CGT CTC GAT CGA CGT CAC  
Liegt im *pyr6*-Locus.

**OAN88**

ATG CGT GTT GGC ACG CTC  
Liegt im *pyr6*-Locus.

**OAN104**

ACT AGT AAC GGC CGC CAG  
Liegt im Polylinker von pCR-Topo, kann zusammen mit OAN105 zur Amplifikation von inserierten DNA-Fragmenten verwendet werden.

**OAN105**

CCA GTG TGA TGG ATA TCT GC  
Liegt im Polylinker von pCR-Topo, kann zusammen mit OAN104 zur Amplifikation von inserierten DNA-Fragmenten verwendet werden.

**MB69**

TAC GTC GCC GTC CAG CTC G  
Liegt im ORF von *sgfp*, wurde zur Sequenzierung verwendet.

**b1F**

AAG AAT CAG TTC GAA AGA CT  
Liegt im *b1*-Locus.

**b1R**

GGA CTT ACG ACA TTG AAC TC  
Liegt im *b1*-Locus.

**b2F**

AAG ACC CCC TTT GAG TGT AC  
Liegt im *b2*-Locus.

**b2R**

TCG GCT TTC TTC AAG GCT TT  
Liegt im *b2*-Locus.

**F**

GCT GCA GTT GCA CTG AAT TCG CCT C  
Liegt in der 76 bp *lga2 bbs* Kernsequenz.

**R**

CAG GTC AGT TCA GCG GAT CCT GTC G  
Liegt in der 76 bp *lga2 bbs* Kernsequenz.

### 4.1.3 Stämme

#### *E. coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ*  $\Delta$ M15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR-Topo mit dem TOPO-TA Klonierungs-Kit (Invitrogen) wurde teilweise der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: F', *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.

Um auch mit *dam*- und *dcm*-sensitiven Restriktionsendonukleasen Plasmid-DNA zu manipulieren, wurde der Stamm JM110 verwendet, ebenfalls ein *E. coli* K12-Derivat mit folgenden Genotyp: *rpsL*, (Str<sup>r</sup>), *thr*, *leu*, *endA*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), (F'*traD36*, *proAB*, *lacI*<sup>f</sup>  $\Delta$ M15).

Für die Klonierung von cDNA-Plasmiden der cDNA-Expressions-Bibliothek wurde der Stamm XL1-Blue (Stratagene) verwendet, ebenfalls ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F'*proAB*, *lacI*<sup>f</sup> $\Delta$ M15, Tn10(Tet<sup>r</sup>)]. Für die Klonierung von Cosmid-DNA der genomischen Cosmid-Bibliothek wurde der Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet, ebenfalls eine *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp:  $\Delta$ *mcrA*(183),  $\Delta$ (*mcrCB-hsd SMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*. Für die Überexpression von His-Kon8 wurde der Stamm BL21-Gold(DE3) (Stratagene) verwendet. Dieser Stamm ist ein Derivat des Stammes *E. coli* B und weist folgenden Genotyp auf: F', *ompT*, *hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>), *dcm*<sup>+</sup>, Tet<sup>r</sup> *gal*(DE3), *endA*, Hte.

#### *S. cerevisiae*-Stämme

Für sämtliche Transformationen und *lacZ*-Plattentests wurde der Hefestamm K842 verwendet (Schwob und Nasmyth, 1993). Dieser Stamm weist folgenden Genotyp auf: *MATa*/*MAT $\alpha$* , *ade2-1*, *trp1-1*, *can1-100*, *leu2-3, 112*, *his3-11, 15*, *ura3*, *GAL*, *psi*<sup>+</sup>.

#### Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Für Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) und für Tropfinfektionen die Maisvarietät Gaspar Flint (Ben Burr, Brookhaven, New York, USA) verwendet.

***U. maydis*-Stämme****Tabelle 7: Ausgangsstämme**

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6b	<i>a1 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
521	<i>a1 b1</i>	-	Kronstad und Leong, 1989
FB1Δuac1	<i>a1 b1 Δuac1</i>	Hyg <sup>R</sup>	Krüger, 1999
FB1Δubc1	<i>a1 b1 Δubc1</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
CH1	<i>a1 b1 Δpyr6</i>	-	C. Hohenlohe, pers. Mitteilung
FBD11	<i>a1a2 b1b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FBD11-7	<i>a1a1 b1b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FBD12-17	<i>a2a2 b1b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
AB2	<i>a2 Δb</i>	Phleo <sup>R</sup>	Romeis <i>et al.</i> , 2000
AB31	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
AB32	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE2</i>	Phleo <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
AB33	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
AB34	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2</i>	Phleo <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
CL13	<i>a1 bW2bE1</i>	-	Bölker <i>et al.</i> , 1995a
SG200	<i>a1mfa2 bW2bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	Bölker <i>et al.</i> , 1995b
HA103	<i>a1 bW2bE1<sup>con</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	Hartmann <i>et al.</i> , 1996
FB2kon8	<i>a2 b2 ip<sup>r</sup> [P<sub>erg</sub>:his::kon8]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	Brachmann, 2001
UVO35	<i>a1 b1 ip<sup>r</sup> [P<sub>nar</sub>:bW2, bE1]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	J. Kämper und V. Vincon, pers. Mitteilung
UVO38	<i>a2 b2 ip<sup>r</sup> [P<sub>nar</sub>:bW2, bE1]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	J. Kämper und V. Vincon, pers. Mitteilung

Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resis- tenz*	aus**	Stamm	Genotyp	Resis- tenz*	aus**
GE35	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup></i>	C	FB1	GE95	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	CH1x GE70
GE36	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup></i>	C	FB2	GE104	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pGE118</i>	N,P,C	CH1x GE70
GE37	<i>a1 bW2bE1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ips</i>	C	CL13	GE112	<i>a1 b1 ip'[P<sub>dik6</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	C	FB1
GE38	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	SG200	GE113	<i>a2 b2 ip'[P<sub>dik6</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	C	FB2
GE39	<i>a1 b1 Δdik1::egfp</i>	P	FB1	GE116	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:dik6]ip<sup>s</sup></i>	C	FB1
GE40	<i>a2 b2 Δdik1::egfp</i>	P	FB2	GE118	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:dik6]ip<sup>s</sup></i>	C	FB2
GE41	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 Δdik6::hph</i>	P,N,H	AB31	GE158	<i>a1a2 b1b2 dkh6/Δdkh6</i>	P	FBD11
GE47	<i>a2 b2 Δdik6::hph</i>	N,H	FB2	GE164	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW1-1</i>	P	GW1
GE48	<i>a1 b1 Δdik6::hph</i>	N,H	FB1xGE47	GE165	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW1-2</i>	N,P,H	GW1
GE49	<i>a1 b1 Δdik6::hph</i>	N,H	FB1xGE47	GE166	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW52-2</i>	N,P,H	GW52
GE50	<i>a1 b1 Δdik6::hph</i>	N,H	FB1xGE47	GE167	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW52-3</i>	N,P,H	GW52
GE51	<i>a2 b2 Δdik6::hph</i>	N,H	FB1xGE47	GE170	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW53-9</i>	N,P,H	GW53
GE52	<i>a2 b2 Δdik6::hph</i>	N,H	FB1xGE47	GE171	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW53-19</i>	N,P,H	GW53
GE53	<i>a2 b2 Δdik6::hph</i>	N,H	FB1xGE47	GE172	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW56-1</i>	N,P,H	GW56
GE54	<i>a1 b1 Δdik1::egfp Δdik6::hph</i>	P,N,H	GE39x GE47	GE173	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW56-2</i>	N,P,H	GW56
GE59	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 dik6::egfp</i>	P,H	AB31	GE175	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pScosGW57-44</i>	N,P,H	GW57
GE60	<i>a1 b1 Δpyr6</i>	-	CH1xFB2	GE188	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 ip'[P<sub>dik6(1906)</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	AB31
GE61	<i>a1 b1 Δpyr6</i>	-	CH1xFB2	GE191	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 ip'[P<sub>dik6(1386)</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	AB31
GE62	<i>a1 b1 Δpyr6</i>	-	CH1xFB2	GE195	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 ip'[P<sub>dik6(1089)</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	AB31
GE63	<i>a2 b2 Δpyr6</i>	-	CH1xFB2	GE199	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 ip'[P<sub>dik6(816)</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	AB31
GE64	<i>a2 b1 Δpyr6</i>	-	CH1xFB2	GE203	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 ip'[P<sub>dik6(638)</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	AB31
GE65	<i>a2 b1 Δpyr6</i>	-	CH1xFB2	GE204	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 ip'[P<sub>dik6(298)</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	AB31
GE66	<i>a1 b2 Δpyr6</i>	-	CH1xFB2	GE216	<i>a1 b1 Δdrf1</i>	H	FB1
GE67	<i>a1 b2 Δpyr6</i>	-	CH1xFB2	GE217	<i>a1 b1 Δdrf1</i>	H	FB1
GE70	<i>a2 b2 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6</i>	P,N	GE47	GE218	<i>a1 b1 Δdrf1</i>	H	FB1
GE74	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 ipr'[P<sub>dik6(2448)</sub>:sgfp]ips</i>	P,C	AB31	GE219	<i>a2 b2 Δdrf1</i>	H	FB2
GE84	<i>a2 b1 ipr'[P<sub>dik6</sub>:sgfp]ips Δpyr6</i>	C	GE35x GE63	GE220	<i>a2 b2 Δdrf1</i>	H	FB2
GE85	<i>a2 b1 ipr'[P<sub>dik6</sub>:sgfp]ips Δpyr6</i>	C	GE35x GE63	GE221	<i>a2 b2 Δdrf1</i>	H	FB2
GE86	<i>a1 b2 ipr'[P<sub>dik6</sub>:sgfp]ips Δpyr6</i>	C	GE35x GE63	GE222	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1 Δdrf1</i>	P,H	AB31
GE87	<i>a1 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup> Δpyr6</i>		GE35x GE63	GE225	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δdrf1</i>	P,H	SG200
GE88	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup> Δpyr6</i>		GE35x GE63	GE226	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δdrf1</i>	P,H	SG200
GE89	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup> Δpyr6</i>		GE35x GE63	GE227	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δdrf1</i>	P,H	SG200
GE90	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup> Δpyr6</i>		GE35x GE63	GE228	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:drf1]ip<sup>s</sup></i>	C	FB1
GE91	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup> Δpyr6</i>		GE35x GE63				

Die b-vermittelte Regulationskaskade in *Ustilago maydis*

Stamm	Genotyp	Resis- tenz*	aus**	Stamm	Genotyp	Resis- tenz*	aus**
GE229	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2lef</sub>:drf1]ip<sup>s</sup></i>	C	FB2	GW6	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE232	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2lef</sub>:dkh6]ip<sup>s</sup></i>	C	FB1	GW19	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE234	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2lef</sub>:dkh6]ip<sup>s</sup></i>	C	FB2	GW24	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE247	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pNEBUH</i>	P,C	AB33	GW30	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE248	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pGE191</i>	P,C	AB33	GW31	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE249	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pGE192</i>	P,C	AB33	GW46	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE250	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pGE193</i>	P,C	AB33	GW50	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE251	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pGE194</i>	P,C	AB33	GW51	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE252	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pGE195</i>	P,C	AB33	GW52	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE253	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pGE196</i>	P,C	AB33	GW53	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE254	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pGE197</i>	P,C	AB33	GW54	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE256	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 / pGE198</i>	P,C	AB33	GW55	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE269	<i>a1b1 ip'[P<sub>dkh6</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	C	FB1	GW56	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE275	<i>a2b2 ip'[P<sub>dkh6</sub>:sgfp]ip<sup>s</sup></i>	C	FB2	GW57	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95
GE278	<i>a2b2 Δnar1::dkh6 Δdkh6</i>	P,H	FB2	CGW4-1	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA4-1</i>	N,P,H	GE95
GE279	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 ip'[P<sub>o2lef</sub>:drf1::egfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	AB31	CGW4-2	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA4-2</i>	N,P,H	GE95
GE287	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 ip'[P<sub>dkh6</sub>:dkh6::yfp]ip<sup>s</sup></i>	P,C	AB31	CGW4-3	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA4-3</i>	N,P,H	GE95
GE289	<i>a1 bW2bE1 ip'[P<sub>o2lef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup> Δdik6::hph</i>	N,C,H	GE37	CGW4-4	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA4-4</i>	N,P,H	GE95
GE290	<i>a1 bW2bE1 ip'[P<sub>o2lef</sub>:egfp]ip<sup>s</sup> Δdik6::hph</i>	N,C,H	GE37	CGW5-1	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA5-1</i>	N,P,H	GE95
GE291	<i>a1 bE1 ΔbW1::egfp</i>	H	FB1	CGW5-2	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA5-2</i>	N,P,H	GE95
GE293	<i>a2 bW2 ΔbE2::egfp</i>	H	FB2	CGW5-3	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA5-3</i>	N,P,H	GE95
GE297	<i>a1 b1 ip'[P<sub>nar</sub>:bW2,bE1]ip<sup>s</sup> Δubc1</i>	C,N	UVO38x FB1Δubc1	CGW5-4	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA5-4</i>	N,P,H	GE95
UTH0	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH0</i>	P,C	AB31	CGW5-5	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA5-5</i>	N,P,H	GE95
UTH2	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH2</i>	P,C	AB31	CGW5-6	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6 / pcDNA5-6</i>	N,P,H	GE95
UTH3	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH3</i>	P,C	AB31				
UTH4	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH4</i>	P,C	AB31				
UTH5	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH5</i>	P,C	AB31				
UTH6	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH6</i>	P,C	AB31				
UTH7	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH7</i>	P,C	AB31				
UTH8	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH8</i>	P,C	AB31				
UTH9	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH9</i>	P,C	AB31				
UTH29	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH29</i>	P,C	AB31				
UTH30	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH30</i>	P,C	AB31				
UTH31	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2,bE1 / pTH31</i>	P,C	AB31				
GW1	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95				
GW2	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95				
GW3	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95				
GW4	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95				
GW5	<i>a2 b1 Δdik1::egfp Δdik6::pyr6 Δpyr6</i>	N,P	GE95				

Abkürzungen: C, Cbx<sup>R</sup>; H, Hyg<sup>R</sup>; N, Nat<sup>R</sup>; P, Phleo<sup>R</sup>. Die Resistenzen sind in der Reihenfolge ihrer Einführung angegeben.  
\*\* "aus" bezeichnet den Ausgangsstamm, d. h. den Stamm, in dem die jeweils letzte Transformation erfolgte.



#### 4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

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

##### Ausgangsplasmide

###### **pSP72** (Promega)

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

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

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### **pBS(+)**SKII (Stratagene)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich

###### **pUC18** (Yanisch-Perron et al., 1985)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

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

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### **pTZ18R** (Pharmacia)

Klonierungsvektor, Derivat von pUC19 mit verändertem Polylinker, Blau/ Weiß-Selektion ist möglich.

###### **pTZ19R** (Pharmacia)

Klonierungsvektor, Derivat von pUC19 mit verändertem Polylinker, Blau/ Weiß-Selektion ist möglich.

###### **pSP72ΔSspI** (Brachmann, 2001)

Entstanden aus pSP72, in dem die *SspI*-Schnittstelle in der TATA-Box des Ampicillin-Resistenzgens durch gerichtete PCR-Mutagenese zerstört wurde.

###### **pUC19ΔSspI** (Brachmann, 2001)

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

###### **pSL1180** (Pharmacia)

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

###### **pNEB193** (NEB)

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

###### **pCR-Topo** (Invitrogen)

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

###### **pCR-Sma** (Brachmann, 2001)

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

###### **pSMUT** (Bölker et al., 1995a)

Enthält in pSP72 eine Hygromycin-Resistenzkassette, die unter der Kontrolle des *sc*-Promotors aus *S. cerevisiae* steht.

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

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

###### **pBS-hhn** (J. Kämper, pers. Mitteilung)

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

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

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

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

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

**pScos1** (Stratagene)

Klonierungsvektor für die Aufnahme großer DNA-Fragmente. Enthält eine Neomycin-Resistenzkassette und *cos*-Bereiche.

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

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

**p123** (C. Aichinger, pers. Mitteilung)

Enthält den das *egfp*-Gen unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors, den *nos*-Terminator am 3'-Ende des *egfp*-Gens sowie eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion in *U. maydis*.

**pSL-Ble(+), pSL-Ble(-)** (Brachmann, 2001)

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

**pSL-Cbx(+), pSL-Cbx(-)** (Brachmann, 2001)

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

**pSL-Hyg(+), pSL-Hyg(-)** (Brachmann, 2001)

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

**pSL-Nat(+), pSL-Nat(-)** (Brachmann, 2001)

Aus pSLNat wurde die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1.455 bp *BamHI/PstI*-Fragment ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen in pBS(+)*SK* eingefügt (pBS-Nat). Daraus wurde die Kassette als 1.467 bp *NotI*-Fragment ausgeschnitten und in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *natI*-Gen (aus *Streptomyces noursei*) wird von dem *gapI*-Promotor (aus *U. maydis*) und dem *cycI*-Terminator (aus *S. cerevisiae*) flankiert.

**pNEB-Ble(+), pNEB-Ble(-)** (Brachmann, 2001)

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

**pNEB-Cbx(+), pNEB-Cbx(-)** (Brachmann, 2001)

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

**pNEB-Hyg(+), pNEB-Hyg(-)** (Brachmann, 2001)

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

**pNEB-Nat(+), pNEB-Nat(-)** (Brachmann, 2001)

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

**pCRbbs76** (A. Gähler, pers. Mitteilung)

Enthält die Kernsequenz des 76 bp Fragments der *lga2 b b s*, die als *EcoRI*-Fragment in pCR-Topo inseriert wurde.

**pEGFP** (Clontech)

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

**pCGFP** (Clontech)

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

**pYGFP** (Clontech)

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

**pCU4cgfp** (Brachmann, 2001)

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

**pCU4ygfp** (Brachmann, 2001)

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

**pCU4** (Brachmann, 2001)

Der *o2tef*-Promotor wurde als 873 bp *KpnI/SmaI*-Fragment aus pOTEF-SG ausgeschnitten und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pRUpro(-) inseriert, wobei die überhängenden *KpnI*-Enden entfernt wurden. Aus diesem Konstrukt konnte der *o2tef*-Promotor als 903 bp *NotI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten und an Stelle des *nar1*-Promotors in den mit *NotI* (Partialverdau) und *NdeI* geöffneten Vektor pRU2 eingefügt werden.

**pRU4** (Brachmann, 2001)

Enthält eine Carboxin-Resistentkassette zur Selektion in *U. maydis*, das *sgfp*-Gen, das unter der Kontrolle eines 986 bp langen *nar1*-Promotors steht. Mittels PCR wurde am Translations-Startpunkt eine *NdeI*-Schnittstelle erzeugt.

**pRU11** (Brachmann, 2001)

Für dieses Konstrukt wurde zunächst der *crg1*-Promotor als 3,5 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment aus pCRGFP2 in die entsprechenden Stellen von pBS(+)-SK eingefügt. Anschließend wurde in diesem Vektor eine interne *NdeI*-Schnittstelle im Promotor durch Linearisierung mit *NdeI*, Auffüllen der überhängenden Enden und Religation entfernt und mittels gerichteter PCR-Mutagenese (mit den Oligonukleotiden OAN1 und OAN2) an der Translations-Startstelle eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt (ergab pBScrg1p-NdeI). Aus diesem Konstrukt wurde der *crg1*-Promotor als 3.522 bp *BamHI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten und in den mit *EcoNI* und *NdeI* geöffneten Vektor pRU2 inseriert, wobei die überhängenden *BamHI*- und *EcoNI*-Schnittstellen aufgefüllt worden waren.

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

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

**pJBbE1** (Bergemann, 1993)

Enthält ein intronfreies *bE1*-Gen mit einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**pJBbE2** (Bergemann, 1993)

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

**pJBbW1** (Bergemann, 1993)

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

**pJBbW2** (Bergemann, 1993)

Enthält ein intronfreies *bW2*-Gen mit einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**plga2sgfp** (Romeis et al., 2000)**plga2sgfpmut** (Romeis et al., 2000)**pGAD424** (Bartel et al., 1993)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, den *ADHI*-Promotor, gefolgt von einem Kerlokalisationsignal, der GAL4-Aktivierungsdomäne, einem Polylinker mit den Restriktionsschnittstelle für *EcoRI*, *SmaI*, *BamHI*, *SalI* und *PstI* und dem *ADHI*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an ein Protein der Wahl.

**pXGA** (Kämper et al., 1995)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, den *ADHI*-Promotor, gefolgt von einem Kerlokalisationsignal, einem Polylinker mit den Restriktionsschnittstelle für *NdeI*, *SmaI* und *SalI*, der GAL4-Aktivierungsdomäne und dem *ADHI*-Terminator. Ermöglicht die C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an ein Protein der Wahl.

**pRS303** (Sikorski und Hieter, 1989)**pRSlacZ** (Romeis et al., 2000)

Enthält den *GAL1/10  $\Delta$ UAS*-Promotor und ein *lacZ*-Reportergen, sowie ein *CEN*-Region. Verwendet zur Klonierung von Promotorfragmenten, die in einem Hefe Ein-Hybrid-System getestet werden können.

**pOH** (Brachmann, 2001)

Ein-Hybrid Hefevektor, der eine singuläre *SmaI*-Schnittstelle vor einem *cyc1*-Basalpromotor und dem *lacZ*-Gen besitzt. Entstanden aus pLGΔ312 durch Linearisierung mit *XmaI*, Auffüllen der überhängenden Enden, darauf folgend Linearisierung mit *SalI* und Einfügen eines *PmlI/SalI* Polylinker-Fragments aus pSL1180. In dem so entstandenen Plasmid pLG-S wurde durch Restriktion mit *SmaI* und anschließende Religation ein 252 bp *SmaI*-Fragment entfernt, so dass eine singuläre *SmaI*-Schnittstelle und damit pOH entsteht.

**pScW2** (Romeis et al., 2000)

Enthält die cDNA von *bW2*, die ein bW2 Protein mit den Aminosäuren 19 – 632 kodiert. Zusätzlich trägt das Plasmid eine 2 μ-Region, den *ADHI*-Promotor und -Terminator.

**pScE2** (Romeis et al., 2000)

Enthält die cDNA von *bE2*, die ein bE2 Protein der vollen Länge kodiert. Zusätzlich trägt das Plasmid eine 2 μ-Region, den *ADHI*-Promotor und -Terminator.

**pScE1** (Romeis et al., 2000)

Enthält die cDNA von *bE1*, die bE1 Protein der vollen Länge kodiert. Zusätzlich trägt das Plasmid eine 2 μ-Region, den *ADHI*-Promotor und -Terminator.

**pScKon8-GA** (Romeis et al., 2000)

Enthält den ORF von *kon8*, der als *NdeI*-Fragment in pXGA eingesetzt wurde.

**pΔnar1** (Brachmann, 2001)

Enthält ein 3.2 kb *EcoRI/NotI*-Fragment aus dem 3'-UTR und ein 2,1 kb *NotI/NdeI*-Fragment aus dem 5'-UTR von *nar1*. Mittels gerichteter PCR-Mutagenese wurde am Translations-Startkodon eine *NdeI*-Schnittstelle und am Translations-Stopkodon eine *NotI*-Schnittstelle eingeführt.

**pΔpyr6** (Brachmann, 2001)

Für dieses Konstrukt wurde zunächst ein 4,0 kb *PstI*-Fragment aus dem Cosmid 29F4 in den mit *PstI* linearisierten Vektor pUC19 kloniert (ergab pUC-pyr6). Danach wurde durch PCR-Amplifikation aus diesem Konstrukt mit den Oligonukleotiden UNI24 und pyr6-NotI-5' eine 5'-Flanke und durch Amplifikation mit REV24 und pyr6-NotI-3' eine 3'-Flanke erzeugt. Diese beiden Fragmente wurden mit *NotI* und *PstI* geschnitten und zusammen in den mit *PstI* geöffneten Vektor pUC19 inseriert. Das Konstrukt besitzt eine 1,6 kb *PstI/NotI* 5'-Flanke und eine 1,7 kb *PstI/NotI* 3'-Flanke; bei homologer Rekombination in *U. maydis* wird das gesamte *pyr6*-Gen deletiert.

**pΔdik6::pyr6** (A. Brachmann, pers. Mitteilung)

Enthält in dem mit *Acc65I* und *XbaI* geöffneten Vektor pBS(+)-SK ein 1.080 bp *Acc65I/NdeI*-Fragment, dessen *NdeI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *dik6* 5'-Bereichs mit PCR erzeugt wurde, ein mit PCR generiertes 852 bp *NdeI/AscI*-Fragment, das den *pyr6*-ORF enthält, und ein ebenfalls mit PCR erzeugtes 743 bp *AscI/XbaI*-Fragment, das den 3'-Bereich von *dik6* enthält. Anschließend wurde in die *AscI*-Schnittstelle ein 1.483 bp *AscI*-Fragment aus pNEB-Nat(+) inseriert. Dieses Plasmid wurde verwendet, um den ORF von *dik6* gegen den ORF von *pyr6* auszutauschen.

**pΔdik6::hph** (A. Brachmann, pers. Mitteilung)

Enthält in dem mit *Acc65I* und *XbaI* geöffneten Vektor pBS(+)-SK ein 1.080 bp *Acc65I/NdeI*-Fragment, dessen *NdeI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *dik6* 5'-Bereichs mit PCR erzeugt wurde, ein mit PCR generiertes 951 bp *NdeI/AscI*-Fragment, das den *hph*-ORF enthält, und ein ebenfalls mit PCR erzeugtes 743 bp *AscI/XbaI*-Fragment, das den 3'-Bereich von *dik6* enthält. Anschließend wurde in die *AscI*-Schnittstelle ein 1.483 bp *AscI*-Fragment aus pNEB-Nat(+) inseriert. Dieses Plasmid wurde verwendet, um den ORF von *dik6* gegen den ORF von *hph* auszutauschen.

**pNEB-pyr6 NdeI-AscI** (Brachmann, 2001)

Enthält das *pyr6*-Gen als *NdeI/AscI*-Fragment in pNEB193, entstanden durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden OAN12 und OAN14.

**p6.5MluIdik6** (Bohlmann, 1996)

Enthält ein ca. 6.500 bp *MluI*-Fragment aus dem Cosmid 26E12, das nach dem Auffüllen der überhängenden Enden in den mit *SmaI* geöffneten Vektor pUC19 inseriert wurde.

**p3.7HindIIIIdik6** (Bohlmann, 1996)

Enthält ein ca. 3.700 bp *HindIII*-Fragment aus dem Cosmid 26E12, das in den mit *HindIII* geöffneten Vektor pSP72 inseriert wurde.

**p5.3BamHIdik1** (Bohlmann, 1996)

Enthält ein ca. 5.300 bp *BamHI*-Fragment aus dem Cosmid PoolVIIIcos2, das in den mit *BamHI* geöffneten Vektor pBS(+)-SK inseriert wurde.

**pdik2cDNAH10** (Bohlmann, 1996)

Enthält als chimäres *EcoRI*-Fragment cDNA-Sequenzen von *hum2* und *ppi1* in der entsprechenden Restriktionsschnittstelle von pBS(+)-SK.

**phda1** (M. Reichmann, pers. Mitteilung)

pCM54 enthält ein Fragment, das den *hda1*-Locus umfasst.

**po2tef-egfp-kpp4-Hyg(-)** (P. Müller, pers. Mitteilung)

Enthält eine Fusion des *egfp*-Gens mit *kpp4* und eine Hygromycin-Resistenzkassette.

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

Cosmidbank des *U. maydis*-Stammes FBD11 (*ala2 b1b2*), erzeugt durch Ligation partiell restringierter *MboI*-Fragmente in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pUMcos. pUMcos ist ein Derivat des Vektors pScos1 (Stratagene), in dem ein *BglII/HindIII*-Fragment, das die Neomycin-Resistenzkassette enthält, durch ein *EcoRV/SmaI*-Fragment aus dem Vektor pCBX122, das die Carboxin-Resistenzkassette enthält, ausgetauscht wurde.

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

cDNA-Bank des Stammes FBD11 (*ala2 b1b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium. Erstellt mit dem cDNA Bank-Kit von Amersham.

**Freireplizierende Cosmidbank**

Diese Arbeit.

**Freireplizierende cDNA-Bank**

Diese Arbeit.

**Plasmide für die Herstellung von Hybridisierungssonden****pCR-rep1**

Enthält ein 429 bp *BamHI/HindIII*-Fragment von *rep1* aus dem Plasmid pSL6,8NdeIrep1, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-dik1**

Enthält ein 357 bp *NcoI/AvaII*-Fragment von *dik11* aus dem Plasmid p5.3BamHIdik1 (Bohlmann, 1996), bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-hum2**

Enthält ein 345 bp *SphI/SphII*-Fragment von *hum2* aus dem Plasmid pRep/ORF (R. Bohlmann, pers. Mitteilung), bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-pyr6**

Enthält ein 294 bp *NdeI/EcoRV*-Fragment von *pyr6* aus dem Plasmid pGE40, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-dik6**

Enthält ein 549 bp *BstBI/AIwNI*-Fragment von *dik6* aus dem Plasmid p6,5Mludik6, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-lga2** (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Enthält ein *BsmBI/HindIII*-Fragment von *lga2* aus dem Plasmid pUMa2, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-egl1**

Enthält ein 522 bp *NcoI/HindIII*-Fragment von *egl1* aus dem Plasmid pGE60, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pCR-ppi**

Enthält ein 132 bp *MscI/EcoRI*-Fragment von *ppi1* aus dem Plasmid pdik2cDNAH10, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

**pfrb34** (Brachmann, 2001)

Enthält ein 1.055 bp *EcoRI/EcoRI*-Fragment des Amplicons *frb34*, das in pCR-Topo kloniert wurde.

**pfrb52** (Brachmann, 2001)

Enthält ein 392 bp *EcoRI/EcoRI*-Fragment des Amplicons *frb52*, das in pCR-Topo kloniert wurde.

**pfrb124** (Brachmann, 2001)

Enthält ein 577 bp *EcoRI/EcoRI*-Fragment des Amplicons *frb124*, das in pCR-Topo kloniert wurde.

**pfrb136** (Brachmann, 2001)

Enthält ein 1.091 bp *EcoRI/EcoRI*-Fragment des Amplicons *frb136*, das in pCR-Topo kloniert wurde.

**SAN3329** (A. Brachmann, pers. Mitteilung)

Enthält ein 988 bp *XbaI/BamHI*-Fragment, das einen Teil der Sequenz von *orf1* trägt.

**SAN3400** (A. Brachmann, pers. Mitteilung)

Enthält ein 541 bp *SacI/PstI*-Fragment, das einen Teil der Sequenz von *orf2* trägt.

**SAN3291** (A. Brachmann, pers. Mitteilung)

Enthält ein 1.387 bp *BamHI*-Fragment, das einen Teil der Sequenz von *orf3* trägt.

**SAN3366** (A. Brachmann, pers. Mitteilung)

Enthält ein 1.916 bp *SacI*-Fragment, das einen Teil der Sequenz von *orf4* trägt.

**pKH541** (K. Hansson, pers. Mitteilung)

Enthält ein 2.100 bp *SphI*-Fragment, das einen Teil der Sequenz von *pig3* trägt.

**pKH518** (K. Hansson, pers. Mitteilung)

Enthält ein 1.600 bp *NcoI/XbaI*-Fragment, das einen Teil der Sequenz von *pig4* trägt.

**PMIGBS** (C. Basse, pers. Mitteilung)

Enthält ein *NruI/PstI*-Fragment, das einen Teil der Sequenz von *mig1* trägt.

**pSH4** (Huber, 2001)

Enthält ein 1.091 bp *HpaI/BamHI*-Fragment, das den *ssp1*-Locus trägt.

**pSP4,2EcoRV** (Bölker et al., 1992)

Enthält ein 4,2 kb *EcoRV*-Fragment aus dem *a1*-Locus.

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

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

**pbW2-NdeI-bE1** (Brachmann, 2001)

Enthält ein intronfreies 1.837 bp *NdeI/PvuII* 5'-Fragment von *bW2* und ein intronfreies 761 bp *NdeI/PvuII* 5'-Fragment von *bE1*. Entstanden durch Einfügen des 2.598 bp *PvuII*-Fragments aus pE1W2ΔP#1 in den mit *PvuII* linearisierten Vektor pBS(+)-SK.

**Hilfskonstrukte****pGE17**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein 912 bp *BamHI/PvuII*-Fragment aus p123 in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids pSP72 inseriert. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE30.

**pGE24**

Enthält den *sc*-Promotor aus pSMUT als PCR-Produkt, wobei die Oligonukleotide OGW13 und OGW14 eingesetzt wurden, so dass er als 496 bp *NotI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten werden kann. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE34.

**pGE25**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 1.544 bp PCR-Amplifikat, das mit Hilfe einer Mega-Primer Reaktion und den Oligonukleotiden OGW6, GW17 und OGW8 generiert wurde, als *PvuII*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle des Plasmids pSP72 eingefügt. Das 1.544 bp *PvuII*-Fragment enthält den *sc*-Promotor und den *hph*-ORF aus pSMUT, wobei eine *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb des kodierenden Bereichs durch die PCR-Amplifikation entfernt wurde. Hilfskonstrukt für die Herstellung von pGE101.

**pGE30**

Entstanden durch das Einfügen eines 383 bp *SspI*-Fragments aus pCM54, das die UARS enthält, in das mit *SspI* geöffnete Plasmid pGE17. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE40.

**pGE34**

Entstanden durch das Einfügen eines 498 bp *NotI/NdeI*-Fragments aus dem Plasmid pGE24 und eines 862 bp *NdeI/NotI*-Fragments aus pNEB-pyr6NdeI-AseI in den mit *NdeI* und *NotI* geöffneten Vektor pSL1180. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE40.

**pGE40**

Für dieses Konstrukt wurde ein 1.361 bp *NotI*-Fragment aus pGE34, dessen Enden aufgefüllt wurden, in das mit *HpaI* geöffnete Plasmid pGE30 eingefügt. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE108.

**pGE60**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 1.200 bp *NcoI/NruI*-Fragment aus *peg11* (M. Reichmann, pers. Mitteilung) in das mit *SmaI* geöffnete Plasmid pTZ18R eingefügt. Zuvor wurde das überhängende Ende der *NcoI*-Schnittstelle aufgefüllt. Dieses Plasmid enthält somit den vollständigen ORF von *egl1*.

**pGE72**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 383 bp *SspI*-Fragment aus pCM54, das die UARS enthält, in den mit *SspI* geöffneten Vektor pNEB193 integriert. Hilfskonstrukt für die Herstellung verschiedener Plasmide, die in *U. maydis* frei replizieren können.

**pGE75**

In die aufgefüllte *AatII*-Schnittstelle des Plasmids pGE72 wurde ein 20 bp großes *NotI-PmlI-NotI* Linker-Oligonukleotid eingesetzt. Hilfskonstrukt für die Herstellung von pGE76, pGE77, pGE78 und pGE79.

**pGE104**

Dazu wurde das Plasmid pBS(+)-SKII mit *HindIII* und *NotI* geöffnet und ein 492 bp *HindIII/ScaI*-Fragment aus p3.7HindIII<sub>dik6</sub> und ein 745 bp *SmaI/NotI*-Fragment aus p123 inseriert. Auf diese Weise wurde das *egfp*-Gen im gleichen Leseraster an den *dik6*-ORF anfusioniert. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE106.

**pGE105**

Dazu wurde das Plasmid pBS(+)-SKII mit *EcoRV* und *NotI* geöffnet und ein 1.085 bp *EcoRV/NheI*-Fragment aus p3.7HindIII<sub>dik6</sub> und ein 2.560 bp *XbaI/NotI*-Fragment aus pSL-Hyg(+) inseriert. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE106.

#### **pGE110**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 1.844 bp großes *EcoRI*-Fragment aus dem Cosmid 26E12, das einen Teil des *dik6*-Locus enthält, in den mit *EcoRI* geöffneten Vektor pTZ18R inseriert. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE115.

#### **pGE114**

Entstanden durch eine Drei-Fragmentligation, bei der ein 1.844 bp *EcoRI*-Fragment aus pGE110 und ein 1.100 bp *EcoRI/SalI*-Fragment aus p $\Delta$ *dik6::pyr6* in das mit *EcoRI* und *XhoI* geöffnete Plasmid pSP72 eingefügt wurden. Auf diese Weise wurde das 3'-Ende des *dik6*-Promotors mit einer *NdeI*-Schnittstelle versehen. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE115.

#### **pGE115**

Ein 2.457 bp *EcoRV/NdeI*-Fragment aus pGE114 wurde in den mit *HpaI* und *NdeI* geöffneten Vektor pRU4 eingefügt. Dieses Plasmid wurde als Hilfskonstrukt für die Herstellung der Plasmide pTH11, pTH13, pTH15, pTH16, pTH17, pTH18 und pTH19 verwendet.

#### **pGE116**

In das mit *NotI* geöffnete Plasmid SAN2240 (A. Brachmann, pers. Mitteilung) wurde ein 1.939 bp *NotI*-Fragment aus pSL-Cbx(+) inseriert. Auf diese Weise wurde die Phleomycin-Resistenzkassette in SAN2240 gegen eine Carboxin-Resistenzkassette ausgetauscht, die zwischen zwei *nar1*-Promotoren liegt. Hilfskonstrukt für die Herstellung von pGE118.

#### **pGE117**

In das mit *NdeI* geöffnete Plasmid pb<sup>con</sup> wurde ein 6.153 bp *NdeI*-Fragment aus pGE116 eingefügt. Auf diese Weise werden die *bW1*- und *bE2*-Gene unter die Kontrolle von *nar1*-Promotoren gebracht. Hilfskonstrukt für die Herstellung von pGE118.

#### **pGE123**

Mittels PCR wurde mit den Oligonukleotiden OGW50 und OGW51 am Translations-Startpunkt von *dik6* eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt. Anschließend wurde das 409 bp *NdeI/PfIMI*-Fragment zusammen mit einem 836 bp *PfIMI/ApaLI*-Fragment aus p6.5MluIdik6 und einem 331 bp *ApaLI/NotI*-Fragment, bei dem mit Hilfe der Oligonukleotide OGW52 und OGW53 eine *NotI*-Schnittstelle am Translations-Stopkodon von *dik6* erzeugt wurde, in das mit *NdeI* und *NotI* geöffnete Plasmid pSL1180 eingefügt. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE124, das den ORF von *dik6* enthält.

#### **pGE142**

Mittels PCR wurde mit den Oligonukleotiden OGW80 und OGW81 am Translations-Startpunkt von *dkh6* eine *NdeI*-Schnittstelle bzw. am Translations-Stopkodon eine *NotI*-Schnittstelle eingeführt. Anschließend wurde das 1.602 bp PCR-Amplifikat in das Plasmid pCR-Topo inseriert. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE169, das den ORF von *dkh6* enthält.

#### **pGE143**

Enthält in PCR-Topo ein 1.104 bp PCR-Amplifikat des *dkh6*-Promotors, wobei mittels der Oligonukleotide OGW76 und OGW82 am 3'-Ende des Promotors eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pMV2.

#### **pGE164**

Unter Verwendung der Oligonukleotide OGW87 und OGW88 wurde am Translations-Startpunkt von *drf1* eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt und das resultierende 661 bp PCR-Amplifikat in das Plasmid pCR-Topo eingefügt. Hilfskonstrukt für die Herstellung von pGE166.

#### **pGE166**

Mittels PCR wurde mit den Oligonukleotiden OGW87 und OGW88 am Translations-Startpunkt von *drf1* eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt. Anschließend wurde das 661 bp *NdeI/NsiI*-Fragment zusammen mit einem 1.029 bp *NsiI/NotI*-Fragment aus pcDNA5-6-5A in das mit *NdeI* und *NotI* geöffnete Plasmid pSL1180 eingefügt. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE167, das den ORF von *drf1* enthält.



**pGE172**

Das Plasmid p $\Delta$ nar1 wurde mit *NdeI* und *NotI* geöffnet und ein 1.602 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pGE142, das den ORF von *dkh6* umfasst, eingebracht. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pGE176.

**pGE175**

Enthält ein 1.924 bp PCR-Amplifikat in pCR-Topo, das den 5'-Bereich von *dkh6* umfasst. Dabei wurde am 5'-Ende unter Verwendung der Oligonukleotide OGW94 und OGW95 eine *NotI*-Schnittstelle eingeführt. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pMV2.

**pGE181**

Ein mit PCR und den Oligonukleotiden OGW101 und uni24 erzeugtes *dkh6*-Promotorfragment wurde in das Plasmid pCR-Topo eingefügt. Hilfskonstrukt für die Herstellung von pMV5.

**pThx**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 383 bp *SspI*-Fragment aus pCM54, das die UARS enthält, in den mit *SspI* geöffneten Vektor pSP72 integriert. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pTHxx.

**pThxx**

Aus pRU4 wurde die Carboxin-Resistenzkassette als 1.884 bp *EcoRV/HindIII*-Fragment ausgeschnitten und in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geöffneten Vektor pTHx eingefügt. Aus pTHxx kann durch einen Schnitt mit *FspI* und *AgeI* ein 2.290 bp Fragment isoliert werden, das einen Teil des *bla*-ORFs, der Carboxin-Resistenzkassette und die UARS enthält. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pTH0, pTH3 und pTH9.

**pMV2**

Zuerst wurde der *dkh6*-Promotor zusammengesetzt, indem in die *SnaBI*- und *SpeI*-Schnittstellen des Plasmids pGE143 ein 1.912 bp *SnaBI/SpeI* Fragment aus dem Plasmid pGE175 inseriert wurde. Hilfskonstrukt für die Herstellung von pMV3.

**pMV4**

In die *BamHI*- und *NotI*-Schnittstellen des Plasmids pBS(+)*SKII* wurde ein 328 bp *BamHI/NsiI*-Fragment aus dem Plasmid pGE142 und ein 739 bp *PstI/NotI*-Fragment aus pCUygf kloniert. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pMV5.

**pMV5**

Enthält ein 1.265 bp *NdeI/BamHI*-Fragment aus pGE142 und ein 1.067 bp *BamHI/NotI*-Fragment aus pMV4 in dem mit *NdeI* und *NotI* geöffneten Vektor pGE181. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pMV9.

**pMV7**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde in den mit *NdeI* und *NotI* geöffneten Vektor pSL1180 ein 1.491 bp *NdeI/ScaI*-Fragment aus pGE124 zusammen mit einem 747 bp *SmaI/NotI*-Fragment aus pCU4cgfp eingefügt. Auf diese Weise wurden der ORF von *dik6* und der ORF des *cgfp*-Gens im gleichen Leseraster fusioniert. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pMV8.

**pMV8**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde in den mit *EcoRV* und *NotI* geöffneten Vektor pBS(+)*SKII* ein 2.238 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pMV7 zusammen mit einem 2.457 bp *EcoRV/NdeI*-Fragment aus pGE114 eingefügt. Auf diese Weise wurde das *dik6-cgfp* Fusionskonstrukt unter die Kontrolle des *dik6*-Promotors gebracht. Hilfskonstrukt zur Herstellung von pMV10.

**Plasmide mit Resistenzkassetten****pGE43 (pNEB-Hyg(+) $\Delta$ EcoRI)**

In das mit *NcoI* und *PshAI* geöffnete Plasmid pNEB-Hyg(+) wurde ein 329 bp *NcoI/PshAI*-Fragment aus pGE25 eingefügt. Auf diese Weise wurde die *EcoRI*-Schnittstelle in pNEB-Hyg(+) entfernt.

**pGE45 (pSL-Hyg(+) $\Delta$ EcoRI, pSL-Hyg(-) $\Delta$ EcoRI)**

Zur Herstellung dieser Plasmide wurde ein 2.729 bp *NotI*-Fragment aus pGE43 in das mit *NotI* geöffnete Plasmid pSL1180 eingefügt.

**pGE46 (pNEB-Hyg(-) $\Delta$ EcoRI)**

pNEB-Hyg(+) wurde mit *NotI* geöffnet und ein 2.729 bp *NotI*-Fragment aus pGE43 inseriert.

## **Freireplizierende Plasmide mit Resistenzkassetten**

### **pGE76 (pNEBUH)**

In das mit *PmlI* geöffnete Plasmid pGE75 wurde ein 2.659 bp *HindIII/XhoI*-Fragment aus pSL-Hyg(+) $\Delta$ EcoRI inseriert. Zuvor wurden die überhängenden Enden aufgefüllt. Dieses Fragment enthält die Hygromycin-Resistenzkassette, die UARS und den Polylinker von pNEB193.

### **pGE77 (pNEBUC)**

In das mit *PmlI* geöffnete Plasmid pGE75 wurde ein 1.839 bp *BsiWI/Eco47III*-Fragment aus pSL-Cbx(+) inseriert. Zuvor wurden das überhängende Ende der *BsiWI*-Schnittstelle aufgefüllt. Dieses Fragment enthält die Carboxin-Resistenzkassette, die UARS und den Polylinker von pNEB193.

### **pGE78 (pNEBUN)**

In das mit *PmlI* geöffnete Plasmid pGE75 wurde ein 1.378 bp *NsiI/XbaI*-Fragment aus pSL-Nat(+) inseriert. Zuvor wurden die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. abgedaut. Dieses Fragment enthält die Nourseothricin-Resistenzkassette, die UARS und den Polylinker von pNEB193.

### **pGE79 (pNEBUP)**

In das mit *PmlI* geöffnete Plasmid pGE75 wurde ein 2.347 bp *HindIII/BglII*-Fragment aus pSL-Ble(+) inseriert. Zuvor wurden die überhängenden Enden aufgefüllt. Dieses Fragment enthält die Phleomycin-Resistenzkassette, die UARS und den Polylinker von pNEB193.

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

### **pGE124**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein 2.098 bp *NdeI/BglII*-Fragment und ein 3.234 bp *BglII/NotI*-Fragment aus pCU4 mit einem 1.581 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pGE123 zusammengefügt. Dieses Plasmid enthält den ORF von *dik6* unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors und wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert.

### **pGE167**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein 2.098 *NdeI/BglII*-Fragment und ein 3.234 bp *BglII/NotI*-Fragment aus pCU4 mit einem 1.692 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pGE166 zusammengefügt. Dieses Plasmid enthält den ORF von *drf1* unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors und wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert.

### **pGE169**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein 2.098 bp *NdeI/BglII*-Fragment und ein 3.234 bp *BglII/NotI*-Fragment aus pCU4 mit einem 1.602 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pGE142 zusammengefügt. Dieses Plasmid enthält den ORF von *dkh6* unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors und wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert.

### **pGE206**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde das Plasmid pMV3 mit *NdeI* und *NotI* geöffnet, um das *cgfp*-Gen gegen ein 726 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pRU4 auszutauschen. Dieses Plasmid trägt somit das *sgfp*-Gen unter der Kontrolle des *dkh6*-Promotors und kann in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert werden.

### **pMV1**

In die *NdeI* und *NotI* Schnittstellen des Plasmids pGE115 wurde ein 726 bp *NotI/NdeI*-Fragment aus pGE173 eingefügt, um das Plasmid pMV1 zu konstruieren. Dieses Plasmid enthält das *cgfp*-Gen unter der Kontrolle des *dik6*-Promotors und kann in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert werden.

### **pMV3**

In die *HpaI* und *NotI* Schnittstellen des Plasmids pRU4 wurde ein 726 bp *NotI/NdeI*-Fragment aus dem Plasmid pGE174 und ein *NotI/NdeI*-Fragment aus pMV2 kloniert. Das überhängende Ende der *NotI*-Schnittstelle wurde zuvor geglättet. Dieses Plasmid enthält das *cgfp*-Gen unter der Kontrolle des *dkh6*-Promotors und kann in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert werden.

## Plasmide zur Herstellung von Deletionsmutanten

### pGE71

Enthält zwischen den *Bam*HI und *Asc*I-Schnittstellen des Plasmids pNEB193 ein 1.854 bp *Bam*HI/*Nco*I-Fragment aus p5.3*Bam*HI*dik1*, ein 726 bp *Nco*I/*Not*I-Fragment aus p123 und ein 2.399 bp *Not*I/*Bsp*120I-Fragment aus pSL-Ble(+). Anschließend wurde in den mit *Asc*I geöffneten Vektor ein 1.414 bp *Mlu*I-Fragment aus p5.3*Bam*HI*dik1* eingefügt. Das so entstandene Plasmid wurde zum Austausch des ORFs von *dik1* gegen den ORF des *egfp*-Gens verwendet.

### pGE145

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit PCR und den Oligonukleotiden OGW76 und OGW77 erzeugtes 1.098 bp *Asc*I/*Not*I-Fragment des *dkh6* 5'-Bereichs und ein mit PCR und den Oligonukleotiden OGW78 und OGW79 erzeugtes 993 bp *Not*I/*Pac*I-Fragment des *dkh6* 3'-Bereichs zusammen mit einem 2.407 bp *Not*I-Fragment aus pSL-Ble(+) in den mit *Pac*I und *Asc*I geöffneten Vektor pNEB193 inseriert. Dieses Konstrukt wurde zur Erzeugung von *dkh6*-Deletionsstämmen verwendet.

### pGE165

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit PCR und den Oligonukleotiden OGW83 und OGW84 erzeugtes 1.044 bp *Eco*RI/*Sfi*I-Fragment des *drf1* 5'-Bereichs und ein mit PCR und den Oligonukleotiden OGW85 und OGW86 erzeugtes 1039 bp *Sfi*I/*Eco*RI-Fragment des *drf1* 3'-Bereichs zusammen mit einem 1.884 bp *Sfi*I-Fragment aus pBS-hhn zusammengesetzt und in den Vektor pCR-Topo inseriert. Dieses Konstrukt wurde zur Erzeugung von *drf1*-Deletionsstämmen verwendet.

### pGE176

In das mit *Not*I geöffnete Plasmid pGE142 wurde ein 2.896 bp *Not*I-Fragment aus pSLHyg(+) eingebracht. Dieses Fragment enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette. Dieses Konstrukt deletiert bei homologer Rekombination das *nar1*-Gen

## Plasmide für *dik6::egfp*, *dik6::cgfp*, *dkh6::ygfp* und *egfp::drf1*-Konstrukte

### pGE106

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 1.237 bp *Hind*III/*Not*I-Fragment aus pGE104 und ein 3.645 bp *Eco*RV/*Not*I-Fragment aus pGE105 in das mit *Hind*III und *Eco*RV geöffnete Plasmid pBS(+)*SK*II eingefügt. Dieses Konstrukt wurde zur Integration in den *dik6*-Locus verwendet und erlaubt die Expression eines *Dik6::eGFP*-Fusionsprotein.

### pMV10

In den mit *Acc*65I und *Not*I geöffneten Vektor p123 wurde ein 4.735 bp *Acc*65I/*Not*I-Fragment aus pMV8 inseriert. Dieses Plasmid enthält ein *dik6-cgfp* Fusionskonstrukt, das unter der Kontrolle des *dik6*-Promotors steht, und in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert werden kann.

### pMV9

In den mit *Acc*65I und *Not*I geöffneten Vektor p123 wurde ein 4.760 bp *Acc*65I/*Not*I-Fragment aus pMV5 inseriert. Dieses Plasmid enthält ein *dkh6-ygfp* Fusionskonstrukt, das unter der Kontrolle des *dkh6*-Promotors steht, und in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert wurde.

### pGE220

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 1.034 bp *Nco*I/*Nde*I-Fragment aus po2tef-egfp-kpp4-Hyg(-) und ein 1.692 bp *Nde*I/*Not*I-Fragment aus pGE166 in den mit *Nco*I und *Not*I geöffneten Vektor p123 inseriert. Auf diese Weise wurde das *egfp*-Gen an den *drf1*-ORF anfusioniert. Verwendet zur Integration in den *ip*-Locus von *U. maydis*.

## **Plasmide für das Hefe Ein-Hybrid System**

### **pOHdik6**

Ein 340 bp *MscI/HindIII*-Fragment aus pGE115, dessen überhängendes Ende aufgefüllt worden war, wurde in den mit *SmaI* geöffneten Vektor pOH eingesetzt.

### **pOHdkh6**

Ein 307 bp *Eco47III/HindIII*-Fragment aus pGE181, dessen überhängendes Ende aufgefüllt worden war, wurde in den mit *SmaI* geöffneten Vektor pOH eingesetzt.

### **pOHlga2wt**

Ein 241 bp *NcoI/XhoI*-Fragment aus plga2sgfp, dessen überhängende Enden aufgefüllt worden war, wurde in den mit *SmaI* geöffneten Vektor pOH eingesetzt.

### **pOHlga2mut**

Ein 241 bp *NcoI/XhoI*-Fragment aus plga2sgfpmut, dessen überhängendes Ende aufgefüllt worden war, wurde in den mit *SmaI* geöffneten Vektor pOH eingesetzt.

## **Plasmide für die dik6-Promotordeletionsanalyse**

### **pTH0**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 2.457 bp *EcoRV/NdeI*-Fragment aus pGE114, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Das so entstandene Konstrukt wurde anschließend mit *AgeI* und *FspI* geöffnet und das 2.290 bp *AgeI/FspI*-Fragment aus pTHxx inseriert. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

### **pTH2**

Aus pGE115 wurde das *sgfp*-Gen und der *nos*-Terminator als 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment und ein 1.900 bp *PstI/NdeI dik6*-Promotorfragment ausgeschnitten. Diese beiden Fragmente wurden in das mit *SbfI* und *EcoRI* geöffnete Plasmid pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

### **pTH3**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 1.644 bp *HincII/NdeI*-Fragment aus pGE115, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Das so entstandene Konstrukt wurde anschließend mit *AgeI* und *FspI* geöffnet und das 2.290 bp *AgeI/FspI*-Fragment aus pTHxx inseriert. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

### **pTH4**

Aus pGE115 wurde das *sgfp*-Gen und der *nos*-Terminator als 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment und ein 1.384 bp *NheI/NdeI dik6*-Promotorfragment ausgeschnitten. Diese beiden Fragmente wurden in das mit *XbaI* und *EcoRI* geöffnete Plasmid pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

### **pTH5**

Aus pGE115 wurde das *sgfp*-Gen und der *nos*-Terminator als 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment und ein 1.083 bp *MluI/NdeI dik6*-Promotorfragment ausgeschnitten. Diese beiden Fragmente wurden in das mit *AscI* und *EcoRI* geöffnete Plasmid pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

### **pTH6**

Aus pGE115 wurde das *sgfp*-Gen und der *nos*-Terminator als 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment und ein 814 bp *BcII/NdeI dik6*-Promotorfragment ausgeschnitten. Diese beiden Fragmente wurden in das mit *BamHI* und *EcoRI* geöffnete Plasmid pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

### **pTH7**

Aus pGE115 wurde das *sgfp*-Gen und der *nos*-Terminator als 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment und ein 637 bp *MscI/NdeI dik6*-Promotorfragment ausgeschnitten. Diese beiden Fragmente wurden in das mit *PmeI* und *EcoRI* geöffnete Plasmid pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH8**

Aus pGE115 wurde das *sgfp*-Gen und der *nos*-Terminator als 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment und ein 296 bp *HindIII/NdeI dik6*-Promotorfragment ausgeschnitten. Diese beiden Fragmente wurden in das mit *HindIII* und *EcoRI* geöffnete Plasmid pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH9**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 198 bp *HaeIII/NdeI*-Fragment aus pGE115, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Das so entstandene Konstrukt wurde anschließend mit *AgeI* und *FspI* geöffnet und das 2.290 bp *AgeI/FspI*-Fragment aus pTHxx inseriert. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH29**

Aus dem 1.384 bp *NheI/NdeI dik6*-Promotorfragment in pTH4 sollte der 269 bp große Bereich zwischen der *MluI*- und der *BclI*-Schnittstelle deletiert werden. Dazu wurde ein 309 bp großes *SbfI/MluI*-Fragment und ein 1.667 bp *BclI/NsiI*-Fragment aus pTH4 isoliert. Die Schnittstellen von *MluI* und *BclI* wurden aufgefüllt. Anschließend wurden die beiden Fragmente in das mit *SbfI* und *NsiI* geöffnete Plasmid pTH4 eingefügt. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH30**

Äquivalent wie zur Herstellung von pTH29 wurde aus pTH4 das 177 bp große *BclI/MscI*-Fragment entfernt. Dazu wurde ein 578 bp *SbfI/BclI*-Fragment und ein 1.490 bp *MscI/NsiI*-Fragment aus pTH4 isoliert, die *BclI*-Schnittstelle aufgefüllt und beide Fragmente in das mit *SbfI* und *NsiI* geöffnete Plasmid pTH4 inseriert. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH31**

Dieses Plasmid entstand durch Deletion des 446 bp *MluI/MscI*-Fragments in pTH4. Dazu wurde pTH4 mit *MluI* und *MscI* geschnitten, die *MluI*-Schnittstelle aufgefüllt und der Vektor religiert. Dieses Plasmid ist freireplizierend in *U. maydis* und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH11**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 2.457 bp *EcoRV/NdeI*-Fragment aus pGE114, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Dieses Plasmid wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH13**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 1.906 bp *PstI/NdeI*-Fragment aus pGE115, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Das überhängende Ende der *PstI*-Schnittstelle wurde abgedaut. Dieses Plasmid wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH15**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 1.386 bp *NheI/NdeI*-Fragment aus pGE115, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Das überhängende Ende der *NheI*-Schnittstelle wurde aufgefüllt. Dieses Plasmid wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

**pTH16**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 1.089 bp *MluI/NdeI*-Fragment aus pGE115, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Das überhängende Ende der *MluI*-Schnittstelle wurde abgedaut. Dieses Plasmid wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

#### **pTH17**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 816 bp *BclII/NdeI*-Fragment aus pGE115, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Das überhängende Ende der *BclII*-Schnittstelle wurde aufgefüllt. Dieses Plasmid wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

#### **pTH18**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 638 bp *MscI/NdeI*-Fragment aus pGE115, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Dieses Plasmid wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

#### **pTH19**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde das 1.035 bp *HpaI/NdeI*-Fragment, das den *nar1*-Promotor enthält, in pRU4 durch ein 298 bp *HindIII/NdeI*-Fragment aus pGE115, das den *dik6*-Promotor enthält, ersetzt. Das überhängende Ende der *HindIII*-Schnittstelle wurde aufgefüllt. Dieses Plasmid wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert und wurde für *dik6*-Promotordeletionsstudien verwendet.

### ***Plasmide für die dkh6-Promotordeletionsanalyse***

#### **pGE191**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW101 und uni24 generiertes 2.370 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *dkh6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das *dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

#### **pGE192**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW102 und uni24 generiertes 2.038 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen

und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *dkh6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das *dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

#### **pGE193**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW103 und uni24 generiertes 1.724 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *dkh6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das *dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

#### **pGE194**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW104 und uni24 generiertes 1.436 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *dkh6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das *dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

#### **pGE195**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW105 und uni24 generiertes 1.154 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *dkh6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das *dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

**pGE196**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW106 und uni24 generiertes 848 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *d k h 6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das *dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

**pGE197**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW107 und uni24 generiertes 543 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *d k h 6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das *dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

**pGE198**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW108 und uni24 generiertes 351 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *d k h 6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das *dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

**pGE199**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde ein mit den Oligonukleotiden OGW109 und uni24 generiertes 149 bp *NdeI/XbaI-dkh6*-Promotorfragment und ein 1.013 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment, das das *sgfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pNEBUC eingefügt. Dieses Plasmid ist zur freien Replikation in *U. maydis* befähigt und wurde für *dkh6*-Promotordeletionsstudien verwendet, indem das

*dkh6*-Promotorfragment transkriptionell mit dem *sgfp*-Gen als Reporter fusioniert wurde.

**Plasmide aus der cDNA-Bibliothek****pcDNA4-2-5**

Reisoliertes Plasmid, das 3 cDNA-Sequenzen als *SfiI*-Fragmente in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11).

**pcDNA5-2-5**

Reisoliertes Plasmid, das 1 cDNA-Sequenz als *SfiI*-Fragment in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11). Dieses Plasmid enthält eine 1.726 bp Voll-Länge cDNA von *drf1*.

**pcDNA5-3-1A**

Reisoliertes Plasmid, das 2 cDNA-Sequenzen als *SfiI*-Fragmente in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11).

**pcDNA5-3-1B**

Reisoliertes Plasmid, das 1 cDNA-Sequenz als *SfiI*-Fragment in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11).

**pcDNA5-4-2A**

Reisoliertes Plasmid, das 1 cDNA-Sequenz als *SfiI*-Fragment in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11)

**pcDNA5-4-2B**

Reisoliertes Plasmid, das 2 cDNA-Sequenzen als *SfiI*-Fragmente in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11)

**pcDNA5-5-5A**

Reisoliertes Plasmid, das 1 cDNA-Sequenz als *SfiI*-Fragment in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11)

**pcDNA5-5-5B**

Reisoliertes Plasmid, das 2 cDNA-Sequenzen als *SfiI*-Fragmente in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11)

**pcDNA5-6-5A**

Reisoliertes Plasmid, das 1 cDNA-Sequenz als *SfiI*-Fragment in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe

Tabelle 10 und 11). Dieses Plasmid enthält eine 1.726 bp Voll-Länge cDNA von *df1*.

#### **pcDNA5-6-5B**

Reisoliertes Plasmid, das 1 cDNA-Sequenz als *SfiI*-Fragment in dem Plasmid pGE101 enthält (siehe Tabelle 10 und 11)

#### **pGE155**

Enthält das erste von drei cDNA-Fragmenten aus pcDNA4-2-5, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

#### **pGE156**

Enthält das zweite von drei cDNA-Fragmenten aus pcDNA4-2-5, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

#### **pGE157**

Enthält das dritte von drei cDNA-Fragmenten aus pcDNA4-2-5, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

#### **pGE158**

Enthält das erste von zwei cDNA-Fragmenten aus pcDNA5-3-1A, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

#### **pGE159**

Enthält das zweite von zwei cDNA-Fragmenten aus pcDNA5-3-1A, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

#### **pGE160**

Enthält das erste von zwei cDNA-Fragmenten aus pcDNA5-4-2B, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

#### **pGE161**

Enthält das zweite von zwei cDNA-Fragmenten aus pcDNA5-4-2B, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

#### **pGE162**

Enthält das erste von zwei cDNA-Fragmenten aus pcDNA5-5-5B, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

#### **pGE163**

Enthält das zweite von zwei cDNA-Fragmenten aus pcDNA5-5-5B, das als *SfiI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von pGE101 inseriert wurde. Wurde zur Transformation in *U. maydis* und zur Sequenzierung des enthaltenen cDNA-Fragments verwendet (siehe Tabelle 10 und 11).

### ***Weitere Plasmide***

#### **pGE93**

Enthält ein ca. 700 bp PCR-Amplifikat, das mit Hilfe der Oligonukleotide OAN34 und OGW27 bei der Durchführung des LA 5'-RACE Versuchs erzeugt wurde. Das in den Vektor pCR-Topo inserierte Fragment enthält ca. 600 bp des *dik6* ORFs und 101 bp 5'-untranslatierte Region.

#### **pGE96**

Enthält ein ca. 700 bp PCR-Amplifikat, das mit Hilfe der Oligonukleotide OAN34 und OGW27 bei der Durchführung des LA 5'-RACE Versuchs erzeugt wurde. Das in den Vektor pCR-Topo inserierte Fragment enthält ca. 600 bp des *dik6* ORFs und 101 bp 5'-untranslatierte Region.



**pGE101**

Dieses Plasmid wurde in mehreren Schritten hergestellt. Zunächst wurde ein mit PCR und den Oligonukleotiden OGW2 und OGW3 erzeugtes 384 bp *NsiI/SalI*-Fragment aus dem 3'-untranslatierten Bereich des *mfa2*-Gens in das mit *XhoI* und *PstI* geöffnete Plasmid pSP72 inseriert, um pGE18 herzustellen. In das mit *SspI* geöffnete Plasmid pGE18 wurde ein 482 bp *SspI/HindIII*-Fragment aus pGE32, das die mit den Oligonukleotiden OGW4 und OGW5 amplifizierte UARS enthält, eingefügt, um pGE41 zu erzeugen. Zuvor wurde das überhängende Ende der *HindIII*-Schnittstelle aufgefüllt. Anschließend wurde pGE41 mit *HpaI* geöffnet und ein 1.544 bp *PvuII*-Fragment eingefügt, das die Hygromycin-Resistenzkassette aus pGE25 enthält, und in die *EcoRV*- und *EcoRI*-Schnittstellen des resultierenden Plasmids pGE42 ein 1.168 bp *HindIII/EcoRI*-Fragment aus pGE47 zu inserieren. Dieses Fragment enthält den am 3'-Ende mit einer *NotI* versehenen *hsp70*-Promotor aus pCM54. Im nächsten Schritt wurde das resultierende Plasmid pGE56 mit *SfiI* geöffnet, die überhängenden Enden abgedaut und wieder religiert, um die im Vektor-Rückgrat vorhandene *SfiI*-Schnittstelle zu deletieren. Für die Herstellung von pGE101 wurde ein 899 bp *EcoRI/SalI*-Fragment, das mittels PCR und den Oligonukleotiden OGW42 und OGW43 generiert wurde, und den ORF des bakteriellen *gfp*-Gens enthält (R. Schneider, pers. Mitteilung), in die entsprechenden Schnittstellen von pGE99 eingefügt. Durch diesen Schritt wurden gleichzeitig zwei asymmetrische *SfiI*-Schnittstellen eingeführt, die für die gerichtete Klonierung von cDNA-Fragmenten bei der Herstellung der freireplizierenden cDNA-Bibliothek verwendet wurden.

**pGE108**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 1.056 bp *BamHI/EcoRV*-Fragment aus p123, das das *egfp*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, in den mit *BamHI* und *SmaI* geöffneten Vektor pGE 40 inseriert. Dieses Plasmid wurde für Komplementationsversuche von *U. maydis*-Stämmen verwendet, die eine Deletion des *pyr6*-Gens aufweisen.

**pGE118**

In das mit *XbaI* und *BamHI* geöffnete Plasmid pGE72 wurde ein 8.667 bp *SpeI/ScaI*-Fragment aus pGE117 zusammen mit einem 801 bp *ScaI/BamHI*-Fragment aus pJBbW2 eingefügt. Dieses Plasmid kann in *U. maydis* freireplizieren und erlaubt die regulierte Expression von *bW1* und *bE2*.

**pGE135**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 78 bp PCR-Amplifikat aus pCRbbs76 in den mit *EcoRV* und *PvuII* geöffneten Vektor pSP72 inseriert. Für die Amplifikation wurden die Oligonukleotide R und F verwendet. Dieses Plasmid diente als Matrize für PCR-Amplifikate, die für Gelretardationsversuche verwendet wurden. Zur Vervielfältigung wurden wiederum die Oligonukleotide F und R benutzt.

**pGE136**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurden die beiden zueinander komplementären Oligonukleotide OGW58 und OGW59 in den mit *EcoRI* und *BamHI* geöffneten Vektor pGE135 eingefügt. Die Oligonukleotide umfassen eine 26 bp große *bbs* im *dik6*-Promotor. Dieses Plasmid diente als Matrize für PCR-Amplifikate, die für Gelretardationsversuche verwendet wurden. Zur Vervielfältigung wurden die Oligonukleotide F und R benutzt.

**pGE137**

Zur Herstellung dieses Plasmids wurden die beiden zueinander komplementären Oligonukleotide OGW60 und OGW61 in den mit *EcoRI* und *BamHI* geöffneten Vektor pGE135 eingefügt. Die Oligonukleotide umfassen eine 26 bp große *bbs* im *dik6*-Promotor, in der drei G zu A Transitionen eingefügt wurden. Dieses Plasmid diente als Matrize für PCR-Amplifikate, die für Gelretardationsversuche verwendet wurden. Zur Vervielfältigung wurden die Oligonukleotide F und R benutzt.

**pGE138**

Für dieses Konstrukt wurde ein 163 bp großes PCR-Amplifikat aus dem *dik6*-Promotor in das Plasmid pCR-Topo eingefügt. Für die Amplifikation wurden die Oligonukleotide OGW62 und OGW65 verwendet. Dieses Plasmid diente als Matrize für PCR-Amplifikate, die für DNaseI-Schutzversuche verwendet wurden.

#### **pGE170**

Enthält ein 1.141 bp PCR-Amplifikat, das mit Hilfe der Oligonukleotide OGW56 und OGW75 aus der freireplizierenden cDNA-Bibliothek amplifiziert wurde. Das in den Vektor pCR-Topo inserierte Fragment enthält 700 bp des *dkh6* ORFs und 441 bp 5'-untranslatierte Region.

#### **pGE173**

Um die *NcoI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt des *cgfp*-Gens gegen eine *NdeI*-Schnittstelle auszutauschen, wurde eine PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden OGW91 und OGW92 durchgeführt. Das erzeugte 724 bp PCR-Amplifikat wurde in pCR-Topo inseriert.

#### **pGE174**

Um die *NcoI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt des *ygfp*-Gens gegen eine *NdeI*-Schnittstelle auszutauschen wurde eine PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden OGW91 und OGW92 durchgeführt. Das erzeugte 724 bp PCR-Amplifikat wurde in pCR-Topo inseriert.

#### **pScosUARSHyg**

In den mit *AatII* und *BsaI* geöffneten Vektor pScos1 wurde ein 1.234 bp *AatII/BsaI*-Fragment aus pGE72 eingefügt, um anschließend in die *AvrII*- und *SmaI*-Schnittstellen des resultierenden Plasmids pScosUARS ein 2.577 bp *AvrII/XbaI*-Fragment aus pSL-Hyg(+) zu inserieren. Zuvor wurde das überhängende Ende der *XbaI*-Schnittstelle aufgefüllt. Auf diese Weise wurde die Hygromycin-Resistenzkassette eingebracht, und so daraus das Plasmid pScosUARSHyg hervorging. Dieses Plasmid wurde für die Herstellung der freireplizierenden *U. maydis* Cosmid-Bibliothek verwendet.

#### **Konstruktion einer freireplizierenden, genomischen Cosmid-Bibliothek**

Für die Komplementation von UV-Mutanten wurde eine freireplizierende genomische Cosmid-Bibliothek hergestellt. Die Vorgehensweise richtete sich dabei nach dem Protokoll des SuperCos I Cosmid Vector Kits (Stratagene). Dazu wurde aus dem *U. maydis* Stamm 521 (*a1b1*) hochmolekulare DNA isoliert, über Microspin S-300 Säulchen gereinigt, und mit 4 – 6 U *Sau3AI* für 1 h bei 37°C inkubiert, so dass 35 – 45 kb große Fragmente entstehen, die nach

Dephosphorylierung mit den *BamHI/XbaI* geschnittenen Armen des Cosmid-Vektor pScosUARSHyg ligiert wurden. Die Isolierung von Plasmid-DNA des Vektors pScosUARSHyg erfolgte mit Hilfe des Large-Construct Kits (Qiagen). Anschließend wurde der Ligationsansatz mit Hilfe des Gigapack® III Gold Packaging Kits (Stratagene) in  $\lambda$ -Phagenköpfe verpackt. Im Anschluss an die Verpackung in  $\lambda$ -Phagen erfolgte eine Titration der Cosmidgenbank in *E. coli* XL1-Blue MRA-Zellen auf YT-Agarplatten unter Selektion auf Ampicillin-Resistenz. Insgesamt wurden 3.840 unabhängige *E. coli* Kolonien erzeugt, die in 40 Mikrotiterplatten zu je 96 Klonen geordnet wurden. Diese Klonzahl reicht bei einer Genomgröße von 20 Mbp und einer durchschnittlichen Länge der Cosmid-DNA-Fragmente von 40 kb theoretisch aus, um ein gesuchtes Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,999 finden zu können (Clarke und Carbon, 1976). Anschließend wurde die erstellte Cosmid-Bibliothek mittels Isolierung und Restriktionsverdau von Cosmiden einzelner, zufällig ausgewählter Klone, auf ihre Repräsentativität hin überprüft.

#### **Konstruktion einer freireplizierenden, cDNA-Expressions-Bibliothek**

Für die Suche nach b-unabhängigen Aktivatoren der *dik6*-Expression wurde eine freireplizierende cDNA-Expressions-Bibliothek hergestellt. Die Vorgehensweise erfolgte dabei in Anlehnung an das Protokoll des SMART™ cDNA Library Construction Kits (Clontech). Dazu wurde RNA aus Pilzmaterial einer Mischung der kompatiblen Wildtyp-Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) nach 12, 24 und 48 h Inkubation bei 28°C auf Aktivkohle-haltigen CM-Platten nach der alkalischen Phenol-Methode isoliert. Die Inkubation mit RNase freier DnaseI erfolgte nach dem Protokoll von Basse *et al.*, (2000), um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Anschließend wurde mit Hilfe des Oligotex mRNA Midi Kits polyA<sup>+</sup> RNA angereichert. Zur cDNA Synthese wurden 2 µg mRNA mit 100 pmol OGW44 und 100 pmol OGW45 in einem Volumen von 50 µl für 2 min bei 72°C denaturiert und anschließend direkt auf Eis gegeben. OGW45 ist so konzipiert, dass das Oligonukleotid am Übergang zwischen dem 3'-untranslatierten Bereich und dem polyA-Schwanz eines mRNA-Moleküls binden kann, wodurch neu synthetisierte cDNA-Moleküle theoretisch nur 16 Thymin-Reste an ihren

3'-Enden aufweisen. zudem führt OGW45 eine *Sfi*I-Schnittstelle ein. OGW44 kann mittels 3 Guanosin-Resten an Cytosin-Reste binden, die die Reverse Transkriptase beim Erreichen des 5'-Endes eines mRNA-Moleküls anhängt, wodurch das Enzym seine Matrize wechseln kann und den Minus-cDNA-Strang verlängert, so dass eine spezifische Bindestelle für das Oligonukleotid OGW40 erzeugt wird, das zur Synthese des Plus-cDNA-Stranges eingesetzt wurde.

Nach Zugabe von 20 µl RT-Puffer (5x, Gibco), 10 µl 20 mM DTT und 10 µl 10 mM dNTPs wurde der Ansatz für 10 min bei RT und anschließend für 2 min bei 42°C inkubiert, 2000 U Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco) zugegeben (10 µl), und die Reaktion für 90 min bei 42°C durchgeführt. Danach wurde die Reaktion für 15 min bei 50°C inkubiert, ehe die Reverse Transkriptase 10 min bei 70°C inaktiviert und der Reaktionsansatz mit 1 µl 25 mM NaOH für 30 min bei 68°C inkubiert wurde, um RNA-Moleküle zu hydrolysieren. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes mit 20 µCi α-32P dATP inkubiert, um nach Auftrennung des Gemisches auf einem alkalischen 1% Agarosegel die Erststrangsynthese qualitativ beurteilen zu können. Für die Zweitstrangsynthesen wurden 3 µl der Erststrangreaktion, 20 pmol OGW45, 20 pmol OGW40, 10 µl cDNA PCR-Puffer (10x, Clontech), 2 µl dNTP-Lösung (50x, Clontech) und 2 µl Advantage cDNA Polymerase Mix (50x, Clontech) in einem Volumen von 100 µl eingesetzt.

Es wurden folgende PCR-Bedingungen angewendet (zur Schreibweise siehe Abschnitt 4.3.4):

94/1-[94/0,25-60/0,5-68/6]x5-68/10

Zur Kontrolle wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes mit 20 µCi α-32P dATP inkubiert, um nach Auftrennung des Gemisches auf einem alkalischen 1% Agarosegel die Zweistrangsynthese qualitativ beurteilen zu können.

Anschließend wurde der Ansatz mit 40 µg Proteinase K für 20 min bei 45°C inkubiert, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform pH 8.0 extrahiert und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, 26 µg Glycogen (Roche) und 2,5 Volumen Ethanol bei RT präzipitiert. Das Pellet wurde in 70 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> aufgenommen, mit 10 µl Puffer 3 (10x, NEB), 10 µg BSA und 100 U *Sfi*I in 100 µl für 3 h bei 50°C inkubiert, ehe der Ansatz auf einem 1% Agarosegel zur Größenfraktionierung aufgetrennt wurde. Letztendlich wurden die ds-cDNA-Moleküle der Größe nach in 9 Fraktionen aufgeteilt und in das mit *Sfi*I geöffnete Plasmid pGE101 ligiert, wobei die Vektormoleküle in einem 10 fachen molaren Überschuss zugegeben wurden. Die Ligationsansätze wurden in elektrokompente *E. coli* XL1-Blue Zellen (Stratagene) transformiert. Daraus resultierten etwa 1,6 x 10<sup>6</sup> unabhängige Klone.

## 4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 *Escherichia coli*

#### Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

#### Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.* (1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformations-Ansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10<sup>6</sup> Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

#### RF1-Lösung:

100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
30 mM K-Acetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und  
sterilfiltrieren

#### RF2-Lösung:

10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und  
sterilfiltrieren

## Elektroporations-Transformation von *E. coli*

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,7 geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 0°C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert (300 Upm, 15 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wurde in 500 ml kaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem Wasser (250 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 0,5 bis 1 ml kaltem 10%igem Glycerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40  $\mu$ l Zellsuspension wurden mit bis zu 5  $\mu$ l DNA aus einem Ligationsansatz gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulser gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF, 2,5 kV, 200 W). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 ml SOC-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf YT-Amp-Platten ausgestrichen.

### 4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

#### Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten

Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

#### Bestimmung der Zelldichte bei *S. cerevisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

#### Transformation von *S. cerevisiae*

Dieses Protokoll ist geringfügig modifiziert nach Sherman *et al.*, (1986). Von einem Verdünnungsausstrich auf YEPD-Platten ausgehend, wurden 20 ml YEPD-Medium inokuliert und bis zu einer schwach rötlichen Färbung der Flüssigkultur bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Vorkultur wurde 1:200 in 200 ml YEPD-Medium verdünnt und über Nacht bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Um die Zellen zu ernten, wurde die Kultur auf 50 ml Greiner-Röhrchen verteilt und bei 3000 Upm in einer Heraeus-Zentrifuge bei RT pelletiert. Die Zellen wurden mit 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gewaschen, anschließend in einer frisch hergestellten Lithiumacetat/TE-Lösung aufgenommen und darin nochmals gewaschen. Die pelletierten Zellen werden daraufhin in 500  $\mu$ l Lithiumacetat/TE-Lösung aufgenommen und zu 50  $\mu$ l aliquotiert. Es wurde zu den Aliquots 10  $\mu$ l Herings/Lachs-Sperma-DNA und 0,1-1  $\mu$ g Plasmid-DNA zugegeben, kräftig gemischt und 5-7 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach werden die Suspensionen mit 300  $\mu$ l Lithiumacetat/PEG versetzt und für 15 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 36  $\mu$ l DMSO werden die Zellen bei 30°C für 15 Minuten weiterinkubiert, ehe für 15 Minuten bei 42°C ein Hitzeschock folgt. Die Zellen werden zweimal mit 1 ml YEPD-Medium gewaschen, in 200  $\mu$ l YEPD-Medium aufgenommen und auf die entsprechenden Platten ausgestrichen.

Lithiumacetat/TE:

100 mM Lithiumacetat  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

Lithiumacetat/PEG:

100 mM Lithiumacetat  
40% PEG4000  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

Herings/Lachs-Sperma-DNA:

10 mg/ml Herings/Lachs-Sperma-DNA  
in TE-Puffer, ultraschallt und gekocht

### **lacZ-Filtertest von *S. cerevisiae***

Dieses Protokoll ist geringfügig verändert nach Hardy *et al.*, (1992). X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-galaktosid) ist ein Substratanalogon für β-Galaktosidase, die vom *lacZ*-Gen kodiert wird. Das Enzym hydrolysiert das Zuckerderivat und durch Luftoxidation entsteht als Reaktionsprodukt ein schwer löslicher, blauer Indigofarbstoff. Der *in vivo* Nachweis ist so empfindlich, dass selbst wenige Molekül des Enzyms pro Zelle nachgewiesen werden kann. Um die bei einer Transformation erhaltenen Hefe-Transformanten auf β-Galaktosidaseaktivität testen zu können, wurden die Kolonien von einer Transformationsplatte auf entsprechende Selektions-Platten ausgestrichen und für 48-72 Stunden bei 28°C inkubiert. Als Kohlenstoffquelle dient Raffinose, um das bekannte Phänomen der Repression der β-Galaktosidase Expression durch

### **Kultivierung von *U. maydis***

*U. maydis*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtkulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Glukose zu vermeiden. Die Hefezellen wurden durch das Auflegen eines Nitrocellulose-Filters (Schleicher & Schüll BA 85) auf diesen transferiert, für etwa 1 Minute in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend auf einem Papierfilter (Schleicher & Schüll 595), der mit 1,5 ml Z-Puffer/X-Gal getränkt war, im Deckel einer Petrischale aufgetaut. Die Petrischalen werden eingedeckelt und mit Parafilm verschlossen. Die Filter werden für 2-48 Stunden bei 37°C inkubiert. Auch nach 4tägiger Inkubation bei 37°C ließ sich bei Transformanten, die keine β-Galaktosidaseaktivität besitzen, keine β-Galaktosidaseaktivität im *lacZ*-Filtertest nachweisen.

X-Gal-Lösung:

2 % X-Gal  
in Dimethylformamid lösen

Z-Puffer:

100 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.0  
1 mM MgSO<sub>4</sub>  
10 mM KCl

Z-Puffer/X-Gal:

Z-Puffer  
frisch zugeben:  
5 µl/ml 10% SDS  
3,5 µl/ml 2% X-Gal-Lösung

### **4.2.3 *Ustilago maydis***

#### **Induktion von Stämmen**

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *nar1*-Promotors Ammoniumionen als einzige Stickstoffquelle, im Fall des *crg1*-Promotors Glucose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 29°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert. Nach nochmaliger Pelletierung (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in Flüssigmedium resuspendiert, das induzierende Bedingungen bot (im Fall des *nar1*-

Promotors Nitrationen als einzige Stickstoffquelle, im Fall des *crg1*-Promotors Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle). Die Kulturen wurden bei 29°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit geschüttelt. Bei der Zellernte wurden die Kulturen schnell auf 0°C heruntergekühlt und die weiteren Schritte auf Eis bzw. die Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt.

Bei Induktion auf Festmedien wurde die Vorkultur unter reprimierenden Bedingungen durchgeführt.

### Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

### Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS<sub>L</sub>-Medium verdünnt und bei 29°C bis zu einer Zelldichte von 1-2 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml (bis maximal OD<sub>600</sub> = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10 minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem

Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit freireplizierenden Plasmiden werden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl zirkulärer Plasmid-DNA (ca. 0,5-3 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert. Die Stämme wurden vor weiteren Experimenten insgesamt dreimal vereinzelt.

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

STC:

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

STC/PEG:

15 ml STC  
10 g PEG4000

### Kreuzungsversuche bzw. Test auf filamentöses Wachstum

*U. maydis*-Stämme wurden von Platte in YEPS-Flüssigmedium inokuliert. Bei 29°C wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 7 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> so

aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa  $OD_{600} = 5,0$  lag. Bei Kreuzungen wurde gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3  $\mu$ l auf eine PD-CC-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 h bei 21°C unter Luftabschluss inkubiert. Anschließend wurde der Kreuzungsversuch anhand der Filamentbildung ausgewertet.

### Test auf Pathogenität

Die Einzelheiten der beiden verwendeten Pathogenitätstests, Spritz- und Tropfinfektion, sind in Abschnitt 2.4.4 ausführlich erklärt. Etwa 14 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Tumore lichtmikroskopisch auf Sporenbildung untersucht.

### Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5%igen  $CuSO_4$ -Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit  $H_2O_{bid}$  gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf YEPS<sub>L</sub>-Platten ausplattiert, denen Chloramphenicol, Kanamycin und Tetracyclin zugesetzt war, um bakterielle Kontaminationen zu entfernen. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden zweimal vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6b (*a1 b2*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt. Als Schnelltest zum Nachweis für erfolgreiche Meiose können die aus einer Spore entstandenen Kolonien auch direkt auf PD-CC Festmedium vereinzelt werden. Bereiche mit hoher Koloniedichte müssen filamentös erscheinen, dicht nebeneinander liegende Kolonien in der Hälfte der Fälle an der Kontaktstelle Filamentbildung zeigen, in der anderen Hälfte der Fälle dagegen nicht, und einzeln liegende Kolonien müssen eine glatte Koloniemorphologie aufweisen.

### Test auf filamentöses Wachstum auf der Maispflanze

Zur Untersuchung des filamentösen Wachstums auf der Maispflanze und der Ausbildung von

Appressorien-ähnlichen Infektionsstrukturen wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Nach 24 und 48 h wurde dann ein Stück von der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, ausgeschnitten und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten. Die Blattstücke wurden 1 min in eine FungiFluor™-Färbelösung (Sigma) gelegt und danach zweimal mit Wasser gewaschen. Die Präparate wurden anschließend in einem Tropfen Wasser unter UV-Licht im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) untersucht. Zur mikroskopischen Beobachtung von *U. maydis* Zellen während des biotrophen Wachstums wurden 0,5 cm<sup>2</sup> große Quadrate aus Maisblättern 1, 2, 4 und 6 Tage nach der Infektion unweit der Infektionsstelle entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine nekrotischen Bereiche mitausgeschnitten wurden, da ansonsten bei der UV-Lichtmikroskopie Hintergrundfluoreszenz auftreten kann. Anschließend wurden mit einer Rasierklinge händisch Querschnitte des entnommenen Blattstückes angefertigt und für die Analyse Stellen ausgewählt, die etwa 3 bis 6 Zellschichten dick waren.

### Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. 8  $\mu$ l der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft. Für die Betrachtung und photographische Dokumentation sind Zelldichten von etwa  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml ideal, die Kulturen sollten entsprechend verdünnt werden. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm; sGFP und eGFP, 450-490 nm und 515-565 nm; YGFP, 500-520 nm und 535-550 nm; CGFP, 390-420 nm und >450 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen PHOTOSHOP 6.0 (Adobe) und CANVAS 7.0 (Deneba) abgespeichert.



## Test auf EGI-Aktivität

Das Protokoll wurde modifiziert nach Schauwecker *et al.*, (1995). Um Endoglukanase-Aktivität in *U. maydis* Zellen nachzuweisen, wurden 3 µl einer in YEPS<sub>L</sub>-Medium inokulierten Übernachtskultur auf CMC-platten getropft und 18 bis 24 h bei 28°C inkubiert. Sichtbare *U. maydis* Kolonien wurden auf der Plattenunterseite mit einem Stift markiert. Die Platten wurden anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> abgespült und kurz getrocknet. Um den Carboxymethylcellulose-Abbau sichtbar zu machen, wurden 20 ml einer 1% Kongo-Rot-Lösung auf die Platten gegeben und 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach Entfernung des überschüssigen Farbreagens wurde mehrmals mit einer 1 M NaCl-Lösung entfärbt. Endoglukanase-Aktivität konnte als gelblicher Hof (sog. Halo) detektiert werden.

1 % (w/v) Kongo-Rot-Lösung:  
10 mg/ml Kongorot  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> lösen

1 M NaCl-Lösung  
58,4 g NaCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> lösen

## UV-Mutagenese

Für die Isolierung von negativ regulatorischen Faktoren der *dik6*-Expression wurde eine UV-Mutagenese durchgeführt. Vorversuche mit *U. maydis* Zellen aus der exponentiellen und stationären Phase haben gezeigt, dass exponentiell wachsende Zellen gegenüber UV-Behandlung unempfindlicher sind. Für die Mutagenese wurden daher Zellen aus der frühen stationären Phase verwendet. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass möglichst alle Zellen nach UV-Bestrahlung Mutationen tragen, wurden die Energiemenge und die Bestrahlungszeit so gewählt, dass die Überlebensraten bei 0,1-1% lagen. Für die UV-Mutagenese wurde der Stamm GE95 (*a2b1Δdik1:egfp*, *Δdik6:pyr6*, *Δpyr6*) bis OD<sub>600</sub> ≈ 0,8 in PD-Medium, dem 100 µg/ml Cytidin zugesetzt worden waren, angezogen, pelletiert und mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen. Die Gesamtzellzahl der Kulturen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 2,5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml eingestellt. Jeweils 400 µl der

Zellsuspension auf 100 rechteckige PD-Platten ausplattiert. Anschließend wurden die mit 1 x 10<sup>7</sup> Zellen inokulierten PD-Platten in einem UV Stratalinker® 1800 (Stratagene) mit 23-25 mJ/cm<sup>2</sup> (Wellenlänge der UV-Lampen: 254 nm) bestrahlt und für 72 h bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle wurden 1 x 10<sup>10</sup> nicht-mutagenisierte Zellen auf eine rechteckige PD-Platte ausgestrichen.

## Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 10%iger Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1% direkt zum Medium fixiert. Nach 30 min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert. Filamentöse Zellen erforderten zur Pelletierung längere Zentrifugation bei höheren Drehzahlen.

## DAPI-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf ein mit Polylysin beschichtetes Deckglas gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten für kurze Zeit in eine Petrischale mit PBS gelegt (Waschschritt). Das Deckglas wurde abgetropft, so dass ca. 10 µl am Deckglas verblieben. 10 µl einer DAPI-Lösung (Sigma D-9542) wurden in eine Petrischale mit 10 ml PBS gegeben, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt (10 min in PBS) wurde das Deckglas abgetropft und auf einen Objektträger gelegt. Das Präparat wurde mit VALAP versiegelt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

VALAP:

- 33% (w/w) Vaseline
- 33% (w/w) Lanolin
- 33% (w/w) Paraffin

## 4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z. B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989) sind in Brachmann (1995) ausführlicher beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger

DNA, 33  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA, bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$ . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

### 4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300  $\mu\text{l}$  STET resuspendiert, nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40  $\mu\text{l}$  3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400  $\mu\text{l}$  Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 200  $\mu\text{l}$  TE-Puffer mit 20  $\mu\text{g/ml}$  RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA zu isolieren.

STET:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0  
50 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
8% (w/v) Saccharose  
5% (v/v) Triton X-100  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym  
10 mM Tris-Cl, pH 8,0  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

#### DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  *Ustilago*-Lysispuffer und 400  $\mu\text{l}$  TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400  $\mu\text{l}$  des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50  $\mu\text{l}$  TE mit 20  $\mu\text{g/ml}$  RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

*Ustilago*-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5  
50 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
1% (w/v) SDS  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

TE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

### Isolierung hochmolekularer DNA aus *U. maydis*

Zellen des *U. maydis* Stammes 521 wurden in 250 ml CM-Medium bis  $OD_{600} \approx 0,7$  angezogen und pelletiert (3.500rpm, 8 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R). Anschließend wurde das Zellpellet in 25 ml SCS-Puffer resuspendiert und erneut pelletiert (3.500 rpm, 8 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), um es in 25 ml 5 mg/ml Novozym/SCS-Puffer aufzunehmen. Die Zellen werden darin bis zur vollständigen Abrundung protoplastiert und wiederum pelletiert (2.300 rpm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wird in 1 ml SCS-Puffer aufgenommen und mit 9 ml NDS-Puffer, in den 0,5 mg/ml Proteinase K eingewogen und gelöst wird, versetzt. Dieser Ansatz wird für 3 h bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wird das Gemisch mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (10.000 rpm, 10 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge). Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, ehe eine Extraktion mit Chloroform erfolgt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (10.000 rpm, 10 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wird die wässrige Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 3 Volumen Ethanol gefällt (15 min bei 4°C). Nach Zentrifugation (10.000 rpm, 30 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500  $\mu$ l  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen.

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
in  $H_2O_{bid.}$ , sterilfiltriert

NDS:

20 mM Tris-Cl, pH 9,5  
0,5 M  $Na_2$ -EDTA  
1% (w/v) Sarcosyl  
in  $H_2O_{bid.}$

### Reisolierung von in *U. maydis* Zellen freireplizierenden Plasmiden

Bei der in Abschnitt 4.2.3. beschriebenen Methode der Transformation mit freireplizierenden Plasmiden wird das zirkuläre Plasmid transformiert und kann daher auch wieder leicht reisoliert werden. Im Fall der Analyse der komplementierten UV-Mutanten GW1, GW52, GW53, GW56 und GW57 und im Fall der Transformanten CGW4-2, CGW5-2, CGW5-3, CGW5-4, CGW5-5 und CGW5-6 wurde dazu genomische DNA nach der oben beschriebenen Methode isoliert, dialysiert und schließlich mittels Elektroporation in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Die erhaltenen Transformanten enthielten das ursprünglich transformierte Cosmid bzw. Plasmid.

### RNA-Isolierung aus *U. maydis* Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach Schmitt *et al.* (1990). Zellen von einer frischen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis  $OD_{600} \approx 0,5$  bei 29°C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600  $\mu$ l AE-Puffer mit 1% (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600  $\mu$ l AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellausschluss erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600  $\mu$ l AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400  $\mu$ l) wurde danach mit 40  $\mu$ l 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20  $\mu$ l  $H_2O_{bid.}$  oder RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 1  $\mu$ l auf einem 1%igen TBE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260 nm gemessen.

AE-Puffer:

50 mM Na-Acetat, pH 5,3  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

AE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit AE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

RNA-Lagerpuffer:

1 mM Na-Citrat, pH 6,4  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### RNA-Isolierung nach der alkalischen Phenol-Methode

Diese Methode ist modifiziert nach Timberlake (1986). Sie dient zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die auf Festmedien gewachsen waren oder aus Pflanzentumormaterial. Dazu wurde das Pilzmaterial von drei Platten abgekratzt bzw. Pflanzentumorstücke mit Hilfe einer Rasierklinge kleingeschnitten, in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Das gefrorene Pulver wurde mit 5 ml RNA-Lysepuffer durchmischt und erneut mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Mischung wurde zu einem feinen Pulver gemörsert, in 10 ml TE-Phenol überführt, in diesem bei RT aufgetaut und anschließend mit 0,5 ml Glasperlen für 4 min in 50 ml PPN-Röhrchen heftig geschüttelt. Dem Ansatz wurden 10 ml Chloroform zugesetzt, nach Zentrifugation (10.000 Upm, 15 min, 4°C,

Beckmann Avanti30 Zentrifuge) und Phasentrennung die wässrige Phase in neue Gefäße überführt, dreimal mit dem gleichen Volumen TE-Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, die RNA anschließend durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Li-Acetat für 2 h bei 0°C gefällt und durch Zentrifugation (wie oben) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit RNA-Waschlösung gewaschen, nach Trocknung in 200-400 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> oder RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

RNA-Lysepuffer:

Unter ständigem Rühren 40 ml Lösung 2 (12% (w/v) Natrium-p-Aminosalicylsäure in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, frisch ansetzen) langsam in 40 ml Lösung 3 (2% (w/v) tri-iso-Propylnaphthalensulfonat in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, frisch ansetzen) tropfen lassen, dann 20 ml Lösung 1 (1 M Tris-Cl, pH 8,5; 1,25 M NaCl; 250 mM EGTA in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) zugeben. Bei der Zugabe von Lösung 1 kann der Lysepuffer trüb oder flockig werden. Der pH wird mit NaOH auf 8,9 eingestellt. Ist der Lysepuffer trübe bzw. bildet sich ein Niederschlag, so muss er auf Eis so lange gerührt werden, bis er wieder klar wird. Vor Gebrauch kann der Lysepuffer filtriert werden; er ist auf Eis einen Tag haltbar.

RNA-Waschlösung:

300 mM Na-Acetat, pH 5,3  
70% (v/v) Ethanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### 4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

#### Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht werden. Diese Methode hat gegenüber der häufig verwendeten Formamid/Formaldehyd-Denaturierung den Vorteil, bei der Gelelektrophorese eine deutlich bessere Auftrennung der Fragmente zu bieten. Die RNA-Probe (5-15 µg) wurde dazu in 16 µl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50% DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1% MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde alle 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. In der Regel wurden mehrere parallele Auftrennungen gleichzeitig durchgeführt.

MOPS-Puffer:

- 200 mM MOPS, pH 7,0
- 80 mM Na-Acetat
- 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

RNA-Auftragspuffer:

- 50% (w/v) Saccharose
- 0,25% (w/v) Bromphenolblau
- 0,25% (w/v) Xylencyanol FF
- in MOPS-Puffer

#### Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente 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 (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl

inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 2 h.

DENAT-Lösung:

- 1,5 M NaCl
- 0,4 M NaOH
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC über Nacht. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (302 nm, 120 mJ/cm<sup>2</sup>) kovalent mit der Membran verknüpft. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylenblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

20x SSC:

- 300 mM Na-Citrat, pH 7,0
- 3 M NaCl
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die Hybond-N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10<sup>6</sup> cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über

Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

Hybridisierungspuffer:

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

Waschpuffer:

- 1x SSC
- 0,1% (w/v) SDS
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

**Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern-Analysen**

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von α<sup>32</sup>P-dCTP hergestellt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Dabei wurden folgende DNA-Fragmente eingesetzt:

*bW/bE* und *kon8*

- ein 2.598 bp *PvuII*-Fragment aus pbW2-*NdeI*-bE1
- lga2* ein *EcoRI*-Fragment aus pCR-*lga2*
- dik6* ein 579 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-*dik6*
- dik1* ein 357 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-*dik1*
- egl1* ein 582 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-*egl1*

- hum2* ein 345 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-*hum2*
- rep1* ein 459 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-*rep1*
- dkh6* ein 1.599 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pGE142
- pyr6* ein 294 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-*pyr6*
- drf1* ein 661 bp *NdeI/NsiI*-Fragment aus pGE166
- mfa1* ein 675 bp *EcoRV*-Fragment aus pSP4,2*EcoRV*
- mfa2* ein 386 bp *SpeI/PstI*-Fragment aus pTZa2*XhoI*3,5#3
- egfp* ein 726 bp *NcoI/NotI*-Fragment aus p123
- sgfp* ein 726 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pRU4
- ip* ein 1.884 bp *EcoRI/HindIII*-Fragment aus pRU4
- ppi1* ein 165 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-*ppi1*
- frb34* ein 1.055 bp *EcoRI*-Fragment aus pfrb34
- frb52* ein 392 bp *EcoRI*-Fragment aus pfrb52
- frb124* ein 577 bp *EcoRI*-Fragment aus pfrb124
- frb136* ein 1.091 bp *EcoRI*-Fragment aus pfrb136
- orf1* ein 988 bp *XbaI/BamHI*-Fragment aus SAN3329
- orf2* ein 541 bp *SacI/PstI*-Fragment aus SAN3400
- orf3* ein 1.387 bp *BamHI*-Fragment aus SAN3291
- orf4* ein 1.916 bp *SacI*-Fragment aus SAN3366
- ssp1* ein 1.091 bp *HpaI/BamHI*-Fragment aus pSH4
- pig3* ein 2.100 bp *SphI*-Fragment aus pKH541
- pig4* ein 1.600 bp *NcoI/XbaI*-Fragment aus pKH518
- mig1* ein *NruI/PstI*-Fragment aus pMIGBS

Zur Herstellung einer 18S-rRNA-spezifischen Sonde wurde ein Oligonukleotid mit der Sequenz:  
ACG GGT TGA CAT TTT GTT GGC CCC T  
durch Phosphorylierung des 5'-Endes radioaktiv markiert. Dabei wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 50 µCi γ<sup>32</sup>P-ATP und 10 U T4-Polynukleotid Kinase (NEB Biolabs) für 45 min bei 37°C in PNK-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH7,5; 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT) inkubiert. Überschüssige Nukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin G-25 Säulchen entfernt.

### 4.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse

#### Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977): In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert werden.

#### Sequenz- und Strukturanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

- SEQUENCENAVIGATOR 1.0.1** (ABI) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.
- DNA-STRIDER 1.3** (Douglas, 1995; Marck, 1988) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.
- BLAST2** (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.
- PROPSEARCH** (Hobohm und Sander, 1995) zur Identifikation ähnlicher Proteine bzw. Proteinfamilien nach einem Algorithmus, der

Proteinparameter wie z. B. Aminosäure-Zusammensetzung, molekulare Masse, Hydrophobizität und Ladung berücksichtigt.

- SMART** (Schultz *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 1998) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.
- PSORT2** (Nakai und Horton, 1999; Nakai und Kanehisa, 1992) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.
- SIGNALP** (Nielsen *et al.*, 1997a; Nielsen *et al.*, 1997b) zur Identifikation N-terminaler Signalpeptide.
- COILS** (Lupas *et al.*, 1991) zur Identifikation von Coiled-Coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Lupas.
- PESTFIND** (Rechsteiner und Rogers, 1996; Rogers *et al.*, 1986) zur Identifikation von PEST-Sequenzen in einem Protein
- PREDICTPROTEIN** (Rost, 1996) zur Sequenzanalyse und Strukturvorhersage von Proteinen.
- PROSCAN** zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Suche nach Motiven ähnlicher Proteine.
- TMPRED** (Hofmann und Stoffel, 1993) zur Identifizierung potentieller Transmembrandomänen in Proteinen.
- TMHMM** (Krogh *et al.*, 2001) zur Identifizierung potentieller Transmembrandomänen in Proteinen.
- CLUSTALW** (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.
- DART** zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.
- SEQVU 1.0.1** (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments.

### 4.3.4 PCR-Techniken

#### Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach Innis *et al.* (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M, dNTPs in einer Endkonzentration von 200  $\mu$ M (d. h. je 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit Hot-Start durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

94/2-1UTaq-94/1-[94/0,5-65/1-72/1]x30-72/5

Für die Darstellung von PCR-Protokollen wird eine vereinfachte Schreibweise verwendet: 94/2-1UTaq-94/1-[94/0,5-65/1-72/1,5]x30-72/5 bezeichnet z. B. ein Protokoll mit Denaturierung bei 94°C für 2 min, Zugabe von 1 U Taq DNA-Polymerase ("Hot-Start"), Denaturierung bei 94°C für 1 min, 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 65°C und 1,5 min Elongation bei 72°C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 5 min bei 72°C.

Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate mussten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Bei schwierigen Ansätzen wurde außerdem die Konzentration der Mg<sup>2+</sup>-Ionen optimiert (die wichtigsten Parameter einer PCR-Reaktion sind die Temperatur, bei der die Oligonukleotide binden und die Konzentration von Mg<sup>2+</sup>-Ionen). PCR-Ansätze mit *Pfu* DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer. Es wurden die PCR-Geräte OmniGene (Hybaid), PTC100 (MJ Research) und Robocycler Gradient96 (Stratagene) verwendet.

PCR-Puffer (*Taq* DNA-Polymerase):

10 mM Tris-Cl, pH 8,3  
50 mM KCl

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

PCR-Puffer (*Pfu* DNA-Polymerase):

20 mM Tris-Cl, pH 8,8  
10 mM KCl  
10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
2 mM MgSO<sub>4</sub>  
1% (v/v) Triton X-100  
1 mg/ml BSA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### RT-PCR-Ansätze

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um festzustellen, ob der ORF von *dik6* für ein größeres Polypeptid als von Bohlmann (1996) angenommen, kodiert. Für die reverse Transkription wurden 15  $\mu$ g RNA zunächst mit 500 pmol oligo (dT)<sub>18</sub> in 62,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> für 10 min bei 70°C denaturiert, anschließend direkt auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l RT-Puffer (5x, Gibco), 10  $\mu$ l 0,1 M DTT und 4  $\mu$ l 25 mM dNTPs wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 2 min bei 37°C inkubiert, 800 U Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco) zugegeben (4  $\mu$ l), und die Reaktion für 50 min bei 37°C durchgeführt. Danach wurde die Reverse Transkriptase 15 min bei 75°C inaktiviert, 2,5  $\mu$ l einer 10 mg/ml RNaseA-Lösung zugegeben und dadurch die RNA für 30 min bei 37°C abgedaut. Mittels QiaQuick Spin Columns (Qiagen) wurden die noch vorhandenen Oligonukleotide und Nukleotide abgetrennt. Die cDNA-Moleküle wurden mit 100  $\mu$ l 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 eluiert und in Aliquots zu 10  $\mu$ l bei -20°C gelagert. Die PCR-Ansätze enthielten 1  $\mu$ l cDNA, jeweils 50 pmol der Oligonukleotide OAN34, 50 pmol OAN35 oder OAN36 oder OAN37 oder OAN38, 10  $\mu$ l 10xPCR-Puffer, 0,4  $\mu$ l 25 mM dNTPs und 2 U T<sub>aq</sub>-Polymerase (2  $\mu$ l) in 50  $\mu$ l Reaktionsansatz.

Ein typisches Protokoll sah folgendermaßen aus:

94/2-2UTaq-94/1-[94/1-65/1-72/1]x35-72/5

Zur Überprüfung der PCR wurden 5  $\mu$ l der Ansätze auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt.



### Ganz-Zell-PCR aus *E. coli*-Zellen

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *E. coli*-Zellen durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> resuspendiert und davon jeweils 1,5 µl zu einem 50 µl Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10 min), um ein Platzen der *E. coli*-Zellen zu erreichen. Für den Nachweis der Insertion von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR-Topo wurden die Oligonukleotide UNI24 und REV24 bzw. OAN104 und OAN105 verwendet.

### Ganz-Zell-PCR aus *U. maydis*-Zellen

Dieselbe Technik kann man ebenfalls zur Untersuchung von *U. maydis*-Transformanten einsetzen. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanten erwiesen. Es sind jedoch einige Punkte zu beachten: (1) das Zellmaterial sollte frisch sein, idealerweise als drei Tage alte Kolonie von einer PD-Platte, (2) es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden, idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm, (3) die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und nicht immer reproduzierbar, die Amplifikatlängen sollten daher zwischen 200 und 500 bp liegen, (4) die Elongationszeiten müssen für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden, und (5) kommt es immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen. Aus diesem Grund wurden diese Analysen so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen Transformation kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Mit allen Klonen, die im Ansatz kein Amplifikat zeigten, wurde weitergearbeitet. Durch diese Vorgehensweise gehen potentiell richtige Transformanten, bei denen die PCR-Reaktion nicht funktioniert hat, nicht verloren. Die Ansätze wurden genauso durchgeführt wie im Fall der Ganz-Zell-PCR in *E. coli*. In der Regel wurden zwei bis drei PCR-Runden durchgeführt, wobei nach der Analyse die potentiell richtigen Klone jedes Mal wieder aus den Zellsuspensionen heraus auf PD-Platten neu vereinzelt wurden. Abschließend

wurden die Transformanten durch Southern-Analyse bestätigt. Es wurden folgende Kombinationen an Oligonukleotiden eingesetzt:

<i>ip</i> -Locus:	OAN74/OAN75 OAN74/OAN76 OAN77/OAN78
<i>dik6</i> :	OAN34/OAN35
<i>dkh6</i> :	OGW73/OGW75
<i>drf1</i> :	OGW89/OGW90
<i>pyr6</i> :	OAN87/OAN88

### Gerichtete PCR-Mutagenese

Für die gerichtete PCR-Mutagenese zur Erzeugung interner Punktmutationen (z. B. bei der Herstellung eines *hph*-Gens, in dem eine *Eco*RI-Schnittstelle entfernt wurde) wurde eine Modifikation der sogenannten "Megaprimer"-Technik (Chen und Przybyla, 1994) verwendet. Dabei wurde zunächst ein kurzes (100-200 bp langes) PCR-Fragment erzeugt, wobei mit einem der beiden Oligonukleotide die gewünschte Mutation eingefügt wurde. Dieses Fragment, der sogenannte "Megaprimer", wurde in einem zweiten PCR-Ansatz zusammen mit einem weiteren Oligonukleotid eingesetzt, so dass ein gewünschte Mutation in der Mitte des so entstandenen Amplifikats liegt. Abschließend wurde dieses Fragment an internen Restriktions-Schnittstellen geschnitten und kloniert. Die Konzentration des Megaprimers in der zweiten Reaktion ist ein kritischer Parameter. Standardmäßig wurden jeweils zwei Ansätze mit 400 nM und 40 nM Megaprimer parallel angesetzt. Dabei wurde in der Regel *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, um eine geringere Fehlerrate zu erreichen.

## Techniken zur Bestimmung von mRNA-Enden

Für die Bestimmung von 5'- und 3'-Enden von mRNA-Molekülen wurden verschiedene Techniken angewendet. Am einfachsten war dabei die Amplifikation der Enden aus der freireplizierenden cDNA-Bank. Die cDNA-Moleküle in der zweiten Bibliothek sind für Volllänge-Fragmente angereichert und gerichtet kloniert. Die Amplifikationen wurden in jeweils zwei Schritten durchgeführt, wobei die erhaltenen Fragmente aus der ersten Reaktion in einem zweiten Ansatz mit intern gelegenen Oligonukleotiden reamplifiziert wurden. In Fällen, in denen sich kein eindeutiges Bandenmuster zeigte, wurden die aufgetrennten Fragmente auf Nylonmembranen transferiert und mit einer Gen-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Oligonukleotide

für die Amplifikationen waren im Fall der freireplizierenden cDNA-Bank OGW54 und OGW55 bzw. OGW56 und OGW57.

Im Fall von *dik6* wurden die mRNA-Enden auch direkt mittels Ligation-anchored (LA)-5'-RACE bestimmt (Troutt et al., 1992). Dabei wurde die cDNA-Synthese mit OAN34 durchgeführt und an die entstandenen Moleküle mit T4-RNA Ligase das am 3'-Ende blockierte und am 5'-Ende phosphorylierte Oligonukleotid OGW26 angefügt. Anschließend wurden die Moleküle mit dem Oligonukleotid OAN34 und OGW27 in einem PCR-Ansatz eingesetzt. Dieses Oligonukleotid weist an seinem 3'-Ende eine zu OGW26 komplementäre Sequenz auf, so dass die entstandenen cDNA PCR-Produkte am 5'-Ende mit OGW27 Oligonukleotiden und am 3'-Ende mit OAN34 amplifiziert werden können.

### 4.3.5 Isolierung und Überexpression von Proteinen

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

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde entweder aus etwa 200 ml Flüssigkultur bei  $OD_{600} \approx 0,5$  oder von 2 rechteckigen (12 x 12 cm) Festmedienplatten, auf denen die Zellen mit 0,1  $OD_{600}/cm^2$  ausgestrichen und dann 24 h bei 29°C kultiviert wurden, durchgeführt. Im Fall der Flüssigkulturen wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), in 5 ml Proteinpuffer aufgenommen, erneut abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) und schließlich in 1 ml Proteinpuffer mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Im Fall der Präparation von Festmedien wurden die Zellen von den Platten abgekratzt, direkt in die Becher gegeben und 1 ml Proteinpuffer mit Proteinase-Inhibitoren zupipettiert. Die Zellen wurden in der Zelmühle zweimal für 5 min bei einer Frequenz von 30 pro Sekunde geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde gewartet, bis die Suspension aufgetaut aber noch kalt war, und in frische Eppendorf-Gefäße auf Eis pipettiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (22.000 Upm, 30 min, 4°C, Beckman Avanti30), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 6x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Diese Proben

wurden bei -20°C gelagert. Zur Mengenbestimmung wurden vor der Zugabe von Probenpuffer Aliquots abgenommen und mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) die Proteinkonzentration bestimmt.

#### Proteinpuffer:

100 mM PIPES, pH 6,9  
5 mM  $MgSO_4$   
1 mM  $Na_2$ -EDTA  
1 mM  $Na_2$ -EGTA  
in  $H_2O_{bid}$ .

#### Proteinase-Inhibitoren:

234,4 µg/ml Pefabloc (Roche)  
1 Tablette/50 ml Complete EDTA-free (Roche)

#### Probenpuffer (6x):

300 mM Tris-Cl, pH 8,0  
30% (v/v) Glycerin  
20% (w/v) SDS  
0,5 g/l Bromphenolblau  
15% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugeben)  
in  $H_2O_{bid}$ .

#### Überexpression von His-Kon8 in *E. coli*

Die Überexpression des bW-bE Fusionsprotein erfolgte nach dem von Romeis *et al.* (2000) beschriebenen Protokoll.

## 4.3.6 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

### SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Proteinextrakte werden dabei unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein 1 mm dickes Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der Grenze der Gele aufgrund des pH-Sprungs verdichtet und anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Es wurden in der Regel 100 µg Proteinextrakt in einer Mini Protean II Apparatur (Biorad) bei 200V für 1 h aufgetrennt. Für die Auftrennung von Proteinextrakten mit GFP bzw. GFP-Derivaten wurden 15%ige Trenngele verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbe-Lösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Proteingel-Laufpuffer:

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

Sammelgel:

- 125 mM Tris-Cl, pH 6,8
- 5% (w/v) Acrylamid
- 0,13% (w/v) Bisacrylamid
- 0,1% (w/v) SDS
- 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1% (v/v) TEMED
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Trenngel:

- 375 mM Tris-Cl, pH 8,8
- 10% bzw. 15% (w/v) Acrylamid
- 0,27% (w/v) Bisacrylamid
- 0,1% (w/v) SDS
- 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1% (v/v) TEMED
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Coomassie-Färbelösung:

- 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- 45% (v/v) Methanol
- 10% (v/v) Essigsäure
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Entfärbe-Lösung:

- 45% (v/v) Methanol
- 10% (v/v) Essigsäure
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P von Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 1 mA/cm<sup>2</sup>) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

**Anodenpuffer 1:**

300 mM Tris-Cl, pH 10,4  
 15% (v/v) Methanol  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Anodenpuffer 2:**

30 mM Tris-Cl, pH 10,4  
 15% (v/v) Methanol  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Kathodenpuffer:**

25 mM Tris-Cl, pH 9,4  
 40 mM ε-Aminocaprinsäure  
 15% (v/v) Methanol  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Nachweis von immobilisierten Proteinen**

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst für 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 45 min mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 0,5% Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST und dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Es wurden folgende Antikörper verwendet: monoklonaler Maus anti-GFP (1 µg/µl, Roche, in einer Verdünnung von 1:2.000) mit Ziege anti-Maus (HRP-gekoppelt, Promega, in einer Verdünnung von 1:4.000); monoklonaler Maus anti-αTubulin Antikörper (Ab1) gegen Hühner αTubulin, (Oncogene, in einer Verdünnung von 1:4.000) mit Ziege anti-Maus (HRP-gekoppelt, Promega, in einer Verdünnung von 1:4.000). Zur Detektion wurden die frisch angesetzten Lösungen ECL I und ECL II zu gleichen Teilen gemischt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 5 min Exposition deutliche Banden zu erkennen.

**TBST:**

20 mM Tris-Cl, pH 7,6  
 136 mM NaCl  
 0,05% (v/v) Tween 20  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**PBS:**

20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
 150 mM NaCl  
 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**ECL I:**

100 mM Tris-Cl, pH 8,0  
 0,44% (v/v) p-Coumarinsäure (Sigma) in DMSO  
 1% (v/v) Luminol (Fluka) in DMSO  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**ECL II:**

100 mM Tris-Cl, pH 8,0  
 0,018% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 Gelretardationsanalyse

Die Bindung eines Proteins an ein DNA-Fragment kann anhand des veränderten Laufverhaltens in einem Polyacrylamid-Gel nachgewiesen werden. Die DNA-Fragmente wurden entweder durch PCR mit radioaktiven Nukleotiden oder Auffüllreaktionen an überhängenden Fragment-Enden, ebenfalls in Gegenwart radioaktiver Nukleotide markiert, dann zunächst über Microspin S-200 Säulchen die nicht eingebauten Nukleotide bzw. Oligonukleotide abgetrennt und die Sonden über ein Polyacrylamid-Gel aufgereinigt. Für die Reaktionsansätze wurden 5 µl 4x Retentionspuffer mit 10 µg BSA, 1 µg poly (dIdC) und 2 µl His-Kon8 Proteinlösung mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> in einem Volumen von insgesamt 18 µl für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Das Protein befand sich in Puffer E und es wurden jeweils drei Ansätze mit 0, 10 und 20 ng Protein durchgeführt. Anschließend wurden pro Ansatz 2 µl des radioaktiv markierten Fragments mit einer spezifischen Aktivität von ca. 20.000 cpm/µl zugegeben und für weitere 15 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktionen wurden über native 3,5% Polyacrylamid-Gele mit einer Quervernetzung von 30:0,8 in 0,5x TBE-Puffer für 2,7 h bei 125 V

aufgetrennt, getrocknet und auf einen strahlungssensitiven Phosphorimager-Screen aufgelegt. Die Auswertung erfolgte nach Exposition für mindestens 8 h auf einem STORM840 Phosphorimager (Molecular Dynamics) mit der IMAGEQUANT Software (Molecular Dynamics).

Retentionspuffer (4x):

- 100 mM Hepes, pH 7,9
- 640 mM KCl
- 8 mM Na<sub>2</sub>-EDTA
- 40% (v/v) Glycerin
- 4 mM DTT
- 4 mM Pefabloc
- 4x Complete (Roche)

Puffer E:

- 25 mM Hepes, pH 7,4
- 80 mM KCl
- 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA
- 15% (v/v) Glycerin
- 2 mM DTT

#### 4.4.2 DNaseI-Protektionsexperimente

Die genaue Bindestelle eines Proteins auf der DNA kann durch "Footprinting"-Techniken ermittelt werden. Bei DNaseI-Protektionsexperimenten wird das Fragment partiell mit DNaseI geschnitten, so dass ca. alle 300 bp ein Einzelstrangbruch eingeführt wird. Ist die DNA durch ein Protein gebunden, dann ist dieser Bereich vor dem Zugriff durch DNaseI geschützt, was nach Auftrennung der erhaltenen Fragmente durch ein Ausbleiben von Einzelstrangbrüchen in dieser Region erkennbar ist.

Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden mit Polynukleotid-Kinase an ihren 5'-Enden radioaktiv markiert und über ein Polyacrylamid-Gel gereinigt. Die Bindung erfolgte für 30 min bei 25°C in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Dabei wurden 5 µl 4x Retentionspuffer, 100.000 cpm des Fragments, unterschiedliche Mengen an His-Kon8 in 4 µl Puffer E und BSA in einer Endkonzentration von 500 ng/µl eingesetzt. Im Fall des in Abbildung 13C und D dargestellten Experiments wurden insgesamt 0, 200, 600, 2.700 und 5.400 ng His-Kon8 verwendet. Nach Bindung des Proteins an die DNA wurde die DNaseI-Reaktion durch Zugabe von 2 µl DNaseI-Lösung (667 µg/µl in 120 mM MgCl<sub>2</sub>) gestartet und nach 15 sec Inkubation bei 25°C durch die Zugabe von 80 µl Stopplösung (50 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,5% (w/v)

SDS in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) gestoppt. Die Reaktion wurde anschließend mit TE-Phenol/Chloroform extrahiert, die DNA mit Ethanol unter Zugabe von 40 µg Glycogen gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in 5 µl Formamid-Puffer aufgenommen. Für die parallel durchgeführte Sequenzreaktion wurde der T7 DNA Sequencing Kit (Pharmacia) verwendet. Die Auftrennung erfolgte über ein denaturierendes 6%iges Polyacrylamid-Gel (2.000V für 1 h). Das Gel wurde nach dem Lauf für 15 min in H<sub>2</sub>O gewässert, für 1 h bei 80°C getrocknet und auf einen strahlungssensitiven Phosphorimager-Screen aufgelegt. Die Auswertung erfolgte nach Exposition für mindestens 12 h auf einem STORM840 Phosphorimager (Molecular Dynamics) mit der IMAGEQUANT Software (Molecular Dynamics).

Formamid-Puffer:

- 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0
- 0,25% (w/v) Bromphenolblau
- 0,25% (w/v) Xylencyanol FF
- in Formamid





## 5. Literaturverzeichnis

- AGRIOS, G. N.** (1997). *Plant pathology*. (San Diego).
- AICHINGER, C.** (2000) Identifizierung pflanzenabhängig-regulierter Gene in *Ustilago maydis*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., und LIPMAN, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., und LIPMAN, D. J.** (1997). Gapped BLAST und PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- ARNOLD, C.** (1992). *II International Symposium on Specialty and Exotic Vegetable Crops*, Vol 318 (Miami, USA, D. N. Maynard).
- AUSUBEL, F. M., BRENZ, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., und STRUKL, K.** (1987). *Current Protocols in Molecular Biology* (USA, John Wiley & Sons, Inc.).
- BAKKEREN, G., und KRONSTAD, J. W.** (1994). Linkage of mating-type loci distinguishes bipolar from tetrapolar mating in basidiomycetous smut fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7085-7089.
- BALDWIN, J. M.** (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 180-190.
- BANKS, G. R., SHELTON, P. A., KANUGA, N., HOLDEN, D. W., und SPANOS, A.** (1993). The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.
- BANKS, G. R., und TAYLOR, S. Y.** (1988). Cloning of the *pyr3* gene of *Ustilago maydis* and its use in DNA transformation. *Mol Cell Biol* **8**, 5417-5424.
- BANUETT, F.** (1991). Identification of genes governing filamentous growth and tumor induction by the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 3922-3926.
- BANUETT, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**, 174-180.
- BANUETT, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1989). Different *a* alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1994). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**, 1367-1378.
- BARTEL, P., CHIEN, C. T., STERNGLANZ, R., und FIELDS, S.** (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920-924.
- BASSE, C. W., STUMPFERL, S., und KAHMANN, R.** (2000). Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol Cell Biol* **20**, 329-339.
- BASSI, M. T., INCERTI, B., EASTY, D. J., SVIDERSKAYA, E. V., und BALLABIO, A.** (1996). Cloning of the murine homolog of the ocular albinism type 1 (OA1) gene: sequence, genomic structure, and expression analysis in pigment cells. *Genome Res* **6**, 880-885.
- BERGEMANN, J.** (1993) Molekularbiologische Untersuchungen der Transkripte und Produkte des *b*-Locus von *Ustilago maydis*, Freie Universität Berlin, Berlin.
- BILLETER, M.** (1996). Homeodomain-type DNA recognition. *Prog Biophys Mol Biol* **66**, 211-225.
- BILLETER, M., GUNTERT, P., LUGINBUHL, P., und WUTHRICH, K.** (1996). Hydration and DNA recognition by homeodomains. *Cell* **85**, 1057-1065.
- BOEKE, J. D., LACROUTE, F., und FINK, G. R.** (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**, 345-346.

- BOHLMANN, R.** (1996) Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- BOHLMANN, R., SCHAUWECKER, F., BASSE, C., und KAHMANN, R.** (1994). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, M. J. Daniels, ed. (Dordrecht, Kluwer Acad. Publ.), pp. 239-245.
- BÖLKER, M., BÖHNERT, H. U., BRAUN, K. H., GÖRL, J., und KAHMANN, R.** (1995a). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- BÖLKER, M., GENIN, S., LEHMLER, C., und KAHMANN, R.** (1995b). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- BÖLKER, M., URBAN, M., und KAHMANN, R.** (1992). The *a* mating type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- BONNET, C.** (1754). Recherches sur l'usage des feuilles. Göttingen, pp. 327 - 330.
- BORGES-WALMSLEY, M. I., und WALMSLEY, A. R.** (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* **8**, 133-141.
- BÖRNER, H.** (1997). *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* (Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag).
- BOTTIN, A., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- BRACHMANN, A.** (1995). Suche nach frühen *b*-regulierten Genen in *Ustilago maydis* mit Hilfe der Methode des "Differential Display". Diplomarbeit, LMU München.
- BRACHMANN, A.** (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- BRACHMANN, A., WEINZIERL, G., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (2001). The bW/bE heterodimer regulates a distinct subset of genes in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.*, **in press**
- BREFELD, O.** (1883). Botanische Untersuchungen über Hefenpilze. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Die Brandpilze. In *Die Brandpilze I* (Leipzig).
- BRZOSTOWSKI, J. A., und KIMMEL, A. R.** (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci* **26**, 291-297.
- BÜRGLIN, T. R.** (1994). A comprehensive classification of homeobox genes. In *Guidebook to the homeobox genes*, D. Duboule, ed. (Oxford, Oxford University Press), pp. 27-71.
- BUSCH, S. J., und SASSONE-CORSI, P.** (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet* **6**, 36-40.
- CASSELTON, L. A., und OLESNICKY, N. S.** (1998). Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 55-70.
- CHAPELA, I. H., PETRINI, O., und HAGMANN, L.** (1991). Monolignol glucosides as specific recognition messengers in fungus-plant symbioses. *Physiological & Molecular Plant Pathology* **39**, 289-298.
- CHRISTENSEN, J. J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- CLARKE, L., und CARBON, J.** (1976). A colony bank containing synthetic *Col El* hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**, 91-99.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C., and HSU, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- DEZWAAN, T. M., CARROLL, A. M., VALENT, B., und SWEIGARD, J. A.** (1999). *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* **11**, 2013-2030.
- DOUGLAS, S. E.** (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol* **3**, 37-45.
- DÜRRENBERGER, F., WONG, K., und KRONSTAD, J. W.** (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5684-5689.
- EDDY, S. R.** (1995). Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 114-120.
- ELBLE, R., und TYE, B. K.** (1991). Both activation and repression of *a*-mating-type-specific genes in yeast require transcription factor Mcm1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10966-10970.

- FLAISHMAN, M. A., und KOLATTUKUDY, P. E. (1994). Timing of Fungal Invasion Using Host's Ripening Hormone as a Signal. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6574-6583.
- FOTHERINGHAM, S., und HOLLOMAN, W. K. (1989). Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes. *Mol Cell Biol* **9**, 4052-4055.
- FRIEDEL, R. H., SCHNÜRCH, H., STUBBUSCH, J., und BARDE, Y.-A. (1997). Identification of genes differentially expressed by nerve growth factor- and neurotrophin-3-dependent sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12670-12675.
- GEHRING, W. J., AFFOLTER, M., und BÜRGLIN, T. (1994a). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* **63**, 487-526.
- GEHRING, W. J., QIAN, Y. Q., BILLETER, M., FURUKUBO-TOKUNAGA, K., SCHIER, A. F., RESENDEZ-PEREZ, D., AFFOLTER, M., OTTING, G., und WUTHRICH, K. (1994b). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**, 211-223.
- GERHARDT, C. C., LODDER, H. C., VINCENT, M., BAKKER, R. A., PLANTA, R. J., VREUGDENHIL, E., KITS, K. S., und VAN HEERIKHUIZEN, H. (1997). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a molluscan octopamine receptor that couples to chloride channels in HEK293 cells. *J Biol Chem* **272**, 6201-6207.
- GIBSON, T. J., THOMPSON, J. D., BLOCKER, A., und KOUZARIDES, T. (1994). Evidence for a protein domain superfamily shared by the cyclins, TFIIB and RB/p107. *Nucleic Acids Res* **22**, 946-952.
- GILLISSEN, B., BERGEMANN, J., SANDMANN, C., SCHRÖER, B., BÖLKER, M., und KAHMANN, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- GOLD, S., DUNCAN, G., BARRETT, K., und KRONSTAD, J. (1994a). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* **8**, 2805-2816.
- GOLD, S. E., BAKKEREN, G., DAVIES, J. E., und KRONSTAD, J. W. (1994b). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**, 225-230.
- GOLD, S. E., BROGDON, S. M., MAYORGA, M. E., und KRONSTAD, J. W. (1997). The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* **9**, 1585-1594.
- GOTZES, F., BALFANZ, S., und BAUMANN, A. (1994). Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors Channels* **2**, 131-141.
- GOUTTE, C., und JOHNSON, A. D. (1988).  $\alpha 1$  protein alters the DNA binding specificity of  $\alpha 2$  repressor. *Cell* **52**, 875-882.
- GRANDEL, A., ROMEIS, T., und KÄMPER, J. (2000). Regulation of pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Plant Path* **1**, 61-66.
- GROLL, A. H., DE LUCCA, A. J., und WALSH, T. J. (1998). Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol* **6**, 117-124.
- GUARRO, J., GENEJ, und STCHIGEL, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **12**, 454-500.
- HANAHAH, D. (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. In DNA cloning, a practical approach, D. Rickwood, and B. D. Hames, eds. (IRL Press), pp. 109-135.
- HARRIGAN, M. T., CAMPBELL, N. F., und BOURGEOIS, S. (1991). Identification of a gene induced by glucocorticoids in murine T-cells: a potential G protein-coupled receptor. *Mol Endocrinol* **5**, 1331-1338.
- HARTMANN, H. A., KAHMANN, R., und BÖLKER, M. (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.
- HARTMANN, H. A., KRÜGER, J., LOTTSPEICH, F., und KAHMANN, R. (1999). Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator *prf1*. *Plant Cell* **11**, 1293-1306.
- HENGARTNER, C. J., MYER, V. E., LIAO, S. M., WILSON, C. J., KOH, S. S., und YOUNG, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by *Srb10* and *Kin28* cyclin- dependent kinases. *Mol Cell* **2**, 43-53.
- HERINGA, J. (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**, 341-364.
- HICKE, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* **9**, 107-112.
- HICKE, L., und RIEZMAN, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84**, 277-287.

- HICKS, G. R., und RAIKHEL, N. V.** (1995). Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 155-188.
- HOBOHM, U., und SANDER, C.** (1995). A sequence property approach to searching protein databases. *J Mol Biol* **251**, 390-399.
- HOCH, H. C., STAPLES, R. C., WHITEHEAD, B., COMEAU, J., und WOLF, E. D.** (1987). Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* **235**, 1659-1662.
- HOFFMAN, C. S., und WINSTON, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- HOFMANN, K., und STOFFEL, W.** (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **347**, 166.
- HOGAN, L. H., KLEIN, B. S., und LEVITZ, S. M.** (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Reviews* **9**, 469 - 488.
- HOLDEN, D. W., KRONSTAD, J. W., und LEONG, S. A.** (1989). Mutation in a heat-regulated *hsp70* gene of *Ustilago maydis*. *EMBO J* **8**, 1927-1934.
- HOLLIDAY, R.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**, 204-230.
- HOLLIDAY, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R. C. King, ed. (New York, USA, Plenum Press), pp. 575-595.
- HUBER, S.** (2001) Isolierung und Charakterisierung des sporenspezifisch exprimierten Gens *ssp1* in *Ustilago maydis*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., und WHITE, T. J., eds.** (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (San Diego, USA, Academic Press).
- JARVIS, E. E., CLARK, K. L., und SPRAGUE, G. F., JR.** (1989). The yeast transcription activator PRTF, a homolog of the mammalian serum response factor, is encoded by the *MCM1* gene. *Genes Dev* **3**, 936-945.
- JEDDELOH, J. A., STOKES, T. L., und RICHARDS, E. J.** (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* **22**, 94-97.
- JEFFREY, P. D., RUSSO, A. A., POLYAK, K., GIBBS, E., HURWITZ, J., MASSAGUE, J., und PAVLETICH, N. P.** (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-320.
- JOHNSON, A. D.** (1995). Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 552-558.
- JOHNSON, N., und VARSHAVSKY, A.** (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10340-10344.
- KAHMANN, R., und BASSE, C.** (2001). Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Curr Opin Microbiol* **4**, 374-380.
- KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996). Self/nonself recognition in fungi: old mysteries and simple solutions. *Cell* **85**, 145-148.
- KAHMANN, R., BASSE, C., FELDBRÜGGE, M., und KÄMPER, J.** (2000a). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In Fungal Pathology, J. W. Kronstad, ed. (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers).
- KAHMANN, R., ROMEIS, T., BÖLKER, M., und KÄMPER, J.** (1995). Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 559-564.
- KAHMANN, R., STEINBERG, G., BASSE, C., und KÄMPER, J., eds.** (2000b). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers).
- KAISER, C., MICHAELIS, S., und MITCHELL, A.** (1994). *Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- KÄMPER, J., REICHMANN, M., ROMEIS, T., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- KANG, S.** (1993). Functional domains of the transcriptional activator NUC-1 in *Neurospora crassa*. *Gene* **130**, 259-264.
- KANG, S., und METZENBERG, R. L.** (1990). Molecular analysis of *nuc-1+*, a gene controlling phosphorus acquisition in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* **10**, 5839-5848.
- KANG, S., und METZENBERG, R. L.** (1993). Insertional mutagenesis in *Neurospora crassa*: cloning and molecular analysis of the *preg+* gene controlling the activity of the transcriptional activator NUC-1. *Genetics* **133**, 193-202.

- KARCHIN R., K. K. A. H., D.** (2001). Classifying G-Protein Coupled Receptors with Support Vector Machines. *Bioinformatics in press*.
- KEON, J. P., WHITE, G. A., und HARGREAVES, J. A.** (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **19**, 475-481.
- KIM, Y. K., LIU, Z. M., LI, D., und KOLATTUKUDY, P. E.** (2000). Two novel genes induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia. *J Bacteriol* **182**, 4688-4695.
- KLEIN, L. L., und LI, L.** (1999). Design and preparation of cyclopeptamine antifungal agents. *Curr Pharm Des* **5**, 57-71.
- KOJIC, M., und HOLLOMAN, W. K.** (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol* **46**, 333-338.
- KOLATTUKUDY, P. E., ROGERS, L. M., LI, D., HWANG, C. S., und FLAISHMAN, M. A.** (1995). Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4080-4087.
- KROGH, A., LARSSON, B., VON HEIJNE, G., und SONNHAMMER, E. L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-580.
- KRONSTAD, J.** (1997). Virulence and cAMP in smuts, blasts and blights. *Trends Plant Sci* **2**, 193 - 199.
- KRONSTAD, J. W., und LEONG, S. A.** (1989). Isolation of two alleles of the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 978-982.
- KRONSTAD, J. W., und LEONG, S. A.** (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-1395.
- KRONSTAD, J. W., und STABEN, C.** (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annu Rev Genet* **31**, 245-276.
- KRONSTAD, J. W., WANG, J., COVERT, S. F., HOLDEN, D. W., MCKNIGHT, G. L., und LEONG, S. A.** (1989). Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene* **79**, 97-106.
- KRÜGER, J.** (1999) Der cAMP-Weg und sein Einfluß auf Pheromonsignaltransduktion und Pathogenität in *Ustilago maydis*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- KRÜGER, J., LOUBRADOU, G., REGENFELDER, E., HARTMANN, A., und KAHMANN, R.** (1998). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**, 193-198.
- KRÜGER, J., LOUBRADOU, G., WANNER, G., REGENFELDER, E., FELDBRUGGE, M., und KAHMANN, R.** (2000). Activation of the cAMP pathway in *Ustilago maydis* reduces fungal proliferation and teliospore formation in plant tumors. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1034-1040.
- KUES, U., und CASSELTON, L. A.** (1992). Homeodomains and regulation of sexual development in basidiomycetes. *Trends Genet* **8**, 154-155.
- LAEMMLI, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LASER, H., BONGARDS, C., SCHULLER, J., HECK, S., JOHANSSON, N., und LEHMING, N.** (2000). A new screen for protein interactions reveals that the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins Nhp6A/B are involved in the regulation of the *GAL1* promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13732-13737.
- LENGELER, K. B., DAVIDSON, R. C., D'SOUZA, C., HARASHIMA, T., SHEN, W. C., WANG, P., PAN, X., WAUGH, M., und HEITMAN, J.** (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-785.
- LIANG, Z., und BIGGIN, M. D.** (1998). Eve and ftz regulate a wide array of genes in blastoderm embryos: the selector homeoproteins directly or indirectly regulate most genes in *Drosophila*. *Development* **125**, 4471-4482.
- LOUBRADOU, G., BRACHMANN, A., FELDBRUGGE, M., und KAHMANN, R.** (2001). A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **40**, 719-730.
- LUPAS, A., VAN DYKE, M., und STOCK, J.** (1991). Predicting coiled coiles from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- LUTTRELL, L. M., FERGUSON, S. S., DAAKA, Y., MILLER, W. E., MAUDSLEY, S., DELLA ROCCA, G. J., LIN, F., KAWAKATSU, H., OWADA, K., LUTTRELL, D. K., et al.** (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661.
- MADDEN, S. L., CREASY, C. L., SRINIVAS, V., FAWCETT, W., und BERGMAN, L. W.** (1988). Structure and expression of the *PHO80* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **16**, 2625-2637.

- MADHANI, H. D., und FINK, G. R.** (1998). The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* **8**, 348-353.
- MAGAGNIN, S., WERNER, A., MARKOVICH, D., SORRIBAS, V., STANGE, G., BIBER, J., und MURER, H.** (1993). Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5979-5983.
- MARCK, C.** (1988). 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res* **16**, 1829-1836.
- MAYORGA, M. E., und GOLD, S. E.** (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol* **34**, 485-497.
- MÜLLER, E., und LOEFFLER, W.** (1992). *Mykologie* (Stuttgart, New York, Thieme Verlag).
- MÜLLER, P., AICHINGER, C., FELDBRÜGGE, M., und KAHMANN, R.** (1999). The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-1017.
- NAKAI, K., und HORTON, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- NAKAI, K., und KANEHISA, M.** (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911.
- NEER, E. J.** (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., und VON HEIJNE, G.** (1997a). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., und VON HEIJNE, G.** (1997b). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**, 581-599.
- O'NEILL, E. M., KAFFMAN, A., JOLLY, E. R., und O'SHEA, E. K.** (1996). Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* **271**, 209-212.
- OHNO, C. K., UEDA, H., und PETKOVICH, M.** (1994). The Drosophila nuclear receptors FTZ-F1 alpha and FTZ-F1 beta compete as monomers for binding to a site in the fushi tarazu gene. *Mol Cell Biol* **14**, 3166-3175.
- OLIVEIRA, L., PAIVA, A. C., und VRIEND, G.** (1999). A low resolution model for the interaction of G proteins with G protein-coupled receptors. *Protein Eng* **12**, 1087-1095.
- PICK, L., SCHIER, A., AFFOLTER, M., SCHMIDT-GLENEWINKEL, T., und GEHRING, W. J.** (1990). Analysis of the *ftz* upstream element: germ layer-specific enhancers are independently autoregulated. *Genes Dev* **4**, 1224-1239.
- PODILA, G. K., ROGERS, L. M., und KOLATTUKUDY, P. E.** (1993). Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol* **103**, 267-272.
- POON, R. Y., und HUNTER, T.** (1995). Cell regulation. Innocent bystanders or chosen collaborators? *Curr Biol* **5**, 1243-1247.
- PUHALLA, J. E.** (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-474.
- PUHALLA, J. E.** (1970). Genetic studies on the *b* incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **16**, 229-232.
- QUADBECK-SEEGER, C., WANNER, G., HUBER, S., KAHMANN, R., und KÄMPER, J.** (2000). A protein with similarity to the human retinoblastoma binding protein 2 is essential for spore formation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **38**, 154-166.
- RECHSTEINER, M., und ROGERS, S. W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-271.
- REDD, M. J., ARNAUD, M. B., und JOHNSON, A. D.** (1997). A complex composed of Tup1 and Ssn6 represses transcription in vitro. *J Biol Chem* **272**, 11193-11197.
- REGENFELDER, E., SPELLIG, T., HARTMANN, A., LAUENSTEIN, S., BOLKER, M., und KAHMANN, R.** (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *EMBO J* **16**, 1934-1942.
- RICH, R. L., und MYSZKA, D. G.** (2001). BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J Mol Recognit* **14**, 223-228.
- ROGERS, S., WELLS, R., und RECHSTEINER, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.

- ROMEIS, T., BRACHMANN, A., KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (2000). Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- ROMEIS, T., KÄMPER, J., und KAHMANN, R. (1997). Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1230-1234.
- ROST, B. (1996). PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol* **266**, 525-539.
- ROTH, A. F., und DAVIS, N. G. (1996). Ubiquitination of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* **134**, 661-674.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., und MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- SANCHEZ-MARTINEZ, C., und PEREZ-MARTIN, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* - similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* **4**, 214-221.
- SANGER, F., NICKLEN, S., und COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- SCHÄFER, W. (1994). Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annu Rev Phytopathol* **32**, 461 - 477.
- SCHAUWECKER, F., WANNER, G., und KAHMANN, R. (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**, 617-625.
- SCHLESINGER, R., KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (1997). The homeodomains of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol Gen Genet* **254**, 514-519.
- SCHMITT, M. E., BROWN, T. A., und TRUMPOWER, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**, 3091-3092.
- SCHULTZ, J., COPLEY, R. R., DOERKS, T., PONTING, C. P., und BORK, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 231-234.
- SCHULTZ, J., MILPETZ, F., BORK, P., und PONTING, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.
- SCHULZ, B., BANUETT, F., DAHL, M., SCHLESINGER, R., SCHÄFER, W., MARTIN, T., HERSKOWITZ, I., und KAHMANN, R. (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- SCHWOB, E., und NASMYTH, K. (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**, 1160-1175.
- SHACHAF, C., SKORECKI, K. L., und TZUKERMAN, M. (2000). Role of AP2 consensus sites in regulation of rat Npt2 (sodium-phosphate cotransporter) promoter. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F406-416.
- SHEEN, J., HWANG, S., NIWA, Y., KOBAYASHI, H., und GALBRAITH, D. W. (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* **8**, 777-784.
- SHERMAN, F., FINK, G. R., und HICKS, J. B. (1996). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- SIKORSKI, R. S., und HIETER, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- SMITH, R. L., und JOHNSON, A. D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **25**, 325-330.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W. (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- SPELLIG, T., BÖLKER, M., LOTTSPEICH, F., FRANK, R. W., und KAHMANN, R. (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- SPELLIG, T., BOTTIN, A., und KAHMANN, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- STAMATAKI, D., KASTRINAKI, M., MANKOO, B. S., PACHNIS, V., und KARAGOGEOS, D. (2001). Homeodomain proteins Mox1 and Mox2 associate with Pax1 and Pax3 transcription factors. *FEBS Lett* **499**, 274-278.

- STEINBERG, G., SCHLIWA, M., LEHLER, C., BÖLKER, M., KAHMANN, R., und MCINTOSH, J. R. (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111**, 2235-2246.
- STRUHL, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**, 1-4.
- STRUHL, K., KADOSH, D., KEAVENEY, M., KURAS, L., und MOQTADERI, Z. (1998). Activation and repression mechanisms in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 413-421.
- TANAKA, K., MASU, M., und NAKANISHI, S. (1990). Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* **4**, 847-854.
- TANAKA, K., und OKAYAMA, H. (2000). A pcl-like cyclin activates the Res2p-Cdc10p cell cycle "start" transcriptional factor complex in fission yeast. *Mol Biol Cell* **11**, 2845-2862.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., und GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- TIMBERLAKE, W. E. (1986). Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. In *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, J. Bailey, ed. (Berlin, Heidelberg, Springer Verlag), pp. 343-357.
- TOH-E, A., und SHIMAUCHI, T. (1986). Cloning and sequencing of the *PHO80* gene and *CEN15* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2**, 129-139.
- TROUTT, A. B., MCHYZER-WILLIAMS, M. G., PULENDRAN, B., und NOSSAL, G. J. (1992). Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single- sided specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9823-9825.
- TSUKUDA, T., CARLETON, S., FOTHERINGHAM, S., und HOLLOMAN, W. K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- UESONO, Y., TOKAI, M., TANAKA, K., und TOHE, A. (1992). Negative regulators of the PHO system of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of *PHO80* and *PHO85*. *Mol Gen Genet* **231**, 426-432.
- URBAN, M., KAHMANN, R., und BÖLKER, M. (1996a). The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet* **250**, 414-420.
- URBAN, M., KAHMANN, R., und BÖLKER, M. (1996b). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- VARGA-WEISZ, P. D., und BECKER, P. B. (1998). Chromatin-remodeling factors: machines that regulate? *Curr Opin Cell Biol* **10**, 346-353.
- VARSHAVSKY, A., TURNER, G., DU, F., und XIE, Y. (2000). Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem* **381**, 779-789.
- VERSELE, M., LEMAIRE, K., und THEVELEIN, J. M. (2001). Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep* **2**, 574-579.
- WANG, J., HOLDEN, D. W., und LEONG, S. A. (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 865-869.
- WANG, R. L., STEC, A., HEY, J., LUKENS, L., und DOEBLEY, J. (1999). The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**, 236-239.
- WEBER, H. (1993). *Allgemeine Mykologie* (Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag).
- WENDLAND, J., VAILLANCOURT, L. J., HEGNER, J., LENGELER, K. B., LADDISON, K. J., SPECHT, C. A., RAPER, C. A., und KOTHE, E. (1995). The mating-type locus *B alpha 1* of *Schizophyllum commune* contains a pheromone receptor gene and putative pheromone genes. *Embo J* **14**, 5271-5278.
- WÖSTEN, H. A., BOHLMANN, R., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F., BÖLKER, M., und KAHMANN, R. (1996). A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 4274-4281.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., und MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- YASUOKA, A., ABE, K., SAIGO, K., ARAI, S., und EMORI, Y. (1995). Molecular cloning of a fish gene encoding a novel seven-transmembrane receptor related distantly to catecholamine, histamine, and serotonin receptors. *Biochim Biophys Acta* **1235**, 467-469.



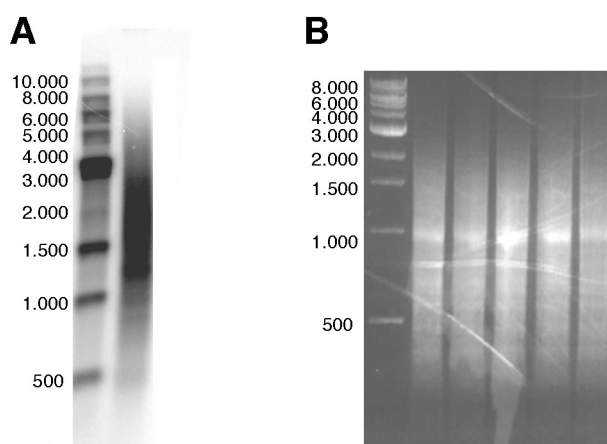
**YUSSA, M., LOHR, U., SU, K., und PICK, L.** (2001). The nuclear receptor Ftz-F1 and homeodomain protein Ftz interact through evolutionarily conserved protein domains. *Mech Dev* **107**, 39-53.



## 6. Anhang

### 6.1 Konstruktion und Analyse einer *U. maydis* cDNA-Expressionsbank

Eine *U. maydis* cDNA-Expressionsbank wurde in Anlehnung an das Protokoll des SMART<sup>TM</sup>cDNA Library Construction Kit von Clontech hergestellt. Dazu wurde RNA aus Pilzmaterial einer Mischung der kompatiblen Wildtyp-Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*), nach 12, 24 und 48 h Inkubation bei 28°C auf aktivkohlehaltigen CM-Medium isoliert. Eine Mischung von kompatiblen Wildtyp-Stämmen enthält zu den gewählten Zeitpunkten einerseits haploide Zellen und andererseits dikaryotische Zellen, wodurch ein breites Spektrum der Genexpression verschiedener Stadien des Lebenszyklus von *U. maydis* abgedeckt wird (Daten nicht gezeigt). Nach der Anreicherung von polyadenylierter mRNA wurde diese mit Hilfe des Oligo(d)T-Oligonukleotids OGW45 revers transkribiert. Dieses Oligonukleotid ist so konzipiert, dass es am Übergang zwischen dem 3'-untranslatierten Bereich und dem polyA-Schwanz eines mRNA-Moleküls binden kann, wodurch neu synthetisierte cDNA-Moleküle theoretisch nur 16 Thymin-Resten an ihren 3'-Enden aufweisen. Zugleich führt OGW45 eine *Sfi*I-Schnittstelle in die entstehenden cDNA-Moleküle ein. Beim Umschreiben der mRNAs in cDNAs wird die Fähigkeit der RNaseH-inaktiven Reversen Transkriptase SuperscriptII<sup>TM</sup> (GibcoBRL, Life Technologies) genutzt, beim Erreichen des 5'-Endes einer mRNA-Matrize 1 bis 3 Cytosin-Reste anzuhängen.



**Abbildung 37: cDNA-Erst- und Zweitstrangsynthese.** A) cDNA-Erststrangsynthese, die Zahlenwerte geben die Größe der Fragmente des verwendeten DNA-Größenstandards in bp an. B) cDNA-Zweitstrangsynthese, die Zahlenwerte geben die Größe der Fragmente des verwendeten DNA-Größenstandards in bp an.

An diesen Überhang kann mittels 3 Guanosin-Resten das Adapter-Oligonukleotid OGW44 binden, welches die Reverse Transkriptase durch einen Wechsel der Matrize als neue Vorlage benutzt, um den Minus-cDNA-Strang zu verlängern.

Dadurch entsteht einerseits eine Bindestelle für das komplementäre Oligonukleotid OGW40 und andererseits wird eine *Sfi*I-Schnittstelle generiert. Auf diese Weise kann anschließend spezifisch der Plus-cDNA-Strang synthetisiert werden. Die so generierten ds cDNA-Moleküle wurden nach ihrer Länge in 9 Fraktionen aufgeteilt und über die zwei zueinander asymmetrischen *Sfi*I-Schnittstellen gerichtet in das Plasmid pGE101 eingebracht. Die Transkription der cDNA-Moleküle wird in diesem Plasmid, das autonom in *U. maydis* repliziert, vom starken, konstitutiven *hsp70*-Promotor (Holden et al., 1989) initiiert und vom 3'-untranslatierten Bereich des *mfa2*-Gens (Bölker et al., 1992) terminiert.

Zudem enthält pGE101 eine Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion in *U. maydis*. Insgesamt wurden etwa  $1,6 \times 10^6$  unabhängige *E. coli*-Transformanten erzeugt. Während der cDNA Erst- und Zweitstrangsynthese wurde beobachtet, dass das Maximum der Verteilung der cDNA-Moleküle bei 1.400 bis 2.000 bp, die Untergrenze bei  $< 500$  bp und die Obergrenze bei  $> 4.000$  bp liegt (Abbildung 37, Daten nicht gezeigt), wobei ein später durchgeführte Analyse des *Ustilago maydis* Genoms zeigte, dass die durchschnittliche Größe von ORFs bei etwa 1.700 bp liegt (J. Kämper, pers. Mitteilung). Die Zahl der Klone, die die einzelnen Fraktionen enthalten, sollte daher die relative Größenverteilung von Transkripten widerspiegeln (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Fraktionierung und Verteilung der cDNA-Klone**

Fraktion Nummer	mittlere cDNA- Fragmentlänge in bp	Zahl der <i>E. coli</i> - Klone
1	200 – 400	ca. 150.000
2	400 – 600	ca. 150.000
3	600 – 900	ca. 200.000
4	900 – 1.200	ca. 250.000
5	1.200 – 1.500	ca. 350.000
6	1.500 – 2.000	ca. 250.000
7	2.000 – 2.500	ca. 100.000
8	2.500 – 3.000	ca. 100.000
9	3.000 – 5.000	ca. 50.000

Um die cDNA-Expressionsbank auf ihre Repräsentativität zu überprüfen, wurden zufällig 10 Klone aus jeder Fraktion ausgewählt und deren Plasmide analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass Klone jeder Fraktion untereinander ähnlich große, aber verschiedene cDNA-Fragmente enthalten (Daten nicht gezeigt). Die Größe der klonierten cDNA-Fragmente korreliert bis auf wenige Ausnahmen mit der angelegten Größenfraktionierung vor der Klonierung der cDNAs. In einem Fall wurde ein religiertes Plasmid isoliert (Daten nicht gezeigt). Drei der 60 Plasmide enthalten zwei oder drei cDNA-Inserts, was darauf

zurückzuführen ist, dass diese Plasmide aus zwei bzw. drei Vektorrückgraten samt cDNA-Inserts bestehen (Daten nicht gezeigt), was zu Problemen bei der Sequenzierung der Plasmide führt (Daten nicht gezeigt). Mittlerweile wurden mehrere cDNAs mit 5'-untranslatierten Bereichen einer Länge von 50 bis 500 bp aus der cDNA-Bibliothek isoliert (A. Brachmann, H. Eichhorn, C. Schubert, Daten nicht gezeigt).

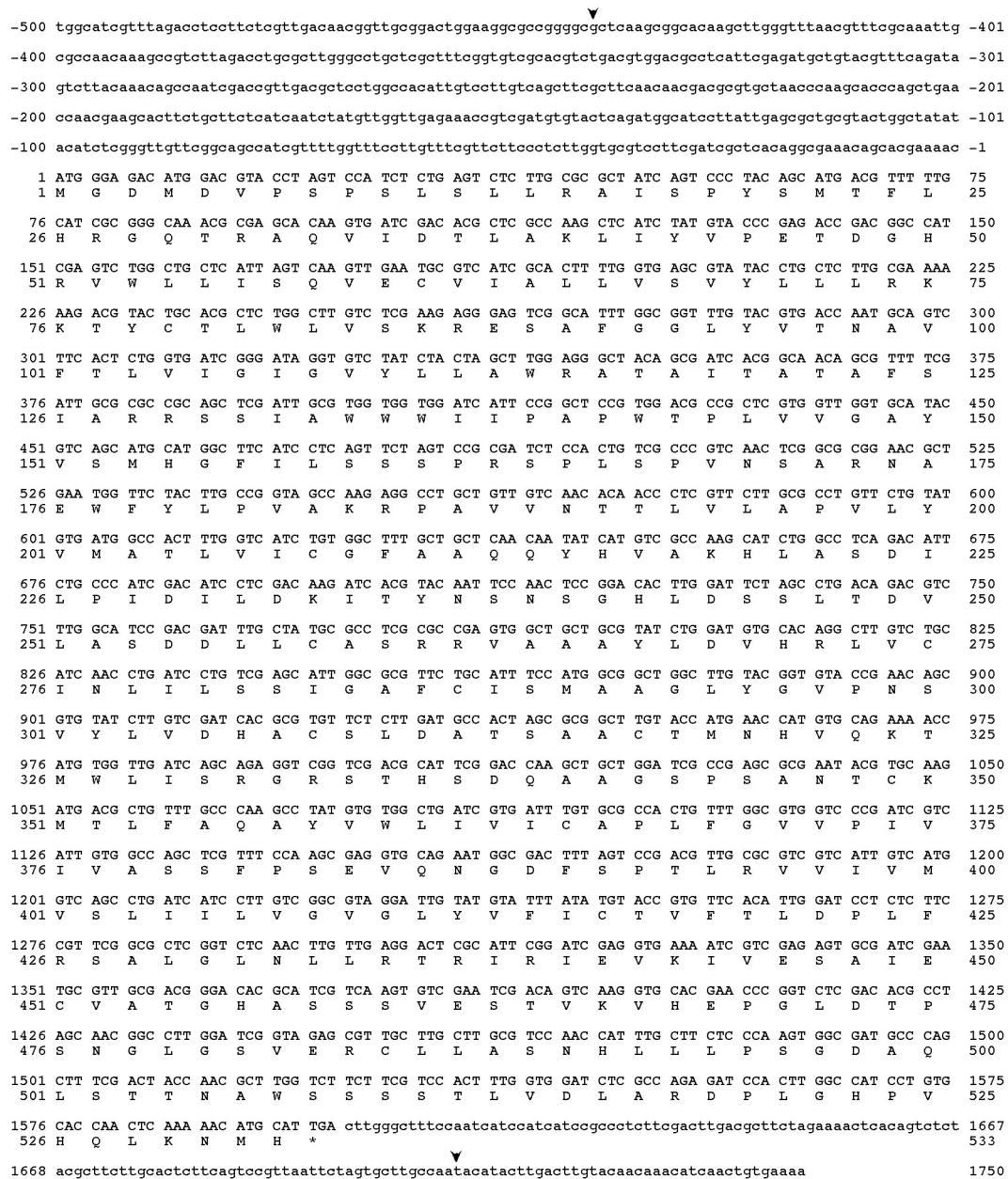
**Tabelle 10: Reisolierung der cDNA-Plasmide**

Bezeichnung der <i>U. maydis</i> Transformante	Anzahl der resolierten Plasmide	Bezeichnung der resolierten Plasmide	Anzahl der cDNA-Inserts in den resolierten Plasmiden
GWC4-2	1	pCDNA4-2-5	3
GWC5-2	1	pCDNA5-2-5	1
GWC5-3	2	pcDNA5-3-1A	2
		pcDNA5-3-1B	1
GWC5-4	2	pcDNA5-4-2A	1
		pcDNA5-4-2B	2
GWC5-5	2	pcDNA5-5-5A	1
		pcDNA5-5-5B	2
GWC5-6	2	pCDNA5-6-5A	1
		pCDNA5-6-5B	1

**Tabelle 11: Sequenzähnlichkeiten der cDNA-Inserts der resolierten Plasmide**

Insert	Voll-Länge cDNA	Insert-größe	Ähnlichkeit des vom cDNA-Insert abgeleiteten Proteins zu	Identität	angenommene Funktion
1 aus pCDNA4-2-5	nein	ca. 1.500 bp	Car1 ( <i>Podospora anserina</i> )	37%	Peroxisomen Assemblierungsprotein
2 aus pCDNA4-2-5	nein	ca. 1.250 bp	keine	-	-
3 aus pCDNA4-2-5	nein	ca. 1.000	Act1 ( <i>Acanthamoeba castellanii</i> )	86%	Aktin, Zytoskelett
1 aus pCDNA5-2-5	ja	ca. 1.650 bp	Preg1 ( <i>Neurospora crassa</i> )	41%	Nuc-1 Negativ regulatorisches Protein
1 aus pcDNA5-3-1A	nein	ca. 1.600 bp	mts4 ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )	45%	26s Proteasom Regulatorische Untereinheit
2 aus pcDNA5-3-1A	nein	ca. 1.000 bp	Pdi1 ( <i>Ustilago maydis</i> )	100%	Proteindisulfid-Isomerase
1 aus pCDNA5-3-1B	nein	ca. 1.000 bp	Pdi1 ( <i>Ustilago maydis</i> )	100%	Proteindisulfid-Isomerase
1 aus pCDNA5-4-2A	nein	ca. 1.000 bp	Pdi1 ( <i>Ustilago maydis</i> )	100%	Proteindisulfid-Isomerase
1 aus pCDNA5-4-2B	nein	ca. 1.700 bp	Agr_pTi_129p ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	48%	putative GMC-Typ Oxidoreduktase PA3710
2 aus pCDNA5-4-2B	nein	ca. 1.600 bp	Translatierter ORF auf Cosmid 3D11 ( <i>Streptomyces coelicolor</i> )	35%	putativer ABC-Transporter
1 aus pCDNA5-5-5A	nein	ca. 1.600 bp	mts4 ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )	45%	26s Proteasom Regulatorische Untereinheit
1 aus pCDNA5-5-5B	nein	ca. 1.700 bp	Agr_pTi_129p ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	48%	putative GMC-Typ Oxidoreduktase PA3710
2 aus pCDNA5-5-5B	nein	ca. 1.000 bp	Pdi1 ( <i>Ustilago maydis</i> )	100%	Proteindisulfid-Isomerase
1 aus pCDNA5-6-5A	ja	ca. 1650 bp	Preg1 ( <i>Neurospora crassa</i> )		Nuc-1 Negativ regulatorisches Protein
1 aus pCDNA5-6-5B		ca. 1.600 bp	mts4 ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )	45%	26s Proteasom Regulatorische Untereinheit





**Abbildung 39: DNA- und Proteinsequenz von *dkh6*.** In Großbuchstaben ist der kodierende Bereich von *dik6* für ein Protein von 532 Aminosäuren gezeigt. In Kleinbuchstaben sind stromaufwärts und stromabwärts Sequenzen dargestellt. Die Pfeilspitzen kennzeichnen Anfang und Ende der cDNA.



▼ agtcgogtgttccggaatgcttccgacgggttgcogctgtgtgtgaa -1

```

-47
1 ATG ATG GAA TCC GTC TCA TCC AAA TCG TCA CCT TCA CGT TCG TCG GCG CAC GTT GCT CCT GCC TTT CCC ACG CCT 75
1 M M E S V S S K S S P S R S S A H V A P A F P T P 25
76 GGT ACG GTT GCT CCG GCA ACA GTC ACC GTT GCT TCA GCA CAC TCA GCT TCA CCT TTG CAC TTT TCC GCT TCA GCG 150
26 G T V A P A T V T V A S A H S A S P L H F S A S A 50
151 GTC AAT GCA CTG AGC GCG CCC GCT GAG CAT TCT TCT TCA TCC AAA GCC ACA CCA CCA GCT ATA CCT CGG CCA GCT 225
51 V N A L S A P A E H S S S S K A T P P A I P R P A 75
226 GGA TCA TCA TCA TCA TCA TCG GCA TCG GTA TTG TCA CCG TCA ACA ACG TCG GTA GCA ACA CAA ACG GCA CCT TCA 300
76 G S S S S S A S V L S P S T T S V A T S 100
301 ATA TCA GCA GCC AAC TCC AAC ACC AAG GTA CTG CCA TAC CTC TTT GAC GAT GCA CAG CTT GAC GAC GTC CTC GTT 375
101 I S A A N S N T K V L P Y L F D D A Q L D D V L V 125
376 CTC GTC GTC GAC ATG CTC GTC AGG CTC ACT GAA CAC AAC GAT TCG CTT CCA CTC GAC CCA TCT GCT CTT ACG CGC 450
126 L V V A M L V R L Y I D R V S T T S V L P L D P S L D P S T G T T A C G C 150
451 TTC CAC TCT CGC GCA ACG CCC AAC ATC TCG CTC TCG GCC TAT CTG CGC CGC ATT GCA AAG TAC ACC TCA ATC GAA 525
151 F H S R A T P N I S L S A Y L R R I A K Y T S I E 175
526 AAG TGC TGT GTG CTC ATC TTG CTC GTC TAC ATT GAC CGC GTC TGC GAA CGT TTG GAA GGC TTT ACC ATC TGC GGC 600
176 K C S S L I L L V Y I D R V S T T S V L P L E G R L E G 200
601 TTG ACC GTG CAT CGC TTC ATC TGC GCT GCC ATC CTC TGC GCC TCC AAG GCG CTG TGC GAT GCA TTC AAC ACC AAC 675
201 L T V H R F I C A A I L C A S K A L C D A F N T N 225
676 GAG CAC TAC GCC AAA GTC GGA GGT ATC AGC TTG CAG GAG ATC AAT CTG CTC GAA AAG GAG TTC TTG CAG ATC ATT 750
226 I H L V A K L V R A I S L D R V S T T S V L L E K E I I 250
751 GAC TGG AGG TTG ATC TGT GGA GGC GCT GAG CTG CAG CAT TAC TAT GCC AGC TTG GTG AGA AAT CAT AAG GAT TAT 825
251 D W R L I C G G A E L Q H Y Y A S L V R N H K D Y 275
826 GTG TTG GAT GAG CCC AAG CGT GCT GGA CAG AAT TTA CAG GAG CAG AAG CAG GAG CAC GGC TTG GCG GCG ATG GAG 900
276 V L D E P K R A S L Q N L Q G E Q K Q E H G L A A M E 300
901 CTC GAT GGT GCA GAA GCG AGC GCT GGC TCA GAT ATG AAT GGT CAT GAT GGG ACG AGT GGC AAT ACG GCT ACC GAT 975
301 L D G A E A S A G S D M N G H D G T S G N T A T D 325
976 GGT TCC ATC CGA GCA GGA GCA ACA GCA CAA GCA GCG AGC AGT CAG CAC AGC TCA CCT TTT CCG CTT CCC ATC AGC 1050
326 G S I R A K A T A A S S S P F P L Q I I 350
1051 AGC AGC AAT AGC AAC AGC AAC ACC AGC ACC AGT GCT AGC CCC TTC ACC ACT TCC ACT GCC ACC AAT GGA AGC GGT 1125
351 S S N S N S N T S T S A S P F T T S T A T N G S G 375
1126 CGA TCG CTG ACA GGT GTG GCG ACT AGC TCA GCA TCG GGT AGC AGC AGT GGC GAT AGT CAG AGA GGT GCA GCG GCG 1200
376 R S L T G V A T S S A S S G D S Q R G A A I 400
1201 GGG TCA TCG TCG TCG ATT GTC ACG AGT CCA ACA TCG GCC ATG CAA GTC GAT GCC GAA CCT TGG ATG ACA TCG CAG 1275
401 G S S S S I V T S P T S A M Q V D A E P W M T S Q 425
1276 GTG GCA GCA CCA GCG ATG ATG AAT AGG AGA AGG AAA GAC GAA CAT CGA ACG CCT CCT TCG CCG CTT GGC CAA TCA 1350
426 V A A P A M M N R R R K D E H R T P P S P L G Q S 450
1351 CAG GTG CAT GCA CCC CAA AAC GGT GGA TCC AGC GTC AAC GCG GTG CAA ACC AAT GGT CAT GCC TCG TCT ACG CAA 1425
451 Q V H A P Q N G G S S V N A V Q T N G H A S S T Q 475
1426 CAA GCT CAA CAT TCT ACA GTC AGT GCG AAT GCC GAT GCG TAC AAA CCG ACG CGC TTC GAT CAC CCT CCT CGC CAA 1500
476 Q A Q H S T V S A N A D A Y K R T R F D H P P R Q 500
1501 TGA gcttgcgatgctcctcgccatctcaacgcagcttagagccgcacctgcatcttccctgcccgaactcaaacagatgagctccggggccggtctgta 1599
501 * 501
1600 ttatgtaacactagatctcaatccacctccctttcaactg 1640

```

**Abbildung 40: DNA- und Proteinsequenz von *drfl*.** In Großbuchstaben ist der kodierende Bereich von *drfl* für ein Protein von 500 Aminosäuren gezeigt. In Kleinbuchstaben sind stromaufwärts und stromabwärts Sequenzen dargestellt. Die Pfeilspitzen kennzeichnen Anfang und Ende der cDNA.



# Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei meiner Frau bedanken. Für ihre Liebe, ihr Verständnis, ihre Nachsicht, ihre Geduld, ihre dauerhafte und große Unterstützung und für den bedingungslosen Rückhalt, den sie mir immer gegeben hat. Ohne Dich wäre alles nichts. Auch meinen Eltern möchte ich meinen größten Dank aussprechen. Denn ich konnte mir ihres Verständnisses, ihres Einsatzes und ihrer Hilfe, auf die ich immer zurückgreifen durfte, wenn es am nötigsten war, sicher sein. All das war unendlich viel wert für mich.

Regine Kahmann gilt mein Dank für die herzliche Wiederaufnahme in ihre Gruppe, ihr Vertrauen und die Möglichkeit, die interessante Thematik zu bearbeiten und diese Arbeit anzufertigen. Ganz besonders bedanken möchte ich mich für ihre Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei Jörg Kämper für seine Unterstützung, seine Hilfe, seine Ratschläge und Ideen bedanken. Auch für die Freiheiten, die er mir ließ, meinen Interessen zu folgen und für das Vertrauen, das er immer in mich setzte, sei ihm gedankt. Bei Michael Bölker möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir seine Art wissenschaftlich zu denken und zu arbeiten beibrachte. Auch für seine Denkanstöße, Ideen und Hilfen sowie für sein großzügiges Angebot möchte ich mich bedanken. Bei Georgi möchte ich mich bedanken, dass er die Dinge immer auf den Punkt bringt, immer Zeit hatte für gute Gespräche und mich immer wieder aufbaute, wenn es notwendig gewesen ist. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. Batschauer für ihre Beteiligung als Mitglieder der Promotionskommission.

Mein herzlichster Dank gilt nun an erster Stelle meinem Partner des "Teams", Andreas, für die tolle und ereignisreiche Zeit, für die hervorragende Zusammenarbeit, seine Intuition und für alles, was ich sonst von ihm gelernt habe. Abram, es war mir eine große Ehre! Ich möchte keine Minute missen. Natürlich möchte ich mich bei Siegi für alle Ihre unzähligen guten Taten, die tolle Zusammenarbeit über viele Jahre und für das Seite an Seite durch dick und dünn gehen, ganz besonders herzlich bedanken! Es war große Klasse und mir ebenfalls eine Ehre! Ebenfalls ganz herzlicher Dank an Philip für seine Anregungen, Unterstützung und Hilfe, die mir sehr viel wert war, und natürlich im Besonderen für die gemeinsame Zeit in Marburg. Es hat mich gefreut! Bei Michael bedanke ich mich für gute, witzige Gespräche, Ideen und seine Meinung zum Thema, bei Olli für seine Sicht der Dinge, seine Hilfe, die immer kam, wenn sich sie benötigte, im Besonderen zum Ende der Doktorarbeit, bei Alex für seine Art, ein klasse Typ zu sein, bei Volker für Lässigkeit und die Anhängerkupplung, bei Martina für ihre ruhige Art. Vielen Dank an die "alten Münchner"! Aichi nicht nur für Echangé, sondern auch dafür, dass es großen Spass gemacht hat mit ihm zu plaudern, zu denken und natürlich zu forschen; Julia für zielgerichteten Forschergeist, für ihre ganz besondere Art und ihre Loyalität; Mic für klasse Ideen, für Ausgeglichenheit, für Latein und Fußball; Robert dafür, dass immer Verlass auf ihn war und er immer Zeit hatte, wenn es mal wieder brannte; Heidi für ihre Herzlichkeit und Offenheit; Karl-Heinz für gute und vor allem interessante Gespräche, seine Ruhe und für das Münchner Männerfrühstück; Johannes für die fränkische Komponente in Oberbayern; Ruth und Francesca für die grüne Komponente, für Köln und Treviso; Roland für die Tour-de-France, Schokolade und viele Tips; Wolfi für Rex und Kult-Status; Michael für Gelassenheit, Spass an der Sache und seine Originalität; Christine für ihre italiensche Ader; Grubi für Einführung in PC-Betriebssysteme und dass man dabei noch Spass haben kann; Alexandra für Hyperaktivität; Andreas für Andrééé, Ramersdorf und Golfen; den drei Steffis dafür, dass Leben ins Labor kam; Zalán für seine unnachahmliche Art; Marc für die Exkurse in die Schweiz; Andreas für ihn und seine stoische Ruhe; Ralph fürs Schwäbische und die klasse Vorlage, die ich von ihm bekommen habe; Tilman und Tina für ihre Unterstützung aus der Ferne! Schön, dass ihr alle da wart.

An die ehemaligen Insassen des b-Labors geht auch ein großes Dankeschön: Katze für Bayern, Österreich und ihn als Typ (ja gut ähh); Tobi für gelbe, rote und blaue Sonnenbrillen, Datenbankwissen, gute Gespräche (krass hoid); Angelika für Hessen; Karo für das Wir-Gefühl; Cosima für die Kultur und Anne für gemeinsame Zeiten im Isotopenlabor. Ein Dankeschön an die Praktikanten Tobias, Sascha und Miro für euren Einsatz und die gute Zusammenarbeit. Auch ich habe dabei viel gelernt. Bei William für seine Einzigartigkeit und seine gute Laune, bei Joaquín und Lúbrica für die Auflockerung des Laboralltags, bei Karin für die sehr gute Zusammenarbeit und ihre Gelassenheit, bei Gabriel für die französische Komponente im Team, bei Herrn Haid für nette Plaudereien, bei Christian Koch für seine Tips und Ideen, bei Christoph und Gero für ihre Hilfe. An alle "Marburger" einen schönen Dank, dass ihr mit eurer ganz eigenen Art immer Leben und Abwechslung ins Labor gebracht habt, im Besonderen möchte ich mich bei Isabell für die Hilfe beim für mich lästigen Mikroskopieren bedanken und bei Mario ganz besonders für die große Hilfe beim Korrekturlesen. Und nicht vergessen möchte ich die Damen der Spülküche in München und Ria in Marburg, die Damen des Sekretariats in München und Marburg und die helfenden Hände der Werkstatt in Marburg, die immer für einen reigungslosen Tagesablauf sorgten. Ein ganz besonderes Dankeschön an Michael Fellner, Peter Bogner, Siegi Streck und Christian Neubert, die vier von der Werkstatt in München.

Bei meinem Freund Robert möchte ich mich für seine Unterstützung, sein offenes Ohr und sein Verständnis über all die vielen Jahre bedanken. Wenn ich jemand vergessen habe, dann verzeiht es mir und seid nicht böse.



# Lebenslauf

- PERSONALIEN** Gerhard Weinzierl  
Geboren am 29. März 1972 in Dachau
- SCHULBILDUNG** 1978-1982 Grundschule Dachau-Süd in Dachau  
1982-1991 Ignaz-Taschner-Gymnasium in Dachau  
Abschluss: Abitur mit der Gesamtnote 1,7
- ERSATZDIENST** 1991-1999 Ersatzdienst als Truppführer Funktrupp und Stellvertretender Leiter des Fernmeldebetriebs bei den Regieeinheiten der Landkreise Dachau und Ebersberg
- STUDIUM** 1991-1993 Grundstudium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Abschluss: Vordiplom der Biologie mit der Gesamtnote 1,5  
1993-1996 Hauptstudium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Immunologie  
Abschluss: Diplom in Biologie mit der Gesamtnote 1,0  
1/96-10/96 Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zum Thema "Charakterisierung einer Zellteilungsmutante von *Ustilago maydis*"  
Betreuer: Prof. Dr. R. Kahmann
- PROMOTION** 1997-2001 Doktorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München und an der Philipps-Universität Marburg zum Thema "Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*"  
Betreuer: PD. Dr. J. Kämper