

**Isolierung und Analyse haploider *Ustilago maydis* Stämme,
die ein *b*-abhängiges Expressionsmuster zeigen**

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Michael Reichmann

München, 02. August 2002

Gutachter: Prof. Dr. R. Kahmann
Prof. Dr. D. Eick
Prof. Dr. C. David
Prof. Dr. M. Boshart

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2003

für Lukas

θαλαττα, θαλαττα
Xenophon, Anab. IV 7, 24.

Zusammenfassung

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

Das Ziel dieser Arbeit war es, regulatorische Gene aus *U.maydis* zu identifizieren, die an der Kontrolle der *b*-abhängigen, pathogenen Entwicklung beteiligt sind. Es wurde versucht, in einem direkten Selektionsprozess haploide, pathogene Stämme zu isolieren, die aus einer REMI-Mutagenese hervorgingen. Um eine möglichst breite Mutagenese zu erreichen, wurde eine neuartige Mutagenese-strategie angewandt, die neben Geninaktivierung ("loss of function") auch eine mögliche Aktivierung der Genexpression der betroffenen Loci ("gain of function") berücksichtigte.

In einer weiteren UV-Mutagenese wurden durch Nutzung von *egl1* als Reportergen Stämme isoliert, die EG-Aktivität zeigten. Die Expression des *b*-abhängigen, aber vermutlich nicht direkt durch das bE/bW-Heterodimer regulierten Gens *egl1* sollte dabei eine Mutation in einem regulatorischen Gen anzeigen, das wiederum unter der Kontrolle von *b* stehen könnte. Es wurde angenommen, dass die interessantesten Stämme neben *egl1* weitere *b*-abhängige Gene exprimieren. Eine komplexe Deregelation der Genexpression *b*-abhängiger Gene in haploiden Zellen sollte die Zentralität des betroffenen Regulators innerhalb der *b*-Regulationskaskade anzeigen.

Die Komplementation des Stammes MR9-1 führte zur Isolierung eines regulatorischen Gens. *hda1* kodiert für ein Protein mit signifikanter Homologie zu Histondeacetylasen und ist an der Kontrolle der differentiellen Genexpression in haploiden und dikaryotischen Zellen, und später an der Sporenentwicklung im Tumor entscheidend beteiligt. Hda1 wirkt in haploiden Zellen nicht als genereller Regulator der Genexpression, sondern bestimmt ein spezifisches Set von *hda1*-abhängigen Genen, das sich vornehmlich aus *b*-abhängigen Genen und den *b*-Genen selbst zusammensetzt. Haploide $\Delta hda1$ -Stämme vollziehen nicht die pathogene Entwicklung; nur dikaryotische $\Delta hda1$ -Zellen führen zur Tumorentwicklung, leiten jedoch nicht die Bildung von Sporen im Tumorgewebe ein. Funktionelle und biochemische Analysen zeigen in haploiden Zellen einen hochmolekularen Hda1-Komplex, der vermutlich den Aufbau einer höher geordneten Chromatinstruktur an regulatorischen Sequenzen bestimmt. Vermutlich kann Hda1 über einen Deacetylierungsmechanismus regulatorischer Sequenzen zur Repression *b*-abhängiger Gene führen.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	NLS	"nuclear localisation sequence"
ad	zum Endvolumen auffüllen	NM	"nitrate minimal medium"
AD	Aktivierungsdomäne	N-terminal	aminoterminal
Amp	Ampicillin	n.u.	nicht untersucht
Ara	Arabinose	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
bp	Basenpaar(e)	ORF	"open reading frame"
ca.	zirka	PAA	Polyacrylamid
cAMP	zyklisches Adeninmono- phosphat	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
Cbx	Carboxin	PC	Phenol/Chloroform
CM	"complete medium"	PCR	"polymerase chain reaction"
CMC	Carboxymethylcellulose	PD	"potato dextrose"
C-terminal	carboxyterminal	PEG	Polyethylenglycol
d	desoxy	Pellet	Zentrifugationssediment
Da	Dalton	Phleo	Phleomycin
DB	DNA-Bindedomäne	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethan- sulphonat)
dd	didesoxy	PKA	"protein kinase A"
DIC	"differential interference contrast"	PKC	"protein kinase C"
DIG	Digoxygenin	PRE	"pheromone response element"
DMF	Dimethylformamid	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNase	Ribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	s.o.	siehe oben
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
EG	Endoglukanase	sek	Sekunde
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	ssp.	Subspezies
EST	"expressed sequence tag"	ST-DNA	"salmon testis DNA"
et al.	und andere (Autoren)	STE	NaCl-TE
Fuz ⁺	filamentöser Phänotyp	Tab.	Tabelle
Glc	Glucose	TAE	Tris-Acetat + Na ₂ -EDTA
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	TBE	Tris-Borat + Na ₂ -EDTA
HD	Homeodomäne	TBS	"Tris buffered saline"
HDAC	Histondeacetylase	TE	Tris-Cl + Na ₂ -EDTA
HMG	"high mobility group"	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Hyg	Hygromycin	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
IP	Immunpräzipitation	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
kb	Kilobasenpaar	Ü/N	über Nacht
LiAc	Lithiumacetat	UARS	" <i>U. maydis</i> autonomously sequence"
MAPK	"mitogen activated protein kinase"	UAS	"upstream activating sequence"
MAPKK	MAPK-Kinase	Upm	Umdrehungen pro Minute
MAPKKK	MAPKK-Kinase	URS	"upstream regulating sequence"
min	Minute	UV	ultraviolettes Licht
MNase	"micrococcal nuclease"	wt	Wildtyp
MOPS	3-(N-Morpholino)propan- sulphonat	x	gekreuzt mit
		z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	II
1. EINLEITUNG	1
1.1. <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2. Kontrolle der Entwicklung von <i>U.maydis</i>	3
1.3. Der <i>b</i> -Locus	7
1.4. Struktur und Funktion von Homeodomänenproteinen	7
1.5. Die Regulation <i>b</i> -abhängiger Gene	10
1.6. Die Fragestellung der vorgelegten Arbeit	13
2. ERGEBNISSE	14
2.1. Die Herstellung von Stämmen, die in ihrer <i>b</i> -abhängigen Entwicklung betroffen sind	14
2.1.1. Versuche zur Erzeugung <i>rtfl</i> -ähnlicher Stämme	14
2.1.1.1. Die Wirtspflanze Mais als direktes Selektionssystem für pathogene <i>U.maydis</i> Stämme	14
2.1.1.2. Die Entwicklung eines REMI-Mutagenesesystem zur Aktivierung und Inaktivierung von Genen	15
2.1.2. Die Isolierung und Klassifizierung von Mutanten mit EG-Aktivität	18
2.1.2.1. Die Herstellung und Isolierung der MRn-1 Stämme	18
2.1.2.2. Die pathogene Entwicklung der MRn-1 Stämme	18
2.1.2.3. Die Koloniemorphologie der MRn-1 Stämme	19
2.1.2.4. Die MRn-1 Stämme im Kreuzungstest	20
2.1.2.5. Das Expressionsprofil von <i>b</i> -abhängigen Genen in Stämmen mit EG-Aktivität	21
2.2. Die Histondeacetylase Hda1	24
2.2.1. Die Charakterisierung der UV-induzierten Mutation in MR9-1	24
2.2.1.1. Die Komplementation von MR9-1	24
2.2.1.2. Die Identifikation von <i>hda1</i>	25
2.2.2. Die Analyse von <i>hda1</i>	29
2.2.2.1. Die Herstellung von $\Delta hda1$ -Stämmen	29
2.2.2.2. Die <i>hda1</i> -abhängige, differentielle Genexpression	31
2.2.2.3. Die Kontrolle der Transkription von <i>hda1</i>	35
2.2.2.4. Die pathogene Entwicklung von $\Delta hda1$ -Stämmen	36
2.3. Die Kontrolle des <i>hda1</i> -abhängigen Gens <i>egl1</i> durch Modifikation von Chromatin	40
2.3.1. Die Zugänglichkeit von Chromatin der regulatorischen Region des <i>hda1</i> -abhängigen Gens <i>egl1</i>	40
2.3.2. Die Acetylierung von Histon H3 in der regulatorischen Region des <i>hda1</i> -abhängigen Gens <i>egl1</i>	42
2.4. Untersuchungen zur möglichen Interaktion von Hda1 mit Rum1	45
2.4.1. Hda1 und Rum1 im Zwei-Hybrid System	45
2.4.2. Die Analyse der möglichen Interaktion von Hda1 und Rum1 durch Coimmunpräzipitation	46
2.5. Der Hda1-Komplex	49

3.	DISKUSSION	52
3.1.	Der REMI ^{on-off} -Mutageneseansatz	52
3.2.	Der UV-Mutageneseansatz zur Isolierung von haploiden Stämmen mit EG-Aktivität	54
3.3.	Hda1 zeigt Homologie zu Klasse (I) Histondeacetylasen	56
3.4.	Hda1 betrifft die Chromatinstruktur und den Acetylierungsstatus von Histon H3	57
3.5.	Der Hda1-Komplex	59
3.6.	Genregulation durch Hda1	61
3.7.	$\Delta hda1$ -Stämme bilden Tumore, die keine reifen Teliosporen enthalten	66
3.8.	Weitere Histondeacetylasen in <i>U.maydis</i> und anderen phytopathogenen Pilzen	67
4.	MATERIAL UND METHODEN	70
4.1.	Chemikalien und Enzyme	70
4.2.	Sonstige Materialien	70
4.3.	Stämme	70
4.4.	Plasmide und Plasmidkonstruktionen	73
4.4.1.	Allgemeine Vektoren	73
4.4.2.	DNA-Bibliotheken für <i>U.maydis</i>	75
4.4.3.	Genomische Subklone von <i>hda1</i>	75
4.4.4.	cDNA Subklone von <i>hda1</i>	76
4.4.5.	Konstrukte zur homologen Integration in den <i>hda1</i> -Locus	76
4.4.6.	Fusionskonstrukte	77
4.5.	Oligonukleotide	78
4.6.	Antikörper	80
4.7.	Mikrobiologische und genetische Methoden	80
4.7.1.	Kultivierungsbedingungen	80
4.7.2.	Transformation von <i>E.coli</i>	80
4.7.3.	Transformation von <i>U.maydis</i>	81
4.7.4.	Transformation von <i>S.cerevisiae</i>	82
4.7.5.	Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität von Hefestämmen	82
4.7.5.1.	Der <i>lacZ</i> Filtertest	82
4.7.5.2.	Der <i>lacZ</i> Flüssigtest	82
4.7.6.	Infektion und Amplifikation von λ gt10-Phagen in <i>E.coli</i>	83
4.7.7.	Kompatibilitätstest und filamentöses Wachstum	83
4.7.8.	Pathogenitätstest	83
4.7.9.	Sporenanalyse	84
4.8.	Molekularbiologische Standardtechniken	84
4.8.1.	Isolierung von Nukleinsäuren	84
4.8.1.1.	Plasmid-Präparation aus <i>E.coli</i>	84
4.8.1.2.	Präparation von λ -DNA	85
4.8.1.3.	Präparation von chromosomaler DNA aus <i>U.maydis</i>	85
4.8.1.4.	RNA-Isolierung aus Zellen nach Wachstum auf Agarplatten	85
4.8.1.5.	RNA-Isolierung aus Tumor und Pflanzengewebe	86
4.8.1.6.	RNA-Isolierung aus Zellen nach Wachstum in Flüssigkultur	86
4.8.2.	Immobilisierung und Analyse von Nukleinsäuren	86
4.8.2.1.	Southern-Blot	86
4.8.2.2.	Durchmusterung einer Phagenbank	87
4.8.2.3.	Northern-Blot	87
4.8.2.4.	Expressionsanalyse mit Dot-Blot-Hybridisierung	88
4.8.2.5.	Gensonden	88
4.8.2.6.	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	89

4.8.3.	PCR.....	89
4.8.3.1.	Standard-PCR.....	89
4.8.3.2.	Ganz-Zell-PCR.....	89
4.8.3.3.	Quantitative PCR	90
4.8.4.	cDNA-Synthese	90
4.8.5.	Sequenzierung von DNA	91
4.9.	Nachweis von Cellulase-Aktivität auf Festmedien (CMC-Test).....	91
4.10.	Isolierung des <i>hda1</i> -Gens.....	91
4.10.1.	UV-Mutagenese	91
4.10.2.	Screen nach Mutanten mit Cellulase-Aktivität	92
4.10.3.	Komplementation mit einer frei replizierenden pCM54 Bank, die genomische DNA-Fragmente trägt	92
4.10.4.	Isolierung von <i>hda1</i> cDNA-Klonen	92
4.10.5.	Sequenzierung des <i>hda1</i> -Locus	92
4.11.	Mikroskopie	93
4.12.	MNaseI-Analyse der Chromatinstruktur.....	93
4.13.	Biochemische Methoden.....	94
4.13.1.	Isolierung von Gesamtprotein aus <i>U.maydis</i>	94
4.13.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	94
4.13.3.	Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blot).....	95
4.13.4.	Immunpräzipitation von Proteinen aus <i>U.maydis</i>	95
4.13.5.	<i>In vivo</i> Vernetzung und Analyse coimmunpräzipitierter DNA.....	96
4.13.6.	Gelfiltration von Proteinen.....	97
5.	LITERATURVERZEICHNIS	98
6.	ANHANG	116
6.1.	Lebenslauf.....	116
6.2.	Danksagung.....	117
6.3.	Veröffentlichungsliste	117

1. Einleitung

1.1. *Ustilago maydis*

Der Basidiomycet *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes und neben vielen Mais-pathogenen Organismen (Übersicht z.B. in Maize Genome Bank) der prominente Vertreter phytopathogener Brandpilze (*Ustilaginales*; Martinez-Espinosa et al., 2002). *U.maydis* vollzieht eine dimorphe Entwicklung (Christensen, 1963; Holliday, 1961). Haploide Zellen, die als Sporidien bezeichnet werden, wachsen saprophytisch und vermehren sich hefeartig durch Knospung (Wedlich-Söldner et al., 2002; Weinzierl et al., 2002). Dabei wird die Zellpolarität durch eine hochdynamische Organisation der Mikrotubuli bestimmt (Steinberg et al., 2001). Über die weitere Entwicklung entscheiden zwei Kreuzungstyploci, *a* und *b*, die die Kompatibilität von Sporidien bestimmen. Es sind zwei Allele des *a*-Locus und wenigstens 33 *b*-Allele bekannt (1.2. und 1.3.). Treffen haploide Zellen aufeinander, die sich in *a* und *b* unterscheiden, kommt es zur Zellfusion und Ausbildung eines filamentösen Dikaryons, wobei die Zellkerne exakt positioniert werden (Straube et al., 2001). Während dieser Entwicklung vermitteln Endosomen ein Recycling von Membranen und unterstützen das polare Wachstum der Hyphen (Wedlich-Söldner et al., 2000). Dieses Entwicklungsstadium kann besonders gut auf Medien, die Aktivkohle enthalten, verfolgt werden (Abb. 1a). Nur diese Form ist in der Lage, auf der Oberfläche der Pflanze durch Bildung Appressorien-ähnlicher Strukturen in das Pflanzengewebe einzudringen (Abb. 1b; Snetselaar and Mims, 1992). Die Infektion kann direkt, aber wahrscheinlich auch über Verwundungen in der Epidermis oder über Spaltöffnungen erfolgen. Die Hyphen verzweigen und vermehren sich innerhalb der Pflanze (Banuett and Herskowitz, 1996).

Das Wirtsspektrum von *U.maydis* ist eng begrenzt. Neben Mais (*Zea mays*) wird nur noch dessen Wildform Teosinte (*Z.mays* ssp. *parviglumis* und ssp. *mexicana*) befallen (Banuett, 1992). Als Symptome können an allen oberirdischen Teilen der betroffenen Pflanzen Verkümmierungen, Anthocyanbildung und Tumore auftreten (Abb. 1c). Besonders auffällig sind die Symptome bei Infektion der weiblichen Blüte, wobei einzelne Körner der Maiskolben enorme Hypertrophien zeigen (Abb. 1d). Im Tumor werden die häufig verzweigten und dikaryotischen Hyphen in eine gelartige Matrix eingebettet. Etwa während dieser Phase der Entwicklung findet die Fusion der Zellkerne statt. In diesem "wurmartigen" Stadium kommt es zu einer massiven Proliferation der filamentösen Pilzmasse (Banuett and Herskowitz, 1996; Snetselaar and Mims, 1994). Dabei können im Tumorgewebe einzelne Pflanzenzellen aus dem ursprünglichen Zellverband gelöst werden (Abb. 1e). Im weiteren Verlauf der Entwicklung führt die Fragmentierung der Präsporulationshyphen zur Freisetzung von individuellen *U.maydis*-Zellen mit zunächst uneinheitlicher Morphologie. Es erfolgt eine Abrundung, die Ablagerung spezieller Zellwandkomponenten und die Ausbildung der charakteristisch dunkel pigmentierten Teliosporen (Abb. 1f), die das betroffene Pflanzengewebe verbrannt aussehen lassen (Banuett and Herskowitz, 1996). Die diploiden

Sporen fungieren als Dauerformen, die widrige Umweltbedingungen wie Trockenheit und Kälte tolerieren können, außerdem dienen sie der Verbreitung des Pilzes durch Wind und Regen. Der Lebenszyklus von *U.maydis* vollendet sich, wenn die Brandsporen auskeimen (Abb. 1). Dabei erfolgt die Meiose und es bildet sich eine Probasidie, in die vier haploide Zellkerne einwandern. Von dieser Probasidie werden haploide Sporidien sukzessive abgeschnürt (Christensen, 1963).

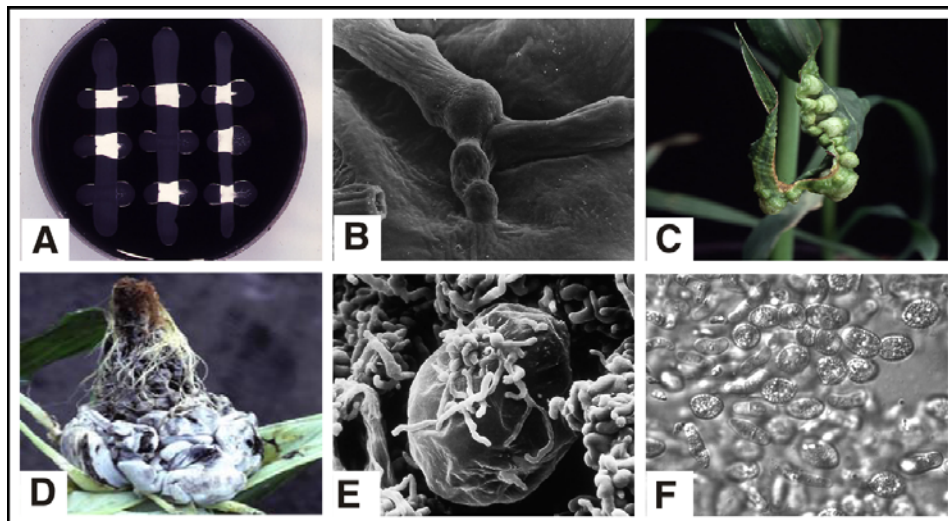


Abb. 1. Prominente Entwicklungsstadien aus dem Lebenszyklus von *U.maydis*.

(a) Haploide Sporidien können auf künstlichen Nährmedien kultiviert werden und bilden Kolonien mit glatter Morphologie. Auf Platten, denen Aktivkohle zugesetzt wurde, fusionieren kompatible haploide Zellen und bilden ein dikaryotisches, weißes Filament (Aufnahme aus Schulz et al., 1990).

(b) Infektiöse Hyphen penetrieren die Oberfläche der Pflanzenzellen (elektronenmikroskopische Aufnahme aus Snetselaar and Mims, 1994).

(c) Unter Gewächshausbedingungen führen kompatible Wildtypstämme zu Verkümmern an infizierten Maispflanzen, lösen im grünen Pflanzengewebe Anthocyanbildung aus und bilden Tumore (Bildvorlage wurde freundlicherweise von R. Kahmann zur Verfügung gestellt).

(d) Im Freiland können extrem hypertrophe Tumorstrukturen beobachtet werden (diese Arbeit).

(e) *U.maydis* proliferiert im Tumorgewebe und trennt einzelne Pflanzenzellen aus dem Verband des Zellgewebes (die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde freundlicherweise von K. Snetselaar zur Verfügung gestellt).

(f) Sporogene Hyphen schnüren ornamentierte, diploide Teliosporen ab (diese Arbeit).

Unter ökonomischen Gesichtspunkten spielt *U.maydis* als Ernteschädling von Mais eine eher untergeordnete Rolle. Nicht verstandene Umstände können aber durchaus zu erheblichen Ernteverlusten führen. Beispielsweise wurde 1949 in Argentinien ein dramatischer *U.maydis*-Befall von Zuckermaispflanzen dokumentiert, der die gesamten Ernte zerstörte (zitiert in Sandoval and Corcuera, 1998). Da nur beschränkte Möglichkeiten einer chemische Kontrolle von *U.maydis* bestehen, wie etwa das Beizen von Saatgut, forderte z.B. die University of California 1997 in ihren Pest-Management Richtlinien zur Vermeidung des Maisbrandes den Anbau wenig suszeptibler Maiskultivare. Befall von Mais durch *U.maydis* ist allerdings nicht immer unerwünscht, denn hauptsächlich in Mexiko werden die mit den schwarzen Sporen

von *U.maydis* angefüllten Tumore der Maiskolben als Delikatesse besonders geschätzt und unter der Bezeichnung "Cuitlacoche" weltweit vertrieben (www.herdez.com.mx).

Im Mittelpunkt des Interesses am Pathogen/Pflanze-Modellsystem *U.maydis*/*Z.mays* steht die Aufklärung genereller Mechanismen der Interaktion zwischen phytopathogenen Pilzen und deren Wirtspflanzen. Neben der Möglichkeit zur klassischen, genetischen Analyse, sind es biochemische, zellbiologische und vor allem molekularbiologische Ansätze, die in diesem System zur Beantwortung einer Vielzahl biologischer Fragestellungen benutzt werden können.

1.2. Kontrolle der Entwicklung von *U.maydis*

Gegenseitiges Erkennen und die anschließende Fusion haploider Zellen initiiert die sexuelle und pathogene Entwicklung von *U.maydis*. Dabei wird über ein komplexes Regelwerk Selbstkreuzung verhindert und die genetische Variabilität der Population aufrecht erhalten. Die Fusion zweier haploider Zellen wird durch den biallelischen *a*-Kreuzungstyplocus (*a1*, *a2*) gesteuert, der für Pheromone (*mfa1*, *mfa2*) und Rezeptoren (*pra1*, *pra2*) kodiert. Der *a2*-Locus enthält darüber hinaus zwei weitere Gene unbekannter Funktion, *lga2* und *rga2*, ferner ein Pseudogen mit Sequenzähnlichkeit zu *mfa* (Bölker et al., 1992; Urban et al., 1996b). Kompatible Kreuzungspartner müssen unterschiedliche *a*-Allele tragen. Sezerniertes Pheromon Mfa1 des Kreuzungstyps *a1* kann nur an den Rezeptor Pra2 eines *a2*-Stammes binden und Mfa2 an Pra1 (Bölker et al., 1992; Froeliger and Leong, 1991; Spellig et al., 1994a; Trueheart and Herskowitz, 1992). Nach Bildung des Pheromons bilden kompatible Zellen auf der hydrophoben Pflanzenoberfläche Konjugationshyphen, die gerichtet aufeinander zuwachsen und fusionieren (Banuett and Herskowitz, 1994b; Snetselaar, 1993). Die fusionierten Kreuzungspartner entwickeln ein dikaryotisches Filament. Obwohl die Bildung des weißen Luftmycels unter Laborbedingungen gut verfolgt werden kann, wird nachhaltiges Wachstum der Kreuzungsprodukte in der Pflanze beobachtet (Snetselaar, 1993). In der Wirtspflanze kann der Pilz die Kontrolle der Genexpression an die geänderten Umweltbedingungen anpassen (Basse et al., 2000; Basse et al., 2002a; Basse et al., 2002b). Interessanterweise ist es gelungen, den Lebenszyklus von *U.maydis* auch unter Laborbedingungen zu vollenden (Ruiz-Herrera et al., 1999).

Die filamentöse und pathogene Entwicklung von *U.maydis* wird durch die Produkte des multiallelischen *b*-Locus bestimmt (Abb. 2), der für zwei Homeodomänenproteine, bE und bW, kodiert (Banuett and Herskowitz, 1989). Nur wenn diese von verschiedenen Allelen stammen, erfolgt Dimerisierung und es wird im Dikaryon ein aktives bE/bW-Heterodimer gebildet. bE-bW Kombinationen von einem Allel können nicht dimerisieren und deshalb unterbleibt die pathogene Entwicklung haploider Stämme (Gillissen et al., 1992; Kämper et al., 1995).

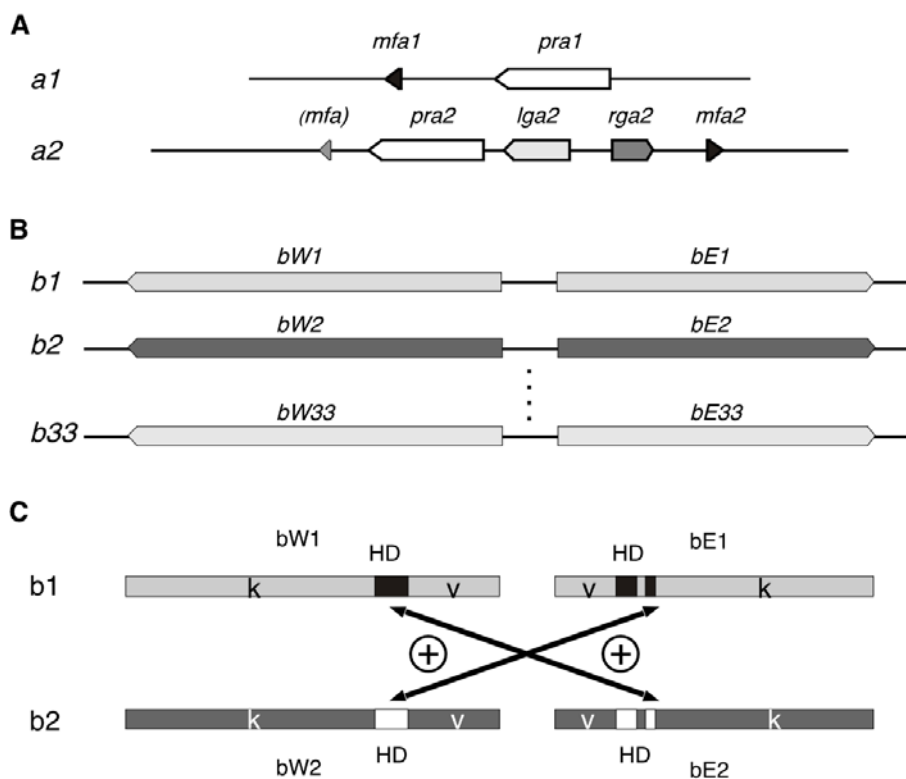


Abb. 2. Die Kreuzungstyploci *a* und *b*.

(a) Es sind zwei Allele des *a*-Locus bekannt (*a1* und *a2*). Homologe DNA-Sequenzen sind schematisch als Linie angegeben. Die Gene des *a*-Locus sind als Pfeile dargestellt, die eine entsprechende Richtung der Transkription anzeigen. In Klammern ist das vermutete Pseudogen *mfa* des *a2*-Allels dargestellt.

(b) Die genomische Organisation des *b*-Locus ist schematisch dargestellt. Bislang sind 33 Allele des *b*-Locus beschrieben (DeVay, zitiert in Wong und Wells, 1985). Die Gene des *b*-Locus sind als Pfeile mit entsprechender Orientierung der Transkripte dargestellt.

(c) Nur die Kombination von verschiedenen Allelen führt zur Bildung eines aktiven bE/bW-Heterodimers (+). Die allelspezifische bE-bW Proteinwechselwirkung erfolgt über die variable Domäne (v). k bezeichnet die konstante Region und HD das Homeodomänenmotiv der schematisch dargestellten b Proteine (Kämper et al., 1995).

Das zentrale Verbindungsglied des Pheromon-Signalweges und der Expression der *b*-Gene ist der HMG-Domänen Transkriptionsfaktor Prf1 (Abb. 3). Prf1 bindet an konservierte DNA-Bindemotive (PRE, Pheromon Response Elemente), die in regulatorischen Bereichen von Pheromon-induzierbaren Genen lokalisiert sind (Hartmann et al., 1996), und führt nach einem Pheromon-Stimulus zur Induktion der Kreuzungstypgene (Urban et al., 1996a). *prf1* unterliegt zudem einer Autoregulation (Abb. 3). $\Delta prf1$ -Stämme sind steril und es kommt nicht zur Expression der *b*-Gene. Deshalb sind solche Stämme prinzipiell apathogen, auch wenn unterschiedliche *b*-Allele vorliegen (Hartmann et al., 1996).

Die Analyse einer Prf1-Variante, deren putative Phosphorylierungs- und Interaktionsstellen von Mitogen Aktivierten Protein (MAP) Kinasen zerstört sind, zeigte, dass MAP Kinase(n) die Aktivität von Prf1 regulieren und so das Pheromonsignal auf Prf1 übertragen (Müller et al., 1999). Mit Kpp2 wurde eine MAP Kinase identifiziert, die an diesen Prozessen beteiligt sein könnte. Stämme, die eine Deletion in *kpp2* tragen, sind durch eine reduzierte Kreuzungskompetenz und Pathogenität gekennzeichnet (Mayorga and Gold, 1999; Müller et

al., 1999). Mit der MAPK Kinase Fuz7 (Banuett and Herskowitz, 1994a) und der MAPKK Kinase Kpp4 (P. Müller, pers. Mitteilung) wurden weitere mögliche Komponenten der MAP Kinasekaskade isoliert. Wie im Falle von *kpp2* führen Deletionen in den entsprechenden MAPKK und MAPKKK Genen zu einer verminderten Kreuzungsfähigkeit (Andrews et al., 2000; Banuett and Herskowitz, 1994a). Die Expression konstitutiv aktiver MAPKK oder MAPKKK Allele führt zu einer Aktivierung der Paarungstypgene und zur Ausbildung von Konjugationshyphen. Diese Effekte sind dagegen nicht zu beobachten, wenn zugleich *kpp2* inaktiviert wird (P. Müller, pers. Mitteilung). Vermutlich entspricht die Situation in *U.maydis* der von *S.cerevisiae*, wo ebenfalls eine MAP Kinasekaskade das Pheromonsignal übermittelt. Analysen von Methionin-auxotrophen *U.maydis* Stämmen unterstützen die Vermutung, dass Methylierung während der Pheromonsignaltransduktion eine entscheidende Rolle spielen kann (Fischer et al., 2001)

Neben dem MAP Kinase Modul reguliert der cAMP Signalweg die Zellfusion, die Zellmorphologie und die Pathogenität von *U.maydis* (Kronstad, 1997; Krüger et al., 1998; Krüger et al., 2000). Bekannte Komponenten sind *gpa3*, das eine α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine kodiert, *uac1*, das die Adenylatzyklase kodiert, *ubc1*, das die regulatorische Untereinheit der Protein Kinase A (PKA) kodiert, und *adr1*, das die katalytische Untereinheit der PKA kodiert (Barrett et al., 1993; Dürrenberger et al., 1998; Orth et al., 1995; Regenfelder et al., 1997). Interessanterweise stellte sich heraus, dass $\Delta gpa3$, $\Delta uac1$ und $\Delta ubc1$ -Stämme nach Inokulation vom Maispflanzen keine Tumorbildung induzieren können (Dürrenberger et al., 1998; Gold et al., 1997; Regenfelder et al., 1997). *Ubc2*, das ebenso wie *ubc1* für das filamentöse Wachstum benötigt wird und einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt, kodiert ein putatives, neuartiges Adaptorprotein und konnte oberhalb der Pheromon-abhängigen MAP Signalkaskade eingeordnet werden (Mayorga and Gold, 2001). Mit der Entdeckung von *sql1*, das ein funktionell homologes Gen zu *SSN6* aus *S.cerevisiae* darstellt, wurde klar, dass darüber hinaus der evolutionär konservierte Ssn6p(Sql1)-Tup1 Komplex als transkriptioneller Repressor cAMP-regulierte Gene reguliert (Loubradou et al., 2001).

Die intrazelluläre cAMP Konzentration hat Einfluss auf Expression und Aktivität von Prf1 mit entsprechenden Konsequenzen für die Expression der Pheromon Gene (Hartmann et al., 1999). Dennoch erlaubt die vermutete Aktivierung von Prf1 über die cAMP Kaskade allein nicht die Zellfusion, hierfür ist ein gleichzeitiger Pheromonstimulus notwendig (Krüger et al., 1998). Offensichtlich werden die Signale, die durch die MAP Kinase Kaskade und den cAMP-Weg weitergeleitet werden, über Prf1 integriert (Abb. 3). Unklar ist, ob der Weg über Prf1 die einzige Möglichkeit der Signalübermittlung darstellt (Kahmann et al., 1999).

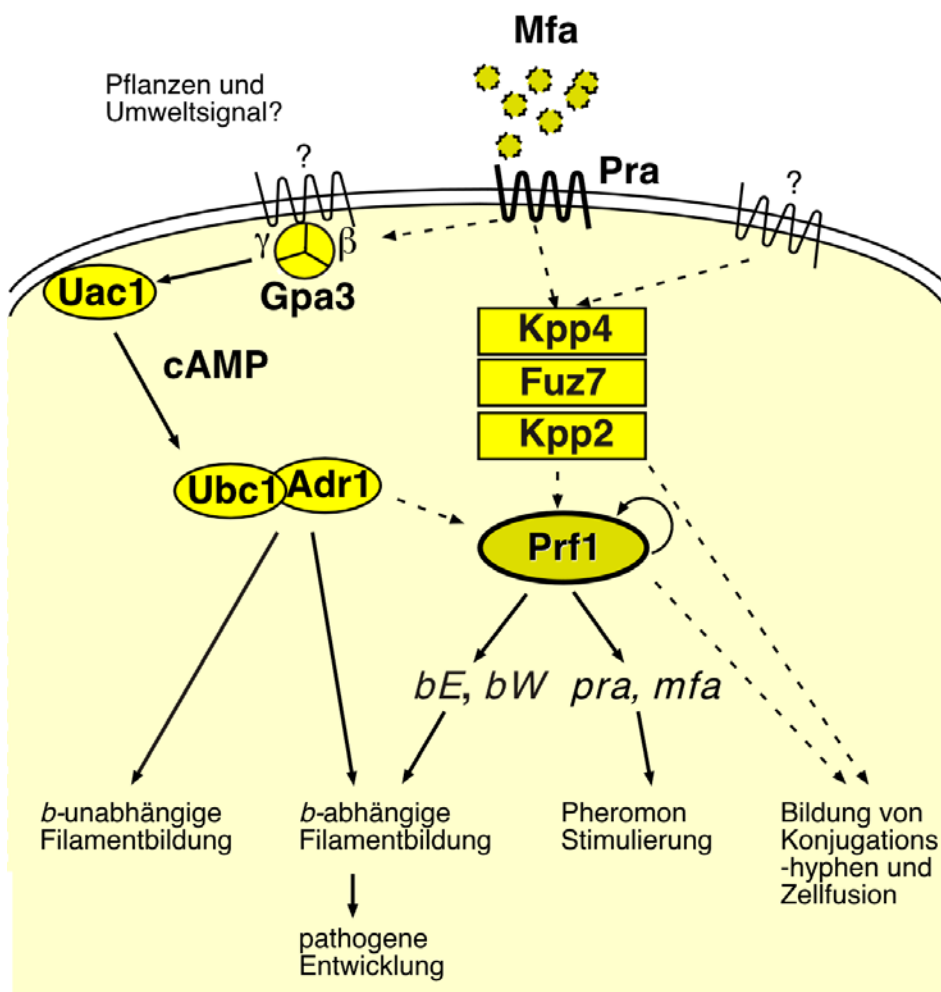


Abb. 3. Modell des regulatorischen Netzwerkes der Signalübertragung über cAMP und mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinase Kaskade.

Links dargestellt sind die Komponenten des cAMP Signalweges Gpa3, Uac1, Ubc1 und Adr1 (Barrett et al., 1993; Dürrenberger et al., 1998; Orth et al., 1995; Regenfelder et al., 1997). Ein putatives MAP Kinase Modul überträgt das Pheromonensignal (rechts). Kpp2 wurde als MAP Kinase, Fuz7 als MAPK Kinase und Kpp4 als MAPKK Kinase in das vermutete Modul eingeordnet (Andrews et al., 2000; Banuett and Herskowitz, 1994a; Müller et al., 1999). Vermutlich werden die jeweiligen Signale über Prf1 verbunden. Prf1 wiederum steuert die Expression der Kreuzungstypgene. Fragezeichen bezeichnen nicht identifizierte Komponenten. Pfeile geben Aktivierung an, unterbrochene Linien weisen auf nicht charakterisierte, aber vermutete Aktivierungsprozesse. Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen (modifiziert nach Kahmann et al., 2000).

1.3. Der *b*-Locus

Der *b*-Locus enthält zwei regulatorische Gene *bE* und *bW*, die von einer etwa 200 bp langen, intergenischen Region ausgehend divergent transkribiert werden. Der *bI*-Locus kodiert das 473 Aminosäure lange *bE1* Protein und das 644 Aminosäuren lange *bW1* Protein. Die *b* Genprodukte sind durch einen ähnlichen strukturellen Aufbau gekennzeichnet, obwohl sie sonst keine Homologie aufweisen. Auf den N-terminalen Bereich, in dem hauptsächlich allelische Unterschiede zu finden sind, folgt eine Homeodomäne und ein zwischen den Allelen weitgehend konstanter C-Terminus (Gillissen et al., 1992; Kronstad and Leong, 1990; Schulz et al., 1990). Die *b* Proteine wirken nur paarweise (Abb. 2c): Beispielsweise führt eine Kombination von *bE1* und *bW2*, nicht jedoch die von *bE1* und *bW1* Proteinen zu pathogener Entwicklung (Gillissen et al., 1992). Kämper et al., 1995 demonstrierten, dass *bE1* und *bW2*, die von verschiedenen Allelen des *b*-Locus stammen, über die variablen, N-terminalen Domänen interagieren und die Bildung eines aktiven *bE/bW*-Heterodimers einleiten (Abb. 2c). Für die Dimerisierung sind wahrscheinlich nur wenige Kontaktpunkte mit polaren und hydrophoben Wechselwirkungen entscheidend. Die Interaktionen zwischen *bE* und *bW* könnten über kurze Bereiche mit "coiled-coil"-ähnlicher Topologie vermittelt werden, wie es auch in *S.cerevisiae* für das *MATa1-MAT α 2* Heterodimer vorgeschlagen wurde (Ho et al., 1994). Die Existenz von mindestens 33 unterschiedliche *b*-Allelen (zitiert in Wong and Wells, 1985) lässt auf einen hochinteressanten Erkennungsmechanismus zwischen *bE* und *bW* Proteinen schließen, wobei spezifische Determinanten einerseits die Wechselwirkungen vieler Partner zulassen, andererseits Interaktionen von *bE* und *bW* vom gleichen Allel verhindern müssen (Kahmann and Bölker, 1996). Interessanterweise kann ein Fusionsprotein zwischen *bE* und *bW* auch ohne die variablen Domänen die pathogene Entwicklung haploider Zellen auslösen. Die variablen Domänen bestimmen also ausschließlich die spezifischen Wechselwirkungen zwischen *bE* und *bW* und sind für den weiteren Verlauf der pathogenen Entwicklung nicht mehr essentiell (Romeis et al., 1997).

1.4. Struktur und Funktion von Homeodomänenproteinen

Homeodomänenproteine wurden in einem breiten Spektrum eukaryotischer Organismen von Hefen bis zum Menschen gefunden und bilden eine große Familie von Transkriptionsfaktoren, die wichtige Funktionen bei zellulären Entwicklungsprozessen erfüllen (Gehring et al., 1994).

Die Homeodomäne ist ein hochkonserviertes, aus 60-63 Aminosäuren aufgebautes Protein Motiv, das sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt. Am besten wurde die Struktur von Homeodomänen bei den Transkriptionsfaktoren *Engrailed* und *Antennapedia* aus *Drosophila melanogaster* (Kissinger et al., 1990; Quian et al., 1989) und den Produkten der Inkompatibilitätsgene *MATa1* und *MAT α 2* aus *S.cerevisiae* untersucht (Li et al., 1995; Wolberger et al., 1991). Es stehen detaillierte Ergebnisse aus Röntgenstruktur- und NMR-Analysen von freien Homeodomänenproteinen und Homeodomänen-DNA Komplexen zur

Verfügung. Generell besteht diese Domäne aus drei α -helikalen Bereichen (I, II, III), die durch kurze Schleifen miteinander verbunden sind. Helix I und Helix II sind antiparallel zueinander angeordnet. Helix III liegt etwa im rechten Winkel unterhalb der aus Helix I und Helix II aufgebauten Peptidebene und geht sequenzspezifische Kontakte mit Basen ein, die in der großen Furche der DNA-Doppelhelix liegen. Alle drei Helices wechselwirken mit dem Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA (Bürglin, 1994; Gehring et al., 1994).

Ein Vergleich der Primärsequenz von Homeodomänen pilzlicher Transkriptionsfaktoren erlaubte eine Unterteilung in HD1 und HD2 Homeodomänenproteine (Kües and Casselton, 1992). Die Homeodomänen von bE, sowie die von MAT α 2, fallen in die "untypische" Klasse HD1, weil sie geringe Ähnlichkeit zur Homeodomänen-Konsensussequenz aufweisen (Bürglin, 1994). Im Gegensatz zu anderen Homeodomänen sind Helix I und Helix II durch acht und nicht wie üblich durch fünf Aminosäurereste getrennt. Auch der Abstand zwischen Helix II und Helix III ist durch den Zusatz von 15 Aminosäuren gekennzeichnet (Schlesinger et al., 1997). Diese Insertionen könnten in Anlehnung an die Struktur der MAT α 2-Homeodomäne eine schleifenförmige Konformation einnehmen (Wolberger et al., 1991). Die Homeodomäne von bW ist dagegen sehr ähnlich der aus 60 Aminosäureresten zusammengesetzten, hochkonservierten Homeodomäne von MAT α 1 (Schlesinger et al., 1997). bW wurde deshalb der Klasse der HD2 Homeodomänenproteine zugeordnet (Kües and Casselton, 1992).

Die phylogenetisch nahe zu *U.maydis* stehenden Basidiomyceten *U.hordei*, *Coprinus cinereus* und *Schizophyllum commune* besitzen unterschiedlich komplex aufgebaute, multiallelische Kreuzungstypocli, die ebenfalls Homeodomänenproteine kodieren und die pilzliche Entwicklung bestimmen (Casselton and Kües, 1994). Die Bedingung für das Einschalten des Entwicklungsprogrammes ist die Anwesenheit von mindestens zwei Homeodomänenproteinen, die von unterschiedlichen Allelen abstammen und von denen eines vom Typ HD1 und das zweite vom Typ HD2 sein muss. Eine produktive Kombination reicht dabei aus, um die sexuelle Entwicklung zu initiieren (Bakkeren and Kronstad, 1993; Kües and Casselton, 1993; Stankis et al., 1992).

Obwohl die Analyse von Homeodomänenproteinen zeigte, dass viele dieser Proteine *in vitro* DNA mit relativ niedriger Sequenzspezifität binden, vermitteln sie oft spezifische regulatorische Aktivitäten *in vivo* (Desplan et al., 1988; Schier and Gehring, 1993). Zum Beispiel wird in der Fruchtfliege *D.melanogaster* die Wahl zwischen zwei möglichen Entwicklungswegen der Antennenbildung bzw. Fußbildung durch das *HOX*-Gen *Antennapedia* entschieden (Schneuwly et al., 1987; Struhl, 1981). *Antennapedia* bindet eine von vielen Homeodomänenproteinen erkannten DNA-Sequenz 5'[C/T][C/A]ATTA (Affolter et al., 1990; Ekker et al., 1994). Durchschnittlich findet man diese Sequenz etwa einmal pro Kilobase (kb) DNA in den meisten eukaryotischen Genomen. Es kann als unwahrscheinlich gelten, dass alle dem Konsensus entsprechenden Sequenzen, die darüber hinaus in den meisten Genen wahrscheinlich mehrfach vorliegen, funktionelle Bindungsstellen für

Antennapedia darstellen. Interessanterweise binden *in vitro* viele Homeodomänenproteine die gleiche Konsensussequenz (Hoey and Levine, 1988). Um die *in vivo* relevanten Bindungsstellen auszuwählen, muss für Homeodomänenproteine ein bestimmter Erkennungsmechanismus bestehen. Diskutiert wird, ob die Chromatinstruktur die Zugänglichkeit für Homeodomänenproteine regulieren könnte (Mann and Chan, 1996).

Einen weiteren möglichen Mechanismus zur Spezifität von Homeodomänenproteinen, ist die Interaktion mit zusätzlichen Faktoren (Chan et al., 1994; Pomerantz et al., 1992; van Dijk and Murre, 1994; Xue et al., 1993). Diese Protein-Protein Wechselwirkungen können sowohl die DNA-Bindungsaffinität als auch die Spezifität der Bindung erhöhen. Ein Beispiel dafür sind die Interaktionen, die MAT α 2 eingeht (Johnson, 1992). Obwohl das gereinigte MAT α 2 Protein DNA *in vitro* binden kann, muss es *in vivo* mit einem von zwei möglichen Cofaktoren interagieren, um Zelltyp-spezifische Genexpression sicherzustellen. In haploiden α -Zellen bilden MAT α 2 und das MADS-Box Protein Mcm1p einen Heterotetramer, das DNA spezifisch bindet und die Transkription von **a**-spezifischen Genen reprimiert (Keleher et al., 1988; Passmore et al., 1992). In diploiden **a**/ α -Zellen interagieren MAT α 2 und MAT**a**1, und bilden das MAT**a**1-MAT α 2 Heterodimer. Die Homeodomänen von MAT**a**1 und MAT α 2 binden an spezifische Operatorsequenzen im regulatorischen Bereich haploid spezifischer Gene und reprimieren sie (Dranginis, 1990; Goutte and Johnson, 1994; Li et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass während der Ausbildung des MAT**a**1-MAT α 2 Heterodimers der C-Terminus von MAT α 2 einen Wechsel in der Konformation der MAT**a**1 Homeodomäne induziert, woraufhin hochaffine DNA-Bindung ermöglicht wird (Stark et al., 1999).

Die phylogenetische weite Verbreitung von Homeodomänenproteine zur Regulation von Entwicklungsprozessen, lässt auf einen in verschiedenen Systemen evolutionär konservierten Mechanismus schließen. *U.maydis* unterscheidet sich allerdings in einem wesentlichen Punkt von den beschriebenen Inkompatibilitätsfaktoren anderer Basidiomyceten: Während in *U.maydis* beide Homeodomänen des aktiven **bE**/**bW**-Heterodimers für die Funktion essentiell sind, kann die Homeodomäne von HD1 Proteinen aus *S.cerevisiae*, *C.cinereus* oder *S.commune* ohne Aktivitätsverlust deletiert werden (Asante-Owusu et al., 1996; Luo et al., 1994).

1.5. Die Regulation *b*-abhängiger Gene

Das aktive bE/bW-Heterodimer stellt den zentralen Regulator der pathogenen und filamentösen Entwicklung dar. Dies lässt sich dadurch zeigen, dass künstlich hergestellte haploide Stämme wie CL13 und SG200, die im Unterschied zu Wildtypstämmen kompatible bE und bW Proteine exprimieren, ohne Kreuzungspartner Tumorbildung in Maispflanzen induzieren können (Bölker et al., 1995b). Der von CL13 abgeleitete Stamm SG200 zeichnet sich auf Grund einer zusätzlich aktivierten *a*-Signalkaskade (1.2) durch eine erhöhte Expression der *b*-Gene aus. Deshalb können sich bereits Sporidien des Stammes SG200 filamentös entwickeln (Bölker et al., 1995b).

In einer umfassenden Analyse der *b*-abhängigen Genexpression konnte gezeigt werden, dass das bE/bW-Heterodimer einen zentralen Regulator darstellt und als Aktivator oder Repressor zu einer umgreifenden Veränderung der Transkription führt (Brachmann, 2001; Brachmann et al., 2001). *In vitro* Protektionsexperimente regulatorischer Regionen der Gene *lga2*, *dik1* und *frb53* demonstrierten, dass das künstliche bE-bW Fusionsprotein Kon8 ein in diesen Promotoren auftretendes, kurzes Sequenzmotiv bindet. Es gilt daher als gesichert, dass die b-Proteine als Transkriptionsfaktoren die Entwicklung von *U.maydis* regeln, wobei sie direkt an für Homeodomänenproteine eher atypische DNA-Sequenzmotive binden (Brachmann, 2001; Brachmann et al., 2001; Romeis et al., 2000).

Deshalb liegen besonders die Modelle nahe, die auf der direkten Bindung des bE/bW-Komplexes an regulatorische Sequenzen direkter Zielgene basieren (Spellig et al., 1994b). Solche Gene sind im Folgenden als Klasse I Gene bezeichnet und könnten eine regulatorische Funktion während der pathogenen Entwicklung erfüllen (Abb. 4). Das bE/bW-Heterodimer könnte einen Repressor der Tumorbildung (*repressor of tumor formation, rtf*) reprimieren. Einen Hinweis dafür geben haploide Stämme, die die Mutation *rtf1* aufweisen und die pathogene Entwicklung vollziehen (Banuett, 1991). Alternativ könnte das aktive bE/bW-Heterodimer als Aktivator eines Klasse I Gens agieren, das wiederum die filamentöse und pathogene Entwicklung aktiviert. Zudem wäre das bE/bW-Heterodimer als Aktivator eines Klasse I Gens denkbar, das einen Repressor haploid spezifischer Gene kodiert (Abb. 4).

Um Klasse I Gene zu identifizieren, wurden verschiedene subtraktive Techniken beim Vergleich von Zellen, die keine aktive Kombination der *b*-Gene tragen, und filamentösen Zellen, die ein aktives bE/bW-Heterodimer exprimieren, eingesetzt. Auf diese Weise konnten *b*-abhängig exprimierte Gene *hum2*, *rep1*, *egl1*, *dik1* und *dik6* isoliert werden (Bohlmann, 1996; Schauwecker et al., 1995; Wösten et al., 1996).

Das Cystein-reiche Protein Hum2 wurde in die funktionelle Gruppe der Hydrophobine eingeordnet (Bohlmann, 1996). Diese Proteine sind auf der Zelloberfläche pilzlicher Filamente lokalisiert und vermitteln einen wirksamen Schutz gegenüber Wasserverlust (Wessels, 1996). Die Oberfläche filamentöser *U.maydis* Zellen könnte darüber hinaus durch eine neue Klasse von amphipatischen und auffällig hydrophoben Peptiden, die von *rep1* kodiert werden, ummantelt sein. Obwohl die Deletion von *rep1* die Entwicklung des Pilzes *in*

planta nicht betrifft, könnte Rep1 dennoch eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit der ebenfalls hydrophoben Oberfläche der Wirtspflanze spielen (Wösten et al., 1996; Wösten et al., 1994). Das Gen *egl1* kodiert die sekretierte Endoglukanase EG1, deren Expression während des filamentösen Wachstum stark induziert wird. EG1 ist an der Spitze von Filamenten lokalisiert (Schauwecker et al., 1995). Da neben Cellulase-Aktivität auch andere lytische Enzyme bei der Interaktion von *U.maydis* mit Zellgewebe von *Z.mays* induziert werden (Cano-Canchola et al., 2000), ist es wahrscheinlich, dass ein Verbund degradativer Enzyme eine unterstützende Funktion beim Penetrationsprozess des infektiösen Filaments erfüllen könnte. Die *b*-abhängigen Gene *dik1* und *dik6* könnten ebenfalls an der pathogenen Entwicklung von *U.maydis* beteiligt sein (Bohlmann, 1996; Weinzierl et al., 2002).

Obwohl diese Gene im *b*-abhängigen Filament exprimiert werden, unterliegen sie mit Ausnahme von *dik6* vermutlich jedoch nicht der direkten Kontrolle durch das bE/bW-Heterodimer. Sie werden als Klasse II Gene bezeichnet (Abb. 4). Folgende Ergebnisse stützen die Vermutung: Es zeigte sich, dass *hum2* und *rep1* auch in filamentösen Zellen, die eine Deletion in *uac1* aufweisen, exprimiert werden, obgleich sie kein aktives bE/bW-Heterodimer tragen (G. Weinzierl, pers. Mitteilung). Die regulatorischen Sequenzen dieser Klasse II Gene zeichnen sich nicht durch auffällige, gemeinsame Sequenzelemente aus, die auf eine direkte Bindung der Homeodomänenproteine bE und bW schließen ließen (J. Kämper, pers. Mitteilung). In Stämmen, die eine kontrollierte Expression der *b*-Gene zulassen, unterliegen die untersuchten Klasse II Gene keiner gemeinsamen zeitlichen Kontrolle durch das bE/bW-Heterodimer (Brachmann et al., 2001). Bezeichnenderweise führte bislang die Deletion keines der untersuchten Klasse II Gene zum Verlust oder zu einer Beeinträchtigung der pathogenen Entwicklung (Bohlmann, 1996; Schauwecker et al., 1995; Urban et al., 1996b; Wösten et al., 1996).

Offensichtlich existiert in *U.maydis* eine *b*-abhängige Regulationskaskade mit direkt (Klasse I) und indirekt (Klasse II) bE/bW-regulierten Genen. In einem weiteren, genetischen Ansatz zur Identifikation regulatorischer Gene der *b*-Regulationskaskade konnte *rum1* identifiziert werden. Haploide $\Delta rum1$ -Stämme zeigen Endoglukanase (EG)-Aktivität. Die Funktion von Rum1 ist aber nicht nur auf das haploide Stadium des Pilzes beschränkt, wo es als möglicher Repressor filamentspezifisch exprimierter Gene wirkt (Quadbeck-Seeger et al., 2000). In der Pflanze leiten $\Delta rum1$ -Stämme die Tumorbildung ein und entwickeln sich dort bis zu den wurmartigen Präsporulationshyphen. Die nachfolgende Differenzierung zu Sporen ist jedoch unterbunden. Rum1 wird also auch als essentieller Faktor bei der Bildung von Sporen benötigt (Quadbeck-Seeger et al., 2000). Kürzlich konnte das sporenspezifisch exprimierte Gen *ssp1* isoliert werden. Eine Beteiligung von *rum1* an der Regulation von *ssp1* konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Huber et al., 2002).

Die Expression von *rum1* wird nicht durch das bE/bW-Heterodimer bestimmt. D.h. *rum1* ist kein Klasse I Gen, betrifft aber die Kontrolle von stadienspezifisch exprimierten Klasse I und Klasse II Genen. Besonders interessant ist, dass die Expression von bE und bW der Kontrolle

durch Rum1 unterliegt (Quadbeck-Seeger, 1998). Dieser Befund deutet auf eine eher globale Funktion von Rum1, das sowohl in haploiden Zellen als auch während der pathogenen Entwicklung die Genexpression bestimmt.

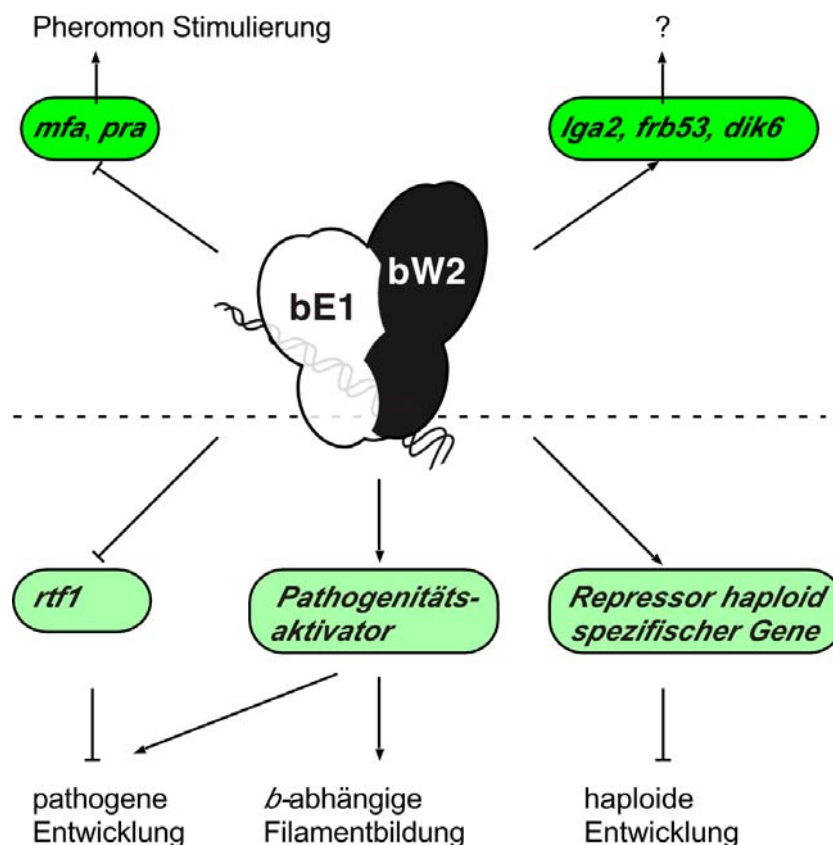


Abb. 4. Direkte und indirekte Zielgene des bE/bW-Heterodimers.

Im oberen Teil sind direkte Zielgene des bE/bW-Heterodimers aus dem *a*-Locus dargestellt. Das bE/bW-Heterodimer bindet an regulatorische Sequenzen von *mfa*, *pra* und *lga2*. bE-bW wirkt entsprechend als Repressor oder Aktivator und führt zur Pheromonstimulierung. Die Konsequenzen der Regulation von *lga2* sind nicht bekannt. Aktuelle Arbeiten zeigten, dass darüber hinaus wenigstens zwei weitere Gene (*frb53* und *dik6*) außerhalb des *a*-Locus direkte Zielgene des bE/bW-Heterodimers sind (Brachmann, 2001; Weinzierl et al., 2002).

Im unteren Teil der Abbildung sind mögliche, regulatorische Klasse I Gene dargestellt, die den pathogenen Verlauf bestimmen könnten. In Zellen, die ein aktives bE/bW-Heterodimer ausbilden, könnte *rtf1* direkt reprimiert werden. Damit wäre wiederum die Hemmung von *rtf1* auf die pathogene Entwicklung aufgehoben. Das bE/bW-Heterodimer könnte auch die Genexpression eines putativen Pathogenitätsaktivators stimulieren. Auf diesem Weg könnte die pathogene und *b*-abhängige, filamentöse Entwicklung eingeleitet werden. Die Expression der Klasse II Gene *egl1*, *hum2*, *rep1* und *dik1* würde die Aktivität des postulierten Pathogenitätsaktivators anzeigen. Weiterhin ist möglich, dass das bE/bW-Heterodimer einen vermuteten Repressor haploid spezifischer Gene kontrolliert und somit den Wechsel von der haploiden zur pathogenen Entwicklung bestimmt. Die postulierten, regulatorischen Klasse I Gene müssen sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern könnten auch in jeder beliebigen Kombination wirken.

1.6. Die Fragestellung der vorgelegten Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation regulatorischer Gene, die in der postulierten Regulationskaskade direkt durch das bE/bW-Heterodimers kontrolliert werden.

Es sollten durch zufällige Integration heterologer DNA-Sequenzen haploide Mutanten hergestellt werden, die sich pathogen entwickeln können. Die verfolgte Strategie basierte auf der Hypothese, dass durch Aktivierung oder Inaktivierung eines regulatorischen Gens, das normalerweise *b*-reguliert ist, die pathogene Entwicklung eines haploiden Stammes ohne Ausbildung eines aktiven bE/bW-Heterodimers eingeleitet werden kann.

In einem zweiten Ansatz sollten in einer UV-Mutagenese haploide Stämme erzeugt werden, die Endoglukanase sekretieren. Die Hoffnung war, durch Nutzung von *eglI* als Klasse II Reporter gen regulatorische Gene der Klasse I isolieren zu können, die unter der direkten Kontrolle des aktiven bE/bW-Heterodimers stehen.

2. Ergebnisse

2.1. Die Herstellung von Stämmen, die in ihrer *b*-abhängigen Entwicklung betroffen sind

2.1.1. Versuche zur Erzeugung *rtf1*-ähnlicher Stämme

Das aktive bE/bW-Heterodimer ist der zentrale Regulator der pathogenen Entwicklung von *U.maydis*. Wenn, wie eingangs vermutet wurde, das bE/bW-Heterodimer einen Transkriptionsfaktor reguliert, der das *b*-Signal weiterleitet, sollten in den gewählten Mutageneseansätzen haploide Stämme isoliert werden können, die ebenso die pathogene Entwicklung vollziehen wie haploide Zellen, die ein aktives bE/bW-Heterodimer ausbilden. Die Entdeckung der Mutation *rtf1* (Banuett, 1991) ließ erstmals auf die Existenz eines solchen Gens schließen.

2.1.1.1. Die Wirtspflanze Mais als direktes Selektionssystem für pathogene *U.maydis* Stämme

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Selektionssystem entwickelt, das zur Isolierung von pathogenen *U.maydis* Stämmen dienen konnte. Durch Infektionsexperimente mit Mischkulturen des haploiden, apathogenen Stammes FB1 (*a1 b1*) und des isogenen, aber pathogenen Stammes CL13 (*a1 bE1 bW2*) wurde die zur Tumorentwicklung erforderliche Zellzahl eines pathogenen Stammes in einer Suspension haploider Zellen bestimmt. Die Stämme FB1 und CL13 wurden bis zu einer Zelldichte von $1,0 \times 10^7$ Zellen ml⁻¹ kultiviert und anschließend in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt (Tab. 1). Dabei wurde jeweils eine Gesamtzellkonzentration von $1,0 \times 10^7$ Zellen ml⁻¹ eingestellt. Maispflanzen wurden mit den Mischsuspensionen bzw. mit den Kontrollstämmen FB1 und CL13 in Reinkultur inokuliert und die Tumorbildung nach 10-tägiger Inkubation analysiert (Tab. 1). Dabei konnte bis zu einem Verhältnis von 1:100 des pathogenen CL13 Stammes in Mischsuspensionen eine zur Infektion mit CL13 in Reinkultur vergleichbare Rate der Tumorentwicklung beobachtet werden. Sank der Anteil des pathogenen Stammes auf 10^{-3} im Inokulum, entwickelten sich noch bei etwa einem Drittel der untersuchten Pflanzen Tumore. Bei einem Verhältnis von 10^{-4} kam es bei 3,0% der untersuchten Pflanzen zur Tumorentwicklung. Reduzierte man die Anzahl von CL13-Zellen weiter, wurde auch die Ausbildung von Tumoren nahezu vollständig verhindert (Tab. 1).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Tumorentwicklung mit der Zahl der pathogenen Zellen im Inokulat korrelierte. Mindestens $1,0 \times 10^5$ pathogene Zellen mussten für eine verlässliche Induktion von Tumoren eingesetzt werden.

Tab. 1. Bestimmung der zur Tumorbildung in Mais erforderlichen Zellzahl des pathogenen Stammes CL13 in einer Suspension haploider FB1 Zellen.

	Anteil in 10 ⁷ Zellen [CL13/FB1]	Anzahl der infizierten Pflanzen	Anzahl der Pflanzen mit Tumoren	Infektionsfrequenz [%]
CL13	—	8	7	88
	1	11	7	64
	10 ⁻¹	4	3	75
	10 ⁻²	23	14	61
	10 ⁻³	40	13	33
	10 ⁻⁴	63	2	3
	10 ⁻⁵	39	0	0
	10 ⁻⁶	41	1	2
	10 ⁻⁷	12	0	0
FB1	—	11	0	0

Die angegebene Anzahl von Maispflanzen (Early Golden Bantam) wurden jeweils mit (Misch)-Suspensionen der Stämme CL13 und FB1 bei einer Konzentration von 1,0 x 10⁷ Zellen ml⁻¹ infiziert (4.7.8). Die Auswertung der Tumorentwicklung erfolgte 10 Tagen nach Inokulation.

2.1.1.2. Die Entwicklung eines REMI-Mutagenesesystem zur Aktivierung und Inaktivierung von Genen

Da vorstellbar ist, dass das gesuchte regulatorische Gen, das durch bE/bW direkt reguliert wird, aktiviert oder reprimiert wird (1.6), wurde in dem gewählten Mutageneseansatz zur Isolierung pathogener Stämme neben Geninaktivierung auch eine transkriptionelle Aktivierung von Klasse I Genen berücksichtigt.

REMI (*restriction enzyme-mediated integration*) beruht auf der Verwendung eines Restriktionsenzym und eines Plasmids mit entsprechender, singulärer Schnittstelle im Transformationsansatz und führt zur Integration der Plasmid-DNA in entsprechende Restriktionsschnittstellen im Genom der Transformanden (Kuspa and Loomis, 1992). REMI wurde in vorhergehenden Arbeiten für *U.maydis* etabliert (Bölker et al., 1995a). Auf Basis des REMI-Insertionsplasmids pSMUT (Bölker et al., 1995b) wurde der Vektor pREMI^{on-off} erstellt (4.4.1). pREMI^{on-off} trägt in unmittelbarer Nähe zur singulären *Bam*HI Schnittstelle, die in den folgenden Transformationsansätzen zur Linearisierung des Plasmids genutzt wurde, den konstitutiven *tef1*-Promotor (Abb. 5a). Bei Integration von pREMI^{on-off} in das Genom von *U.maydis* könnte eine durch *tef1*-Sequenzen vermittelte, transkriptionelle Aktivierung benachbarter Gene hervorgerufen werden. Ebenso waren Insertionsereignisse in kodierende oder regulatorische Regionen denkbar, die zur Inaktivierung der Genexpression führen können (M. Bölker, pers. Mitteilung; Abb. 5b).

Als Ausgangsstamm für die REMI-Mutagenese diente FB1 (*al b1*). Es wurden Protoplastensuspensionen zur Transformation mit 2,0 µg pREMI^{on-off} und 50 U *Bam*HI behandelt. Ausgehend von 50 µl Protoplastensuspension mit wenigstens 1,0 x 10⁶ Zellen konnten so durchschnittlich 10 Transformanden erzeugt werden. Insgesamt wurden 1680

Transformationsansätze durchgeführt (4.7.3). Die Integration von pREMI^{on-off} wurde bei 13 zufällig ausgewählten Transformanden in einer Southern-Analyse untersucht (4.8.2.1). Mit einer *tefl*-spezifischen Probe konnte bei 11 Transformanden neben unterschiedlich großen hybridisierenden Banden ein 11 kb *Bgl*II-Fragment des genomischen *tefl*-Locus nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass es lediglich bei zwei Transformanden zur homologe Integration von pREMI^{on-off} in den *tefl*-Locus kam, während die übrigen Transformanden pREMI^{on-off} an unterschiedlichen Stellen im Genom trugen (Abb. 5c; Spur 3 und 4). Bei zwei weiteren der untersuchten Transformanden wurde pREMI^{on-off} mehrfach integriert (Abb. 5c; Spur 8 und 10). In der analysierten Stichprobe des REMI^{on-off}-Mutagenesesystems waren somit etwa 70% der Integrationsereignisse ektopisch und singular. Es wurden $1,5 \times 10^4$ REMI^{on-off}-Stämme hergestellt, die in 300 "Pools" zu je 40-60 REMI^{on-off}-Stämmen zusammengefasst wurden (4.7.3). Die einzelnen "Pools" wurden in Flüssigkultur vermehrt. Es wurden jeweils 6-8 Pflanzen infiziert und die Tumorentwicklung nach 10 Tagen Wachstum unter Gewächshausbedingungen analysiert (4.7.8). Insgesamt wurden 2484 Maispflanzen inokuliert. Bei den "Pools" 49, 51, 67, 143, 153 und 256 konnten zunächst die Bildung von Chlorosen und schwacher Anthocyanverfärbung von Maisblättern beobachtet werden. Die wiederholte Infektion von jeweils 12 Pflanzen bestätigte die ursprünglich beobachtete Blattverfärbung jedoch nicht. Tumore konnten in keinem Fall erzeugt werden (nicht gezeigt). Da für einen erfolgreichen Infektionsverlauf der Anteil pathogener Zellen im Inokulum nur gering sein musste (2.1.1.1), konnte es als unwahrscheinlich gelten, dass eine *rtfl*-ähnliche REMI^{on-off}-Mutante hergestellt wurde, die nicht im direkten Selektionsverfahren detektiert werden konnte. Eine weitere Bearbeitung dieses REMI^{on-off}-Ansatzes zur Identifizierung von regulatorischen Genen, die durch das bE/bW-Heterodimer reguliert werden, erschien wenig erfolgsversprechend und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

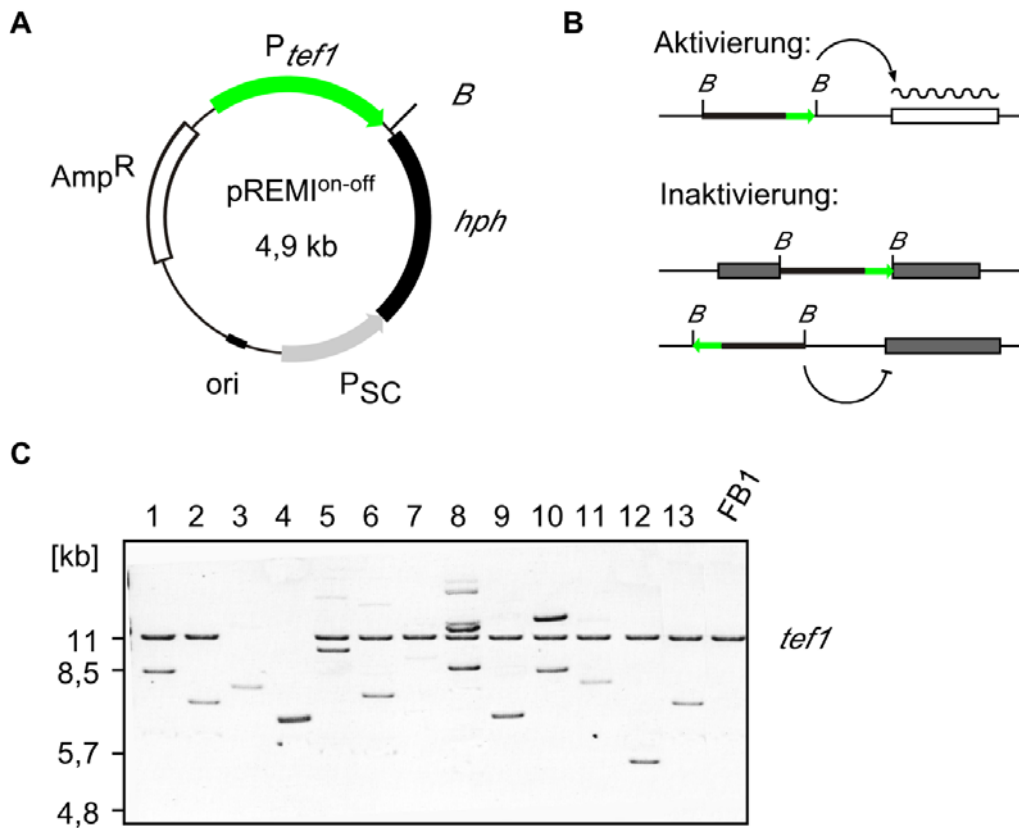


Abb. 5. Das REMI^{on-off}-Mutagenesesystem.

(a) Schematische Darstellung von pREMI^{on-off}. Der grüne Pfeil bezeichnet regulatorische *tef1*-Sequenzen (*P_{tef1}*), die als *Xba*I/*Hind*III-Fragment Promotoraktivität in *U.maydis* zeigen (M. Bölker, pers. Mitteilung). Die singuläre *Bam*HI (*B*) Schnittstelle wurde zur Linearisierung von pREMI^{on-off} verwendet. Der graue Pfeil bezeichnet ein hoch repetitives DNA-Fragment aus *S.cerevisiae* mit Promotoraktivität in *U.maydis* (*P_{SC}*), das *hph* zur Ausbildung der Hygromycinresistenz antreibt (Bölker et al., 1995a).

(b) Mögliche Insertionsereignisse, die zu Genaktivierung (hellgrün) oder Inaktivierung (braun) führen könnten. Gene sind als Kästen dargestellt, nicht kodierende Regionen als dünne Linie. Dicke Linien stellen den integrierten Vektor pREMI^{on-off} dar. Der grüne Pfeil symbolisiert die Orientierung des *tef1*-Promotors.

(c) Southern-Analyse 13 zufällig ausgewählter REMI^{on-off}-Mutanten. Die DNA der untersuchten Stämme wurde mit *Bgl*II gespalten und auf eine Membran übertragen. Als Sonde für die anschließende Hybridisierung wurde ein *tef1*-Fragment verwendet (4.8.2.5). Die 11,0 kb Bande zeigt den genomischen *tef1*-Locus des Ausgangsstammes FB1 und der untersuchten Transformanten an. Bei den Transformanten #3 und #4 kam es zur homologen Integration von pREMI^{on-off} in den *tef1*-Locus, bei #8 und #10 zur Mehrfachintegration von pREMI^{on-off}.

2.1.2. Die Isolierung und Klassifizierung von Mutanten mit EG-Aktivität

2.1.2.1. Die Herstellung und Isolierung der MRn-1 Stämme

Da es nicht gelang, im REMI^{on-off}-Ansatz pathogene Stämme zu isolieren (2.1.1), wurde die alternative Strategie der UV-Mutagenese (4.10.1) gewählt, zumal auf diesem Wege bereits ein *rtf1*-Stamm erzeugt werden konnte, der sich pathogen entwickelte (Banuett, 1991). Ein Vorteil gegenüber der REMI-Mutagenese bestand in der Möglichkeit mit vergleichbarem experimentellem Aufwand eine große Anzahl mutagenisierter Stämme herstellen zu können. Nach der UV-Mutagenese wurde mit 5×10^5 Überlebenden weitergearbeitet (4.10.1).

Die unter 2.1.1 geschilderte Selektionsstrategie in Mais hätte übertragen auf die Anzahl der hergestellten UV-Mutanten außerordentlich umfangreiche Pathogenitätstests nach sich gezogen. Um die Zahl der zu untersuchenden Stämme zu begrenzen, wurden zunächst Mutanten isoliert, die Endoglukanase (EG) sekretieren. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die ursprünglich filamentspezifische Expression des Endoglukanasegens *egl1* mit der Ausbildung der pathogenen Entwicklung korrelierte (Schauwecker et al., 1995).

Die überlebenden Zellen wurden auf CMC-Platten übertragen und nach 36 Stunden Wachstum im EG-Test analysiert (4.9). 45 Kolonien zeigten EG-Aktivität. Nach wiederholter Vereinzelung der Kolonien wurden jeweils drei Klone nochmals im EG-Test untersucht (nicht gezeigt). Für 24 unabhängige Stämme ließ sich die EG-Aktivität bestätigen. Diese Stämme wurden mit MRn-1 bezeichnet, wobei n für die jeweilige Stammnummer steht und -1 die Behandlung mit UV anzeigt (4.3). Bemerkenswert war, dass CL13, SG200 und FBD11, die ein aktives bE/bW-Heterodimer ausbildeten, keine EG-Aktivität aufwiesen (Tab. 2).

2.1.2.2. Die pathogene Entwicklung der MRn-1 Stämme

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Untersuchung der MRn-1 Stämme war die mögliche, pathogene Entwicklung. Es galt zu klären, ob *rtf1*-ähnliche MRn-1 Stämme erzeugt wurden.

Die MRn-1 Stämme wurden in Reinkultur in Maispflanzen injiziert (4.7.8). Als Kontrolle wurde die pathogene Entwicklung des haploide Stammes FB1, der haploiden, pathogenen Stämme CL13 und SG200 und des diploiden, pathogenen Stammes FBD11 verfolgt (Tab. 2). Alle untersuchten MRn-1 Stämme konnten wie der Wildtypstamm FB1 auch 16 Tage nach Inokulation keine Tumorentwicklung in Mais auslösen. Die Kontrollstämme CL13, SG200 und FBD11 führten zu diesem Zeitpunkt erwartungsgemäß zur Bildung von Tumoren an der Pflanze. Die isolierten MRn-1 Stämme waren zwar durch EG-Aktivität gekennzeichnet, aber nicht zur pathogenen Entwicklung in der Lage.

Es wurden Kreuzungsprodukte der MRn-1 Stämmen mit dem kompatiblen Wildtypstamm FB2 im Pathogenitätstest untersucht. Die Auswertung der Tumorentwicklung erfolgte nach 16 Tagen. Obwohl die untersuchten MRn-1 Stämme vermutlich eine Mutation innerhalb der *b*-abhängigen Regulationskaskade trugen, konnten sie in Kombination mit FB2 zur Tumorbildung führen (Tab. 2). Dies zeigte, dass in MRn-1 Stämmen die Fähigkeit zur Ausbildung eines infektiösen Dikaryons mit einem kompatiblen Wildtypstamm nicht betroffen war.

Tab. 2. Die pathogene Entwicklung der MRn-1 Stämme.

	Stamm	EG	Anzahl der Tumore/Anzahl der inokulierten Pflanzen		Stamm	EG	Anzahl der Tumore/Anzahl der inokulierten Pflanzen		
			x FB2				x FB2		
1	MR1-1	+	0/12	3/4	13	MR19-1	+	0/5	4/4
2	MR2-1	+	0/12	1/3	14	MR20-1	+	0/4	2/4
3	MR6-1	+	0/12	3/4	15	MR21-1	+	0/4	2/4
4	MR7-1	+	0/12	2/4	16	MR23-1	+	0/4	[3/4]
5	MR8-1	+	0/12	[2/4]	17	MR24-1	+	0/4	3/3
6	MR9-1	+	0/12	[4/4]	18	MR25-1	+	0/4	2/2
7	MR10-1	+	0/12	2/4	19	MR26-1	+	0/7	1/3
8	MR11-1	+	0/12	4/4	20	MR27-1	+	0/8	2/3
9	MR12-1	+	0/12	2/4	21	MR28-1	+	0/4	4/4
10	MR15-1	+	0/12	4/4	22	MR29-1	+	0/7	3/4
11	MR17-1	+	0/8	3/4	23	MR30-1	+	0/7	4/4
12	MR18-1	+	0/7	1/3	24	MR31-1	+	0/3	4/4
	FB1	-	0/4	2/3		SG200	-	4/4	n.u.
	CL13	-	3/3	n.u.		FBD11	-	3/4	n.u.

Die Tumorentwicklung von 24 haploiden MRn-1 Stämmen, die Endoglukanase sekretierten (+), und der Referenzstämmen FB1, CL13, SG200 und FBD11 wurde 16 Tagen nach Inokulation von Mais bestimmt. FB1, CL13, SG200 und FBD11 zeigten keine EG-Aktivität (-). In Kombination mit FB2 führten die untersuchten MRn-1 Stämme und FB1 zur Entwicklung von Tumoren in Maispflanzen. Aufgeführt ist jeweils das Verhältnis der Tumorbildung zur Anzahl infizierter Pflanzen. Die in Klammern angegebenen Werte kennzeichnen die Entwicklung von unreifen, grünen Tumoren. n.u. nicht untersucht.

2.1.2.3. Die Kolonimorphologie der MRn-1 Stämme

Die untersuchten MRn-1 Stämme wurden auf PD-Aktivkohle Medium (PD-CC), PD-Medium (PD), YEPD-Medium (YEPD), YT-Medium (YT), CMC-Medium (CMC) und Minimalmedium (MM) ausgestrichen (4.7.1) und 12 Stunden bei 28°C inkubiert (Tab. 3).

Sie bildeten unter allen getesteten Medienbedingungen ohne auffällige Verzögerung Kolonien. Die MRn-1 Stämme waren im Wachstum nicht gestört (nicht gezeigt). MR1-1, MR2-1, MR6-1, MR7-1, MR8-1, MR9-1 und MR11-1 zeigten in Abhängigkeit der Zusammensetzung des Wachstumsmediums jedoch vom Wildtyp abweichende Kolonimorphologien. MR11-1 bildete auf allen getesteten Medien Filamente, MR2-1 und MR8-1 nur nach Wachstum auf MM, und MR6-1 nur auf YT. MR1-1 wuchs auf PD-CC und YEPD filamentös und bildete nach Wachstum auf MM dunkle Kolonien. Letzteres Merkmal war auch bei den Stämmen MR7-1 und MR9-1 nach Wachstum auf PD-CC, PD, CMC und MM ausgeprägt, wobei nur MR7-1 auf YT-Medien eine dunkle Färbung der Kolonie zeigte (Tab. 3).

Bemerkenswert war, dass mit Ausnahme von MR11-1 alle MRn-1 Stämme bei der Analyse der EG-Aktivität auf CMC-Medium eine glatte Kolonimorphologie ausbildeten. Diese MRn-1 Stämme sekretierten Endoglukanase, obwohl bei Wildtypzellen die Expression der Endoglukanase EG1 mit filamentösem Wachstum verbunden war (Schauwecker et al., 1995).

Offenbar lagen bei der Mehrzahl der MRn-1 Stämme Mutationen in Genen vor, die zur Entkopplung des Morphologiewechsels und EG-Aktivität führten.

Tab. 3. Die Koloniemorphologie der MRn-1 Stämme.

	YEPD	YT	PD-CC	PD	CMC	MM
MR1-1	fuz ⁺	wt	fuz ⁺	wt	wt	db
MR2-1	wt	wt	wt	wt	wt	fuz ⁺
MR6-1	wt	fuz ⁺	wt	wt	wt	wt
MR7-1	n.u.	db	db	db	db	db
MR8-1	wt	wt	wt	wt	wt	fuz ⁺
MR9-1	n.u.	wt	db	db	db	db
MR11-1	fuz ⁺	fuz ⁺	fuz ⁺	fuz ⁺	fuz ⁺	fuz ⁺
MR10-1	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MR12-1	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MR15-1	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MR17-1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wt	n.u.
MR18-1	wt	n.u.	wt	n.u.	wt	wt
MR19-1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wt	n.u.
MR20-1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wt	n.u.
MR21-1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wt	n.u.
MR23-1	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MR24-1	wt	n.u.	wt	n.u.	wt	wt
MR25-1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wt	n.u.
MR26-1	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MR27-1	wt	n.u.	n.u.	n.u.	wt	wt
MR28-1	wt	n.u.	n.u.	n.u.	wt	wt
MR29-1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wt	n.u.
MR30-1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wt	n.u.
MR31-1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wt	n.u.
FB1	wt	wt	wt	wt	wt	wt

Die MRn-1 Stämme wurden auf den angegebenen Medien (4.7.1) kultiviert. Anschließend erfolgte die makroskopische Beurteilung der Pilzkolonie hinsichtlich Wildtypmorphologie (wt), Filamentbildung (fuz⁺) und dunkler, brauner Koloniefärbung (db). n.u. nicht untersucht. Die oben aufgeführten Stämme MR1-1, 2-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1 und 11-1 zeigten eine vom Wildtyp FB1 abweichende Koloniemorphologie. Die weiteren MRn-1 Stämme entsprachen FB1.

2.1.2.4. Die MRn-1 Stämme im Kreuzungstest

Im Kreuzungstest der haploiden MRn-1 Stämme mit FB2 konnte die Aktivität der *a* und *b*-Kreuzungstyploci analysiert werden. Ausgewählte MRn-1 Stämme und der Wildtypstamm FB2 wurden in YEPS kultiviert. Zur Kreuzung wurden die entsprechenden Kulturen der MRn-1 Stämme mit FB2 gemischt. Es wurden jeweils die Reinkulturen und die Kreuzungsansätze auf PD-CC Medium übertragen. Die Analyse der Filamentbildung erfolgte nach 36 Stunden Inkubation (4.7.7).

MR1-1, MR2-1, MR7-1, MR9-1, MR11-1, MR12-1, MR15-1, MR23-1, MR24-1 und MR26-1 zeigten in der Kreuzung mit FB2 wie Wildtypzellen Filamentbildung auf Aktivkohle-

haltigen Medien (Abb. 6). Es lag in diesen Stämmen offensichtlich kein Defekt in der Zell-Zell Erkennung oder im filamentösen Wachstum vor. MR6-1, MR8-1, MR10-1 und MR25-1 zeigten in Kombination mit dem kompatiblen Wildtypstamm FB2 auf PD-CC Medium eine deutlich reduzierte Filamentbildung (Abb. 6). Die entsprechenden Mutationen könnten demnach Prozesse der interzellulären Erkennung oder der Aufrechterhaltung des Filaments betreffen, die der Kontrolle der Kreuzungstypocli *a* und *b* unterliegen. Da allerdings diese Stämme in der Lage waren, zusammen mit FB2 in Maispflanzen Tumore zu induzieren (2.1.2.2), schien die beobachtete, reduzierte Filamentbildung auf Aktivkohle-Platten zumindest in der Pflanze ausreichend zur Aufrechterhaltung infektiöser Filamente zu sein.

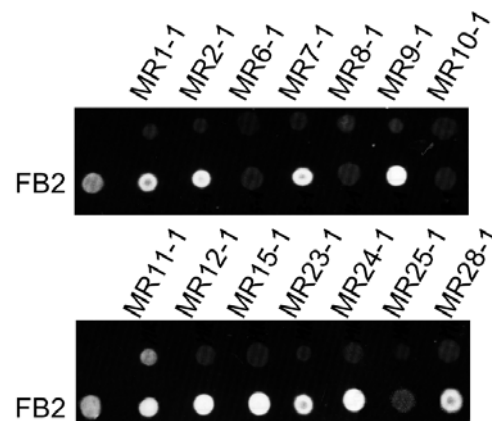


Abb. 6. Die Kreuzungsanalyse der MRn-1 Stämme.

MR1-1, MR2-1, MR6-1, MR7-1, MR8-1, MR9-1, MR10-1, MR11-1, MR12-1, MR15-1, MR23-1, MR24-1, MR25-1, MR26-1 und FB2 wurden im Kreuzungstest analysiert. Helle Kolonien zeigten Filamentbildung an. Die Stämme MR6-1, MR8-1, MR10-1 und MR25-1 waren nach Kreuzung mit FB2 in ihrer Filamentbildung betroffen. Die haploiden Stämme MR11-1 und FB2 bildeten graue, filamentöse Kolonien aus, die aber deutlich vom weißen Mycel dikaryotischer Filamente unterschieden werden konnten.

2.1.2.5. Das Expressionsprofil von *b*-abhängigen Genen in Stämmen mit EG-Aktivität

Haploide MRn-1 Stämme produzierten Endoglukanase und sollten deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit eine erhöhte *egl1* Expression aufweisen. Falls die entsprechenden Mutationen in regulatorischen Genen lagen, könnte darüber hinaus die Expression weiterer *b*-abhängiger Gene betroffen sein. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde eine detaillierte Expressionsanalyse der *b*-abhängigen Gene *egl1*, *rep1*, *hum2*, *dik1* und *dik6* durchgeführt. Die MRn-1 Stämme, der Stamm FB1M#2, der ebenfalls EG-Aktivität aufwies (Quadbeck-Seeger, 1998), und der Wildtypstamm FB1 wurden in YEPS kultiviert. Es erfolgte die Präparation der Gesamt-RNA (4.8.1.6). Die RNA wurden auf Filter übertragen und mit genspezifischen Sonden für *egl1*, *rep1*, *hum2*, *dik1* und *dik6* hybridisiert (4.8.2.3 und 4.8.2.5). Die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte mit Hilfe des Programms IQMac v1.2 (Molecular Dynamics). Die Daten wurden in einem Tabellenkalkulationsprogramm verarbeitet und in Tabelle 4 zusammengefasst.

MR7-1 und MR9-1 zeigten ein besonders auffälliges Expressionsprofil haploider Zellen. Ohne dass sich ein aktives bE/bW-Heterodimer ausbildete, waren neben *egl1* die Transkripte von *rep1*, *hum2* und *dik1* gegenüber FB1 deutlich angereichert (Tab. 4).

Die Expression von *egl1*, *rep1* und *hum2* war in den Stämmen FB1M#2, MR12-1 und MR15-1 etwa zehnfach gegenüber FB1 Zellen erhöht. Im Stamm MR11-1 ließ sich eine etwa zehnfache Induktion der Transkripte *egl1* und *rep1* feststellen. *hum2* war zweifach induziert. In MR2-1 war für *rep1* und *hum2* ein zehnfach, *egl1* ein zweifach erhöht gegenüber der Wildtypkontrolle. Die Mutante MR8-1 zeigte für *egl1* ein zehnfache, für *rep1* eine etwa zweifache Induktion der Transkripte. In den Stämmen MR23-1, MR25-1 und MR28-1 war die Expression der Gene *egl1* und *rep1* zweifach induziert nachweisbar. Bei MR1-1 und MR10-1 kam es zur zehnfachen bzw. zweifachen Expression von *egl1*. MR6-1 zeigte ein etwa zweifach induziertes *rep1* Transkript. In jedem Fall lag die Expression von *dik6* unterhalb der Nachweisgrenze (Tab. 4). Die jeweiligen Transkriptsignale wurden mit den Signalen des konstitutiv exprimierten Gens *ppi* abgeglichen (nicht gezeigt).

Obwohl die Stämme MR6-1, MR13-1, MR17-1, MR18-1, MR19-1, MR20-1, MR21-1, MR24-1, MR26-1, MR27-1, MR29-1, MR30-1 und MR31-1 Endoglukanase sekretieren, war kein *egl1* Transkript detektierbar (Tab. 4). Schauwecker et al. (1995) postulierten neben *egl1* weitere *egl*-Gene, die vermutlich in dieser Gruppe der MRn-1 Stämme exprimiert wurden.

Weil mit Ausnahme von *dik6* die Expression aller untersuchten, differentiell exprimierten Gene in MR7-1 und MR9-1 nachgewiesen werden konnte, sollten die betroffenen Gene eine zentrale regulatorische Funktion bei der Regulation *b*-abhängig exprimierter Gene erfüllen. Bei den übrigen MRn-1 Stämmen und bei FB1M#2 waren höchstens drei unterschiedliche Transkripte *b*-abhängiger Gene festzustellen (Tab. 4).

Die Expressionsanalyse in MRn-1 Stämmen zeigte, dass die jeweiligen Mutationen zur Expression einer unterschiedlichen Anzahl von *b*-abhängigen Genen führte, die in Wildtypzellen nicht zur Expression kamen. Möglicherweise sind in den entsprechenden MRn-1 Stämmen regulatorische Gene der *b*-Regulationskaskade betroffen. Dieses Ergebnis ließ auf die Beteiligung einer Vielzahl regulatorischer Gene an der Expressionskontrolle *b*-abhängiger Gene in haploiden Zellen schließen.

Tab. 4. Die Expression *b*-abhängiger Gene in MRn-1 Stämmen und FB1M#2.

Stamm	<i>egl1</i>	<i>rep1</i>	<i>hum2</i>	<i>dik1</i>	<i>dik6</i>
MR7-1	+++	+++	+++	+++	-
MR9-1	+++	+++	+++	+++	-
MR12-1	+++	+++	+++	-	-
MR15-1	+++	+++	+++	-	-
FB1M#2	+++	+++	+++	-	-
MR2-1	+	+++	+++	-	-
MR11-1	+++	+++	+	-	-
MR8-1	+++	+	-	-	-
MR23-1	+	+	-	-	-
MR25-1	+	+	-	-	-
MR28-1	+	+	-	-	-
MR1-1	+++	-	-	-	-
MR10-1	+	-	-	-	-
MR6-1	-	+	-	-	-
MR17-1	-	-	-	-	-
MR18-1	-	-	-	-	-
MR19-1	-	-	-	-	-
MR20-1	-	-	-	-	-
MR21-1	-	-	-	-	-
MR24-1	-	-	-	-	-
MR26-1	-	-	-	-	-
MR27-1	-	-	-	-	-
MR29-1	-	-	-	-	-
MR30-1	-	-	-	-	-
MR31-1	-	-	-	-	-
FB1	-	-	-	-	-

Die Expression *b*-abhängiger Gene wurde mit *egl1*, *rep1*, *hum2*, *dik1* und *dik6* spezifischen Sonden analysiert (4.8.2.5). Die Signale wurden mit Hilfe des konstitutiv exprimierten Gens *ppi* abgeglichen (nicht gezeigt) und sind in drei Kategorien klassifiziert: +++ \geq 10x FB1-Signalstärke, + \geq 2x FB1-Signalstärke und - \leq FB1-Signalstärke. Die Stämme MR17-1 - MR31-1 exprimierten keines der untersuchten differentiellen Gene und zeigten auch bei der Analyse der pathogenen Entwicklung (2.1.2.2), der Koloniemorphologie (2.1.2.3) und im Kreuzungstest (2.1.2.4) keinen Unterschied zum Wildtypstamm FB1.

2.2. Die Histondeacetylase Hda1

2.2.1. Die Charakterisierung der UV-induzierten Mutation in MR9-1

2.2.1.1. Die Komplementation von MR9-1

Das in MR9-1 betroffene Gen übt mit großer Wahrscheinlichkeit eine zentrale, regulatorische Funktion bei der Kontrolle *b*-abhängiger Gene aus (2.1.2). In einer Komplementationsanalyse sollte das Gen isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde eine frei replizierende pCM54 Plasmid-Bank, die durchschnittlich 8,0 kb lange genomische DNA-Fragmente aus *U.maydis* enthält (Tsukuda et al., 1989) in einem Transformationsexperiment in Protoplasten des Stammes MR9-1 übertragen. Es wurden $3,0 \times 10^4$ Transformanten erzeugt, die pCM54-Bank Plasmide trugen (4.10.3). Die Transformanten wurden auf CMC-Medien und PD-Medium übertragen und 48 Stunden bei 21°C inkubiert. Interessanterweise bildeten nicht komplementierte Stämme dunkle Kolonien auf PD (siehe auch 2.1.2.3). Darunter wurden sieben Transformanten (MR9-1#1, #3, #4, #5, #13, #14, #15) mit einer für Wildtypstämme charakteristischen hellen Koloniefärbung identifiziert. Im parallel durchgeführten EG-Test zeigten diese Stämme keine nachweisbare EG-Aktivität (Abb. 7). Es wurde angenommen, dass diese Transformanten Plasmidsequenzen trugen, die die ursprüngliche Mutation komplementierten.

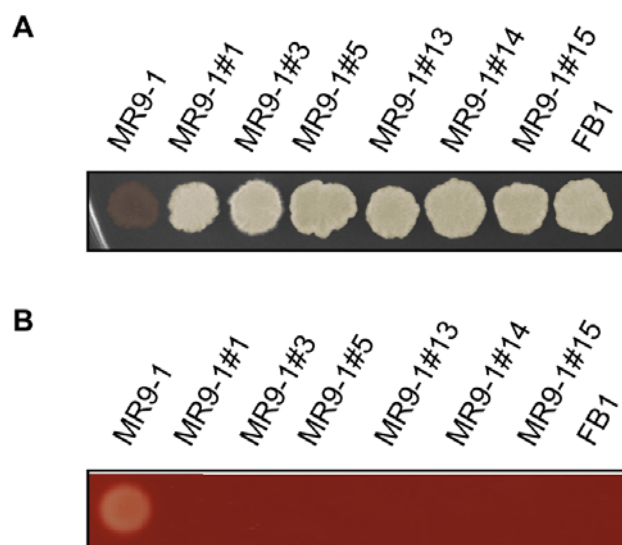


Abb. 7. Komplementationsanalyse von MR9-1.

Analyse der UV-Mutante MR9-1, des Wildtypstammes FB1 und der Transformanten MR9-1#1, MR9-1#3, MR9-1#4, MR9-1#5, MR9-1#13, MR9-1#14 und MR9-1#15, die Plasmide der pCM54-Bank (Tsukuda et al., 1989) enthielten.

(a) Darstellung der dunklen Koloniefärbung von MR9-1. Im Gegensatz dazu zeigten Kolonien der komplementierten Stämme das glatte, helle Erscheinungsbild von Wildtypstämmen.

(b) MR9-1 bildete weiße Bereiche auf CMC-Medien nach Färbung mit Kongorot (4.9) und zeigte damit EG-Aktivität. Wie der Wildtyp hatten komplementierte Stämme keine nachweisbare EG-Aktivität.

Nach DNA-Präparation aus Kulturen der Transformanten MR9-1#1, #3, #4, #5, #13, #14, #15 wurden die komplementierende Plasmide in *E.coli* übertragen (4.10.3). Die Plasmide der Stämme MR9-1#1, #4, #14 und #15 wurden isoliert und entsprechend mit p9-1#1, #4, #14,

#15 bezeichnet. In einer Restriktionskartierung zeigten p9-1#1, p9-1#14 und p9-1#15 ein identisches Muster, das auf ein genomisches, etwa 9,0 kb großes Fragment deutete (nicht gezeigt). p9-1#4 war durch ein Restriktionsmuster charakterisiert, das auf ein 13,0 kb großes und zu p9-1#1, p9-1#14 und p9-1#15 überlappendes, genomisches Fragment hinwies (nicht gezeigt). p9-1#1, p9-1#14 und p9-1#15 konnten in MR9-1 sowohl die dunkle Koloniefarbe wie auch die EG-Aktivität der ursprünglichen Mutante MR9-1 komplementieren (nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass die Komplementation unspezifisch war, wurde p9-1#14 in die Stämme MR1-1, MR2-1, MR6-1, MR11-1, MR24-1, MR25-1 und MR28-1 eingebracht. Trotzdem wiesen diese Transformanden EG-Aktivität auf (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigten, dass ein 9,0 kb großes Fragment des Plasmids p9-1#14 die Mutation von MR9-1 spezifisch komplementieren konnte.

2.2.1.2. Die Identifikation von *hda1*

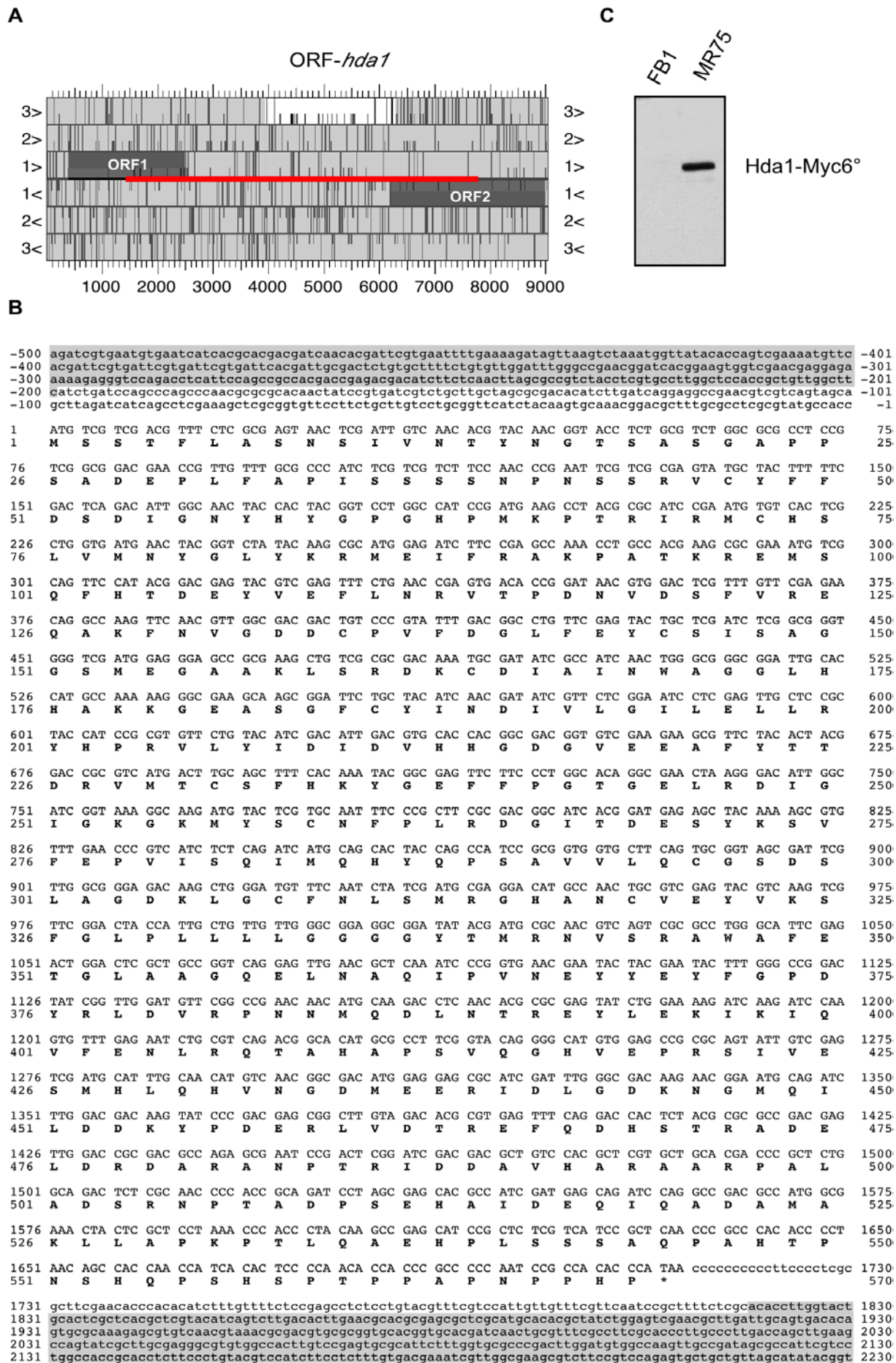
Eine detaillierte Restriktionsanalyse von p9-1#14 führte zur Erzeugung einer Restriktionskarte des komplementierenden Fragments (nicht gezeigt) und ermöglichte so die Herstellung geeigneter Plasmid-Subklone (4.4.3). Die vollständige, doppelsträngige Bestimmung der DNA-Sequenz des genomischen 9,0 kb Fragments aus p9-1#14 wurde unter Verwendung dieser Plasmid-Subklone und geeigneter Primer erreicht (4.10.5). In Abb. 8a ist die, von der Sequenzinformation abgeleitete, Genorganisation des komplementierenden Locus gezeigt. Auf dem Fragment von p9-1#14 befinden sich drei große, offene Leseraster (ORF). Um zweifelsfrei festzustellen, welcher Sequenzbereich zur Komplementation von MR9-1 führte, wurde das frei replizierende Plasmid pHda1-cbx konstruiert (4.4.3). Das 6375 bp große *Bam*HI/*Hind*III-Fragment aus p9-1#14 enthielt den Bereich eines offenen Leserasters. pHda1-cbx wurde in MR9-1 eingebracht und führte zur Komplementation der ursprünglichen Mutation (nicht gezeigt). Das komplementierende Gen wurde mit *hda1* bezeichnet (Abb. 8).

Abb. 8. Genomische Organisation des *hda1*-Locus (nächste Seite).

(a) Darstellung der putativen Gene des 9,0 kb, komplementierenden Fragments aus p9-1#14. Kurze, vertikale Striche stehen für ein Methionin-Kodon (ATG). Lange, vertikale Striche bezeichnen die mögliche Stopkodons TGA, TAG und TAA. Unter 3> - 1> sind mögliche Leseraster der jeweiligen Leseraster in 5' nach 3'-Richtung, unter 1< - 3< in 3' nach 5'-Richtung angegeben. Die BLAST2.0 Datenbankanalyse (Altschul et al., 1997) von ORF1 und ORF3 (dunkelgraue Balken) zeigte keine signifikanten Homologien zu bekannten Sequenzen und ließ keinen Rückschluss auf eine mögliche Funktion dieser DNA-Sequenzen zu. Der in pHda1-cbx eingesetzte Bereich ist als roter Balken dargestellt und enthält nur einen offenen Leseraster (ORF *hda1*). *hda1* führte zur Komplementation der EG-Aktivität und dunklen Koloniefärbung von MR9-1 (2.2.1.2).

(b) *hda1* cDNA-Sequenzen sind weiß, die außerhalb der isolierten cDNA liegenden Sequenzen grau unterlegt. Der ORF von *hda1* ist mit Großbuchstaben, 5' und 3'-nichttranslatierter Bereich des *hda1*-Transkripts sind mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Die Aminosäuresequenz des putativen Hda1-Proteins ist in fetten Großbuchstaben unterhalb der DNA-Sequenz angegeben. Hda1 ist vermutlich aus 570 Aminosäuren zusammengesetzt. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 63,2 kDa.

(c) Western-Detektion von Hda1-Myc6° im löslichen Zellextrakt des Stammes MR57 (4.3). Hda1-Myc6° war als singuläre Proteinbande der erwarteten molekularen Masse nachweisbar. Es war keine Kreuzreaktivität der zur Immundetektion eingesetzten primären Antikörper 9E10 und sekundären Antikörper W402B festzustellen (4.6. und 4.13.3).



Zur Überprüfung, ob möglicherweise Introns in *hda1* vorlagen, wurden aus einer cDNA-Bank *hda1*-spezifische Fragmente isoliert (4.10.4). Es konnte eine 2016 bp lange cDNA identifiziert werden, die sich von der genomischen *hda1*-Sequenz ableiten ließ. Die cDNA-Sequenzen von *hda1* enthielt keine Introns und lagen polyadenyliert in der Zelle vor. Das längste cDNA-Fragment besaß am 5'-Ende einen 199 bp langen nicht-translatierten Bereich (UTR), am 3'-Ende einen 107 bp langen UTR gefolgt von einer Poly-Adenin Sequenz (Abb. 8b).

Um das vermutete Hda1-Protein in einer Western-Analyse nachweisen zu können, wurde *hda1* am 3'-Ende mit *myc* Sequenzen versehen. Das Genkonstrukt pHda1myc6°-cbx (4.4.6) kodierte für eine verkürzte Hda1-Variante, die nach Aminosäureposition 524 des postulierten Proteins eine sechsfache Myc-Epitopmarkierung trug. Dabei handelte es sich um das EQKLISEEDL-Epitop aus dem humanen Transkriptionsfaktor c-myc (Ellison and Hochstrasser, 1991). Nach Transformation von MR9-1 führte pHda1myc6°-cbx zur Komplementation der EG-Aktivität, d.h. Hda1-Myc6° besaß die volle Aktivität in *U.maydis*, obwohl 46 Aminosäuren des C-Terminus von Hda1 fehlten (nicht gezeigt). Der resultierende Stamm wurde mit MR57 bezeichnet.

MR57 wurde kultiviert, die Zellen geerntet und in der "French Press" aufgeschlossen. Der lösliche Gesamtproteinextrakt wurde auf einem 12% Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurde auf einen Nylonfilter übertragen (4.13.3). Der Nachweis von Hda1-Myc6° erfolgte nach Immundekoration mit dem monoklonalen Antikörper 9E10 (anti-Myc) und dem sekundären HRP-konjugierten monoklonalen Antikörper W402B (anti-Maus) durch Chemiluminiszenz (4.6). Hda1-Myc6° konnte als etwa 70 kDa Protein detektiert werden (Abb. 8c). Dieses Resultat stand in voller Übereinstimmung zur vorhergesagten molekularen Masse des epitopmarkierten Hda1-Myc6° Proteins von 69,2 kDa.

Für eine erste Charakterisierung von *hda1* wurde eine BLAST2.0 Datenbankanalyse durchgeführt (Altschul et al., 1997). Der Vergleich mit homologen Sequenzen ergab signifikante Ähnlichkeit zu Histondeacetylasen (HDAC) wie Rpd3p aus *S.cerevisiae* und hHDAC1 aus Mensch (Abb. 9). Hda1 war auf Ebene der abgeleiteten Proteinsequenz zu 55 % identisch zu Rpd3p. Diese Ergebnisse zeigten, dass *hda1* vermutlich ein Protein mit Histondeacetylase (HDAC)-Aktivität kodiert.

2.2.2. Die Analyse von *hda1*

2.2.2.1. Die Herstellung von $\Delta hda1$ -Stämmen

Um die Funktion(en) von *hda1* weiter analysieren zu können, wurden $\Delta hda1$ -Stämme hergestellt. Zur Inaktivierung von *hda1* wurde das Plasmid pKOhda1 konstruiert, das an Stelle von *hda1* eine Hyg^R-Kassette trägt. Als 5'-flankierende Region von *hda1* wurde das 1795 bp lange *NsiI/SalI*-Fragment, als 3'-flankierende Region das 2397 bp lange *NcoI/AscI*-Fragment aus p9-1#14 eingesetzt. Dabei wurde der ORF *hda1* nahezu vollständig durch eine Resistenzkassette ersetzt (4.4.5). Das über eine *AscI*-Schnittstelle linearisierte Plasmid pKOhda1 wurde in die Stämme FB1 und FB2 eingebracht. Es wurden ausgehend von FB1 42 Stämme und ausgehend von FB2 53 Stämme erzeugt, die eine Resistenz gegenüber Hygromycin im Medium ausbildeten (4.7.3). Es konnten vier FB1-Transformanden (#1-#4) und zwei FB2-Transformanden (#5 und #6) identifiziert werden, die EG-Aktivität aufwiesen. Um die homologe Integration des Geninaktivierungskonstrukts pKOhda1 in den *hda1*-Locus zu überprüfen, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt (4.8.2.1). Es zeigten drei der FB1-Transformanden (#1, #2 und #4) und ein FB2-Transformand (#5) das für $\Delta hda1$ -Stämme erwartete Bandenmuster (nicht gezeigt). Die Transformanden #1 und #5 wurden entsprechend mit MR11 (*a1 b1* $\Delta hda1$) und MR3 (*a2 b2* $\Delta hda1$) bezeichnet (Tab. 5 und 4.3).

In einem parallelen Ansatz wurde pKOhda1 in die Stämme CL13 und SG200 eingebracht. Von 41 Antibiotika-resistenten CL13 Stämmen hatten die Transformanden #7 und #8, von 33 Antibiotika-resistenten SG200 Stämmen die Transformanden #9, #10, #11 und #12 EG-Aktivität. Da bei der anschließenden Southern-Analyse jedoch in allen Fällen neben Banden unterschiedlicher Größe auch ein dem Wildtyp entsprechendes *hda1*-Fragment nachgewiesen wurde, integrierte wahrscheinlich das Genkonstrukt pKOhda1 ektopisch, d.h. nicht am homologen *hda1*-Locus (nicht gezeigt). Obwohl einige Transformanden EG-Aktivität zeigten, wurden demnach keine haploiden Stämme hergestellt, die bei kompatibler Kombination der *b*-Gene eine Deletion in *hda1* aufwiesen (Tab. 5).

Deshalb wurden alternative $\Delta hda1$ -Stämme hergestellt, die unter der Kontrolle induzierbarer, regulatorischer *crg1*-Sequenzen ein aktives bE/bW-Heterodimer ausbilden konnten (siehe 2.5). Das entsprechende Genkonstrukt pKIRE (4.4.5) trug an Stelle von *hda1* eine Hyg^R-Kassette und regulatorische *crg1*-Sequenzen (Bottin et al., 1996) gefolgt von *bE1*. Zur homologen Rekombination in den *hda1*-Locus waren diese Sequenzen am 5'-Ende von einem 1795 bp *NsiI/SalI*-Fragment und am 3'-Ende von einem 2397 bp *NcoI/AscI*-Fragment aus p9-1#14 begrenzt. Das linearisierte Plasmid pKIRE wurde in die Stämme FB1 und FB2 eingebracht (4.7.3). Bei homologer Integration kam es zur Inaktivierung von *hda1* und zugleich zur Integration von *P_{crg1}-bE1* Sequenzen in den *hda1*-Locus. 41 Kolonien, die auf Hygromycin-haltigen Medien regenerierten, wurden im EG-Test untersucht. Die Transformanden mit EG-Aktivität (FB1-Transformanden: #1, #2, #3, #11, #17, #19; FB2-Transformanden: #22, #23, #30, #33, #37, #40) wurden in einer Southern-Analyse überprüft und zeigten das erwartete Bandenmuster von Stämmen nach homologer Integration von

pKIRE (4.4.5). Für die weiteren Analysen wurden der transformierte FB1-Stamm #2 und der transformierte FB2-Stamm #23 eingesetzt, die entsprechend als MR36 (*a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1*) und MR42 (*a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1*) bezeichnet wurden (Tab. 5 und 4.3).

Tab. 5. Die Herstellung von $\Delta hda1$ -Stämmen.

	KO-Plasmid	Transformanden	EG-Aktivität	$\Delta hda1$	Bezeichnung
FB1	pKOhda1	42	4	3	MR11
FB1	pKIRE	20	6	6	MR36
FB2	pKOhda1	53	2	1	MR3
FB2	pKIRE	21	6	6	MR42
CL13	pKOhda1	41	2	0	-
SG200	pKOhda1	33	4	0	-

Die angegebenen Anzahl von Transformanden wurde unter Verwendung der Geninaktivierungskonstrukte (KO-Plasmid) pKOhda1 und pKIRE erzeugt. pKIRE ermöglichte neben Geninaktivierung von *hda1* zugleich die kontrollierte Expression von *bE1*. Zur Selektion möglicher $\Delta hda1$ -Stämme wurden die Transformanden im EG-Test analysiert (4.9). Nur Transformanden mit EG-Aktivität wurden in die nachfolgende Southern-Analyse eingesetzt. Für die weitere Analyse von *hda1* wurden die Stämme MR11, MR36, MR3 und MR42 verwendet. In CL13 und SG200 konnte keine Inaktivierung von *hda1* erreicht werden.

Die vier hergestellten $\Delta hda1$ -Stämme, MR11, MR3, MR36 und MR42 zeigten wie die ursprünglich isolierte Mutante MR9-1 die Ausbildung der charakteristischen dunklen Koloniefarbe nach Wachstum auf PD. Die dunkle Färbung von Kolonien konnte weder beim Wildtyp noch bei $\Delta rum1$ -Stämmen beobachtet werden (Abb. 10a). Zudem waren alle $\Delta hda1$ -Stämme, wie die ursprünglich isolierte FB1 Mutante MR9-1, durch EG-Aktivität gekennzeichnet (Abb. 10b). Die Ergebnisse zeigten, dass die Deletion von *hda1* zur Expression von *egl1* in Sporidien führte.

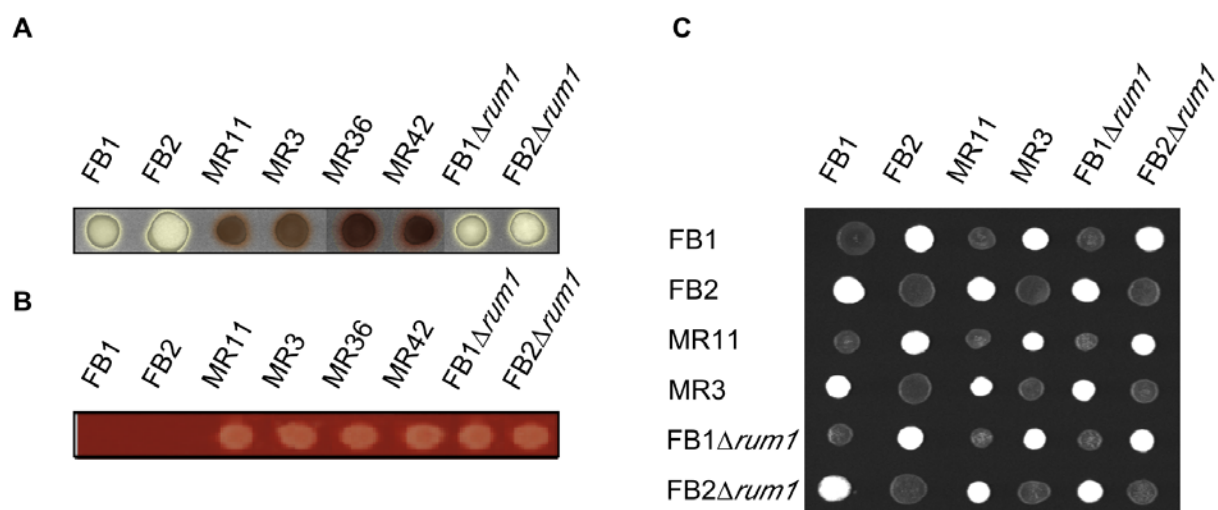


Abb. 10. Die Koloniefärbung, EG-Aktivität und der Kreuzungstest von $\Delta hda1$ -Stämmen (vorherige Seite).

(a) Die dunkle Färbung von Kolonien nach Wachstum auf PD-Medien war charakteristisch für die haploiden $\Delta hda1$ -Stämme MR11, MR3, MR36 und MR42. Haploide Wildtypstämme (FB1 und FB2) und $\Delta rum1$ -Stämme (FB1 $\Delta rum1$ und FB2 $\Delta rum1$) bildeten helle Kolonien.

(b) Haploide $\Delta hda1$ -Stämme und $\Delta rum1$ -Stämme zeigten auf CMC-Medien EG-Aktivität (4.9). Haploide Wildtypstämme besaßen diese Eigenschaft nicht.

(c) Die Kreuzungsanalyse (4.7.7) kompatibler, haploider Stämme zeigte keine veränderte Filamentbildung von $\Delta hda1$ -Stämmen und $\Delta rum1$ -Stämmen gegenüber Wildtypstämmen.

2.2.2.2. Die *hda1*-abhängige, differentielle Genexpression

Zur Untersuchung, ob Hda1 spezifisch die Expression von *egl1* bestimmt, wurde die Expression der *b*-abhängigen Gene (*egl1*, *hum2*, *dik1* und *dik6*), der *b*-Gene und des sporenspezifisch exprimierten Gens *ssp1* in $\Delta hda1$ -Stämmen (MR11 und MR3) überprüft. Wildtypstämme (FB1 und FB2) und $\Delta rum1$ -Stämme (FB1 $\Delta rum1$ und FB2 $\Delta rum1$) dienen dabei als Referenz. Um haploide Zellen mit der dikaryotischen Phase zu vergleichen, wurden die untersuchten Stämme in Reinkultur und in kompatibler Kombination auf Aktivkohleplatten gemischt und 48 Stunden inkubiert. MR11 und MR3 entwickelten sich in allen untersuchten, kompatiblen Kombinationen ohne Unterschied zum Wildtyp oder $\Delta rum1$ -Stämmen filamentös. Bei nicht kompatibler Kombination bildeten $\Delta hda1$ -Stämme glatte Kolonien (Abb. 10c). Die Deletion von *hda1* hat also keinen Einfluss auf die Ausbildung und Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons auf Aktivkohleplatten. Zu bemerken ist, dass in einer Kreuzung nicht alle Zellen quantitativ miteinander fusionieren können. Deshalb wurden Genexpressionsdaten von dikaryotischen Zellen immer als eine Mischung von nicht fusionierten Sporidien und filamentösen Zellen angesehen.

Die RNA wurde wie beschrieben isoliert (4.8.1.4), gelelektrophoretisch getrennt und auf eine Filtermatrix übertragen (4.8.2.3). Der Nachweis der untersuchten Transkripte erfolgte mit genspezifischen Sonden (4.8.2.5).

Obwohl es in haploiden Wildtypzellen nicht zur Expression von differentiell regulierten Genen kam, war in haploiden $\Delta hda1$ -Stämmen mRNA der Gene *egl1*, *hum2* und *dik1* nachweisbar. Das *dik6*-Transkript lag unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 11a). Dieses Ergebnis stand in voller Übereinstimmung mit dem Expressionsprofil der UV-Mutante MR9-1 (Tab. 4). Interessanterweise wurden in haploiden $\Delta hda1$ -Stämmen die Gene des *b*-Locus exprimiert, deren mRNA in haploiden Wildtypzellen nicht nachweisbar war (Abb. 11a). Auch die Transkripte des sporenspezifisch exprimierten Gens *ssp1* waren in haploiden $\Delta hda1$ -Stämmen deutlich detektierbar, während haploide Wildtypstämme kein *ssp1* Signal zeigten (Abb. 11a).

Haploide $\Delta rum1$ -Stämme kennzeichnete ein anderes Expressionsprofil: *egl1* und *hum2* waren in Sporidien schwächer als in haploiden $\Delta hda1$ -Zellen exprimiert, dennoch deutlich erhöht gegenüber Wildtypstämmen. Die Expression von *dik1* und *ssp1* war im Gegensatz zu $\Delta hda1$ -Stämmen nicht nachzuweisen. Das Level der mRNA der *b*-Gene entsprach etwa dem von haploiden $\Delta hda1$ -Stämmen. Wie im Wildtyp und in $\Delta hda1$ -Stämmen lagen *dik6*-Transkripte

unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 11a).

In $\Delta hda1$ -Kreuzungsprodukten ergab sich folgendes Bild: Das Signal der *egl1*-Transkripte entsprach etwa dem von Wildtypkreuzungen. *bW* und *bE* Transkripte waren induziert. Die Signale entsprachen denen von haploiden Zellen und könnten auf einen Anteil von nicht fusionierten Sporidien bei der Kreuzung hinweisen. *hum2*, *dik1* und *ssp1* Transkripte waren in $\Delta hda1$ -Kreuzungsprodukten deutlich gegenüber der Wildtypkontrolle erhöht. Auffällig verhielt sich das *dik6* Transkript. In $\Delta hda1$ -Kreuzungsprodukten wurde *dik6*-mRNA nicht detektiert. In Wildtypkreuzungsprodukten hingegen war ein signifikantes *dik6*-Signal nachweisbar (Abb. 11a).

Ebenso zeigten $\Delta rum1$ -Kreuzungsprodukte ein charakteristisches Expressionsprofil. Im Vergleich zu Kreuzungsprodukten des Wildtyps waren die Signale für *hum2*, *dik1* und *dik6* erhöht. *egl1* zeigte etwa die Signalstärke von Wildtypkreuzungen, wo hingegen *ssp1*-spezifische mRNA nicht messbar war. Die Transkriptmengen für *bW* und *bE* schienen induziert. Jedoch waren sie gegenüber haploiden $\Delta rum1$ -Zellen unverändert und deshalb vermutlich wie bei $\Delta hda1$ -Stämmen auf die Anwesenheit haploider Zellen im Kreuzungsexperiment zurückzuführen (Abb. 11a).

Mit Ausnahme der konstitutiv exprimierten rDNA betraf *hda1* die Expression der untersuchten Gene. Es wurden deutliche Unterschiede beim Vergleich der *hda1*-abhängigen und *rum1*-abhängigen Genexpression festgestellt, die sich besonders bei der Kontrolle des *hda1*-abhängigen Gens *ssp1* ausprägten. Während der dikaryotischen Phase wirkte Hda1 vermutlich mit dualer Funktion einerseits als Transkriptionsrepressor (z.B. *hum2*), andererseits als formaler Aktivator der Transkription (z.B. *dik6*). Weil Hda1 (wie Rum1) die Expression der *b*-Gene betraf, war es unwahrscheinlich, dass *hda1* ein direktes Zielgen des bE/bW-Heterodimers darstellen könnte.

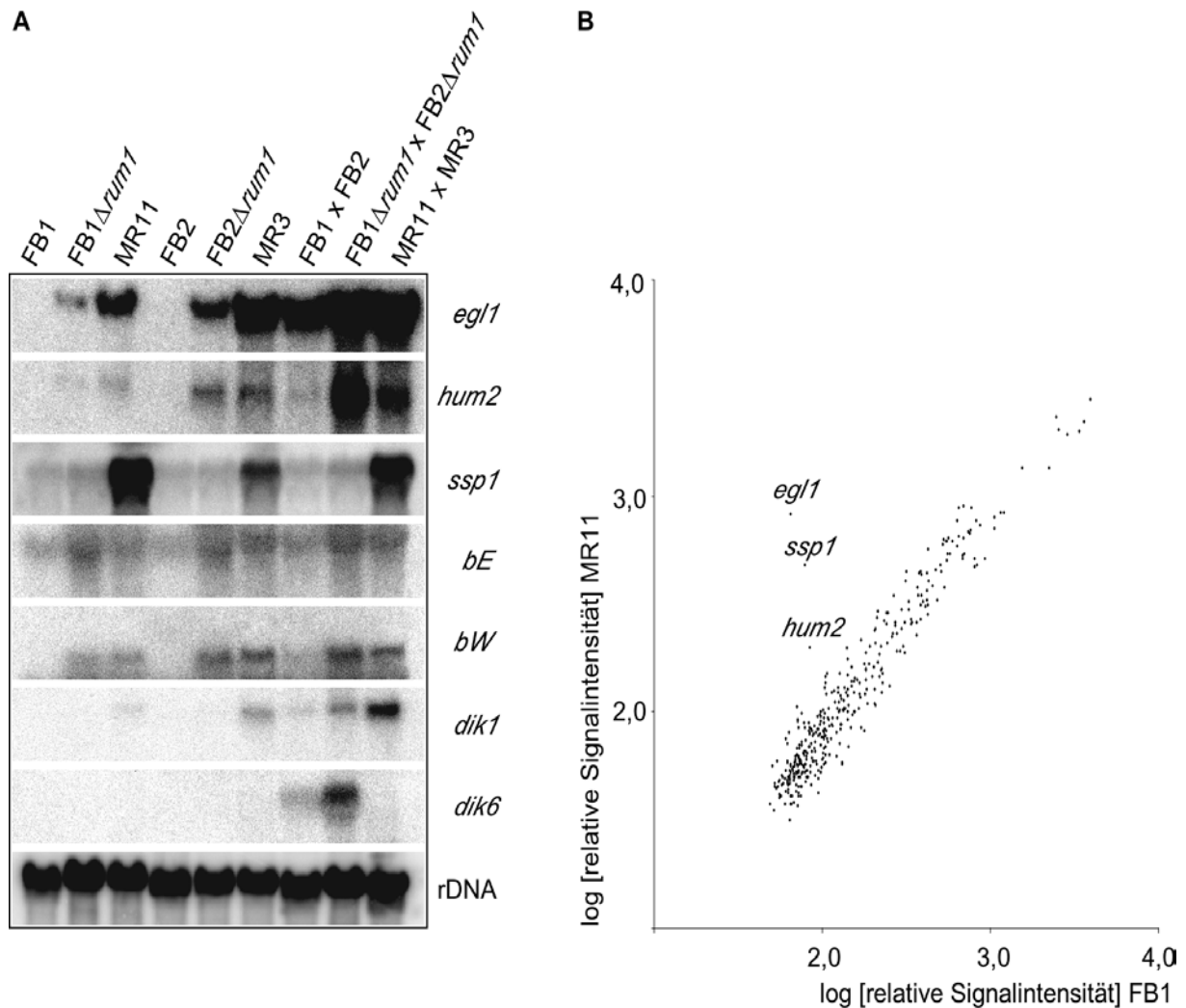


Abb. 11. Die *hda1*-abhängige Genexpression.

(a) In den $\Delta hda1$ -Stämmen MR11 und MR3 kam es zur Genexpression differenziell regulierter Gene. Die Transkripte von *egl1*, *hum2*, *bE*, *bW*, *dik1*, *dik6* und *ssp1* wurden in haploiden Zellen und in Kreuzungsprodukten nachgewiesen. Zum Abgleich der aufgetragenen RNA wurde der Filter mit einer rDNA spezifischen Probe hybridisiert (4.8.2.5). Neben den $\Delta hda1$ -Stämmen wurden die $\Delta rum1$ -Stämme FB1 $\Delta rum1$ und FB2 $\Delta rum1$, sowie die Wildtypstämme FB1 und FB2 untersucht.

(b) Gezeigt ist ein Vergleich der Genexpression von 274 Genen von haploiden Wildtypzellen (FB1) und haploiden $\Delta hda1$ -Zellen (MR11). Die Logarithmen der gemessenen, relativen Signalintensitäten wurden gegeneinander aufgetragen. Transkripte der *hda1*-abhängigen Gene *egl1*, *hum2* und *ssp1* waren im $\Delta hda1$ -Stamm MR11 mindestens 3-fach gegenüber der Wildtypkontrolle induziert. Die Expression der *hda1*-abhängigen Gene *dik1*, *bE* und *bW* lag unterhalb der Nachweisgrenze des Systems (4.8.2.4).

Um zu klären, ob *hda1* in haploiden Zellen generell die Genexpression betrifft, wurde eine DNA-Array Analyse durchgeführt. Mit dieser Methode war es möglich, zugleich eine Vielzahl von Genen in einer Expressionsanalyse zu untersuchen. Der Array bestand aus 274 DNA-Fragmenten, die jeweils in Dupletts auf Nitrozellulosemembranen aufgetragen wurden und distinkten Genen entsprechen (J. Kämper, pers. Mitteilung). Im Filterbereich A1 bis L24

befanden sich 180 cDNA-Sequenzen, die zufällig exprimierte, unbekannte Gensequenzen (EST) der Stämme FB1 (*a1 b1*) und HA103 (*a1 b1 P_{hsp70}bW2 P_{tef1}bE1*) repräsentierten (A. Brachmann, pers. Mitteilung). Weitere 94 cDNA-Fragmente bekannter Gene wurden im Filterbereich M1 bis P24 plaziert (4.8.2.4).

Jeweils zwei identische "Array"-Membranen wurden in einem Parallelexperiment mit ³²P-markierter cDNA des Δ *hda1*-Stammes MR11 Stämme hybridisiert (4.8.4). Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese diente mRNA, die von MR11 nach 48 Stunden Wachstum auf PD-CC isoliert wurde (4.8.1.4). Die radioaktive Markierung der cDNA wurde während der Synthese des sekundären Stranges bei Verwendung von Oktamerprimern mit zufälliger Basenabfolge durchgeführt (4.8.2.6) und stellt im Gegensatz zur direkten Markierung des primären cDNA Stranges eine gleichmäßige Markierung sicher (nicht gezeigt). Zu erwarten war, dass die in ³²P-cDNA übersetzten Transkripte entsprechend ihrer jeweiligen Expressionsstärke ein Signal am jeweiligen Filterbereich ergaben. Um das ermittelte *hda1*-abhängige Expressionsprofil mit dem Wildtyp vergleichen zu können, wurde das entsprechende Experimente mit FB1 durchgeführt.

Nach Exposition wurden die Hybridisierungssignale quantifiziert (4.8.2.4). Die Logarithmen der Werte der relativen Signalstärken wurden gegeneinander aufgetragen (Abb. 11b).

Es zeigte sich in Übereinstimmung mit Northern-Daten (s.o.), dass im Vergleich zum Wildtyp die *egl1*, *ssp1* und *hum2*-Transkripte im haploiden Δ *hda1*-Stamm MR11 ein erhöhtes Expressionslevel aufwiesen (Abb. 11b). Bei *egl1* konnte eine starke Anreicherung der Transkripte festgestellt werden (31,3-fach, Tab. 6). Das *ssp1*-Transkript ist ebenfalls deutlich nachweisbar (13,8-fach, Tab. 6). Die Expression von *hum2* ist dagegen weniger stark betroffen (4,6-fach, Tab. 6). Die schwache Expression der *hda1*-abhängigen Gene *bE*, *bW* und *dik1* lag in diesem Experiment unterhalb der Nachweisgrenze (Tab. 6).

Tab. 6. Übersicht der *hda1*-abhängigen Gene.

Position [§]	Induktion	Faktor [§]	Gen	Funktion [¶]	Expression [¶]
N7	++++	31,3	<i>egl1</i>	Endoglukanase	Filament
N6/N11	+++	13,8	<i>ssp1</i>		Spore
N2	++	4,6	<i>hum2</i>	[Hydrophobin]	Filament
M23	+	-	<i>dik1</i>		Filament
M22	+	-	<i>bE1</i>	Transkriptionsfaktor	Filament
M21	+	-	<i>bW1</i>	Transkriptionsfaktor	Filament

[§]Angabe der Position(en) auf dem "Array"-Filter (Quadbeck-Seeger et al., 2000). [§] Werte geben das Verhältnis der relativen Transkriptmengen von MR11 zu FB1 an und zeigen die Induktion (+ - +++) der entsprechenden Transkripte in haploiden MR11-Zellen gegenüber Wildtyp FB1-Zellen. Die Signifikanz wurde auf der 1,0% Wahrscheinlichkeitsebene im t-Test nach Student bestimmt. mRNA der Gene *dik1*, *bE1* und *bW1* waren in Northern-Experimenten (Abb. 11a) schwach detektierbar. Ein signifikanter Induktionsfaktor konnte nicht bestimmt werden (-). [¶]Die [vermutete] Funktion der *hda1*-abhängigen Gene ist angegeben. [¶]Die stadienspezifische Expression der entsprechenden Gene ist angegeben.

Die Expressionsanalysen zeigten deutlich, dass Hda1 keinen generellen Regulator der Transkription darstellte. Hda1 reguliert möglicherweise ein spezifisches Geneset *hda1*-abhängiger Gene, das sich bei einigen Genen wie *egl1*, *hum2* und den *b*-Genen mit *rum1*-abhängigen Genen überlappt.

2.2.2.3. Die Kontrolle der Transkription von *hda1*

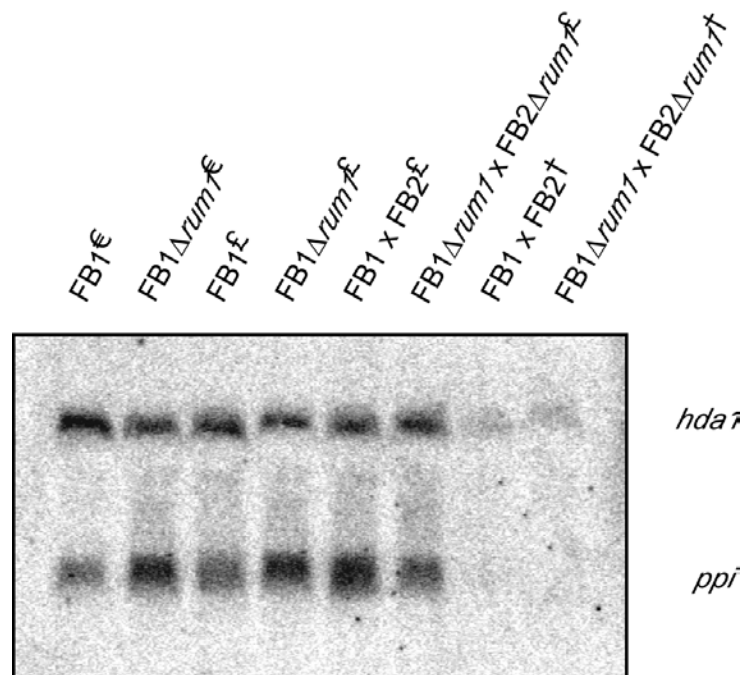
Hda1 kontrollierte die Genexpression in haploiden und filamentösen Zellen (2.2.2.2). Unklar war, wie die Aktivität von Hda1 reguliert werden konnte. Möglicherweise unterlag *hda1* seinerseits einer transkriptionellen Kontrolle. Da *rum1* ebenfalls die Expression einiger *hda1*-abhängiger Gene betraf, war eine Beteiligung von *rum1* an einer transkriptionellen Kontrolle von *hda1* nicht auszuschließen.

In Northern-Analysen wurde die Expression von *hda1* in haploiden und filamentösen Zellen und im Tumorgewebe von Wildtypstämmen und $\Delta rum1$ -Stämmen analysiert. FB1 und FB1 $\Delta rum1$ wurden einzeln und in kompatibler Kombination entsprechend mit FB2 und FB2 $\Delta rum1$ 48 Stunden auf PD-CC inkubiert. RNA wurde wie beschrieben isoliert (4.8.1.4). Die RNA-Isolation aus Tumormaterial von FB1 und FB2, und FB1 $\Delta rum1$ und FB2 $\Delta rum1$ erfolgte wie beschrieben (4.8.1.5). Die isolierte RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einem Filter immobilisiert. Der Nachweis der Expression von *hda1* erfolgte mit einer genspezifischen Sonde (4.8.2.3. und 4.8.2.5). Zum Abgleich der aufgetragenen RNA wurde der Filter mit einer Probe des konstitutiv exprimierten Gens *ppi* hybridisiert (4.8.2.5).

In allen untersuchten Stadien des Wildtyps und der $\Delta rum1$ -Stämmen war das *hda1*-Transkript nachweisbar (Abb. 12). Ein Abgleich der *hda1*-Signale mit den jeweiligen Transkripten des konstitutiv exprimierten Gens *ppi* ließ darauf schließen, dass *hda1* in haploiden und filamentösen Zellen konstitutiv exprimiert wurde und nicht einer Kontrolle durch *rum1* unterlag. Im Tumorgewebe von Wildtypstämmen und $\Delta rum1$ -Stämmen war das *hda1* Transkript nachweisbar. *ppi* lag unterhalb der Nachweisgrenze. Da gleiche RNA-Mengen eingesetzt wurden und die *hda1*-Signale bei Wildtypstämmen und $\Delta rum1$ -Stämmen vergleichbare Intensitäten aufwiesen, schien es wahrscheinlich, dass auch im Tumorgewebe *hda1* unabhängig von *rum1* transkribiert wurde.

Abb. 12. Die Expression von *hda1* (nächste Seite).

Jeweils 30 μ g RNA wurden in die Northern-Analyse eingesetzt. Der Nachweis von *hda1* erfolgte mit einer genspezifischen Sonde (4.8.2.5). Die Hybridisierung mit einer *ppi*-spezifischen Sonde (4.8.2.5) zeigte, dass vergleichbare RNA-Mengen aufgetragen wurden. Die Isolation der RNA erfolgte aus exponentiell wachsenden Kulturen der Stämme FB1 und FB1 $\Delta rum1$ (€), aus den Stämme FB1 und FB1 $\Delta rum1$, sowie deren Kreuzungsprodukte mit FB2 und FB2 $\Delta rum1$, nach 48 Stunden Wachstum auf Aktivkohleplatten (£) und aus Tumorgewebe von Wildtypstämmen und $\Delta rum1$ -Stämmen (†).



2.2.2.4. Die pathogene Entwicklung von $\Delta hda1$ -Stämmen

Mit einer Mischung der kompatiblen $\Delta hda1$ -Stämme MR11 und MR3 kam es vergleichbar zu Wildtypstämmen nach Infektion von Maispflanzen zur Entwicklung typischer früher Symptome wie der Anthocyanverfärbungen von Blättern (4.7.8). Die Infektionsrate von 71 % (15 von 21 infizierten Pflanzen zeigten Tumore) war dabei vergleichbar zu Infektionsexperimenten mit einer Wildtypkreuzung von FB1 und FB2, die bei 7 von 9 infizierten Pflanzen Tumorbildung hervorriefen (78 %). Dabei erfolgte die Ausbildung von Symptomen ohne erkennbare Verzögerung. Jedoch konnte die Entwicklung von schwarzem Tumorgewebe nicht beobachtet werden (Abb. 13). Dies wurde als einen Hinweis gewertet, dass die Produktion von schwarzen Teliosporen betroffen sein könnte. Dieses Phänomen wurde ebenso bei Infektionen mit kompatiblen $\Delta rum1$ -Stämmen deutlich (Quadbeck-Seeger et al., 2000; Abb. 13). Um den beobachteten Entwicklungsdefekt von $\Delta hda1$ -Zellen einzuordnen, wurden Infektionen mit Wildtypstämmen, $\Delta hda1$ -Stämmen und $\Delta rum1$ -Stämmen in Parallelexperimenten durchgeführt. Da die Reifung von Teliosporen erst nach eine Reihe von morphologischen Entwicklungen abgeschlossen wird (Snetselaar and Mims, 1994; Banuett and Herskowitz, 1996; Quadbeck-Seeger et al., 2000), wurde die Zellmorphologie der untersuchten Stämme in frühen Tumorstrukturen nach 10 Tagen und in voll ausgebildeten Tumoren 16 und 23 Tage nach Infektion lichtmikroskopisch dokumentiert (4.11).

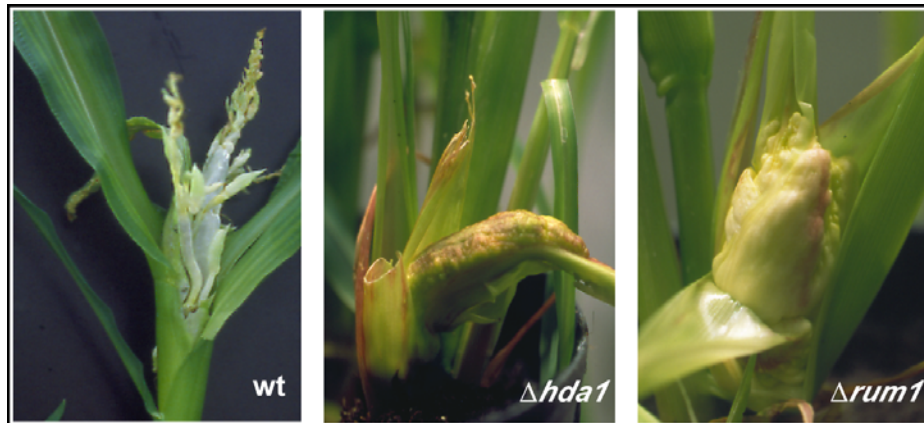


Abb. 13. Die $\Delta hda1$ -Stämme MR11 und MR3 führten zur Tumorbildung in Maispflanzen.

Gezeigt ist die Tumorformation auf Maispflanzen ausgelöst durch Infektion mit Wildtypstämmen FB1 und FB2 (wt), $\Delta hda1$ -Stämmen MR11 und MR3 ($\Delta hda1$) und $\Delta rum1$ -Stämmen FB1 $\Delta rum1$ und FB2 $\Delta rum1$ ($\Delta rum1$) 10 Tage nach Inokulation und Wachstum unter Gewächshausbedingungen.

Bereits 10 Tage nach Infektion waren in den untersuchten Tumorpräparaten des Wildtyps, der $\Delta hda1$ -Stämme und der $\Delta rum1$ -Stämme pilzliche Filamente nachweisbar (Abb. 13 und 14). Nach 16 Tagen kam es im untersuchten Tumorgewebe zur Differenzierung und Proliferation von wurmartigen Wildtypzellen. Die reichlich verzweigten Hyphen führten zu einer massiven Akkumulation des Pilzes. Nach 23 Tagen Wachstum begannen die Hyphen des Wildtyps zu fragmentieren und vollzogen eine morphologischen Wechsel, der zur typischen Abrundung der Zellen und letztendlich zur Ablagerung ornamentartiger Strukturen auf deren Oberfläche führte. Es bildeten sich reife Sporen (Abb. 14). In Tumorquerschnitten von $\Delta rum1$ -Stämmen waren erst zu diesem Zeitpunkt wurmartige Zellen zu erkennen, die sich ebenfalls stark vermehrten, wenn auch im Vergleich zum Wildtyp verzögert. Abgerundete Zellen oder reife Teliosporen konnten jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 14). Im Tumorgewebe der $\Delta hda1$ -Stämme vollzogen auch nach 23 Tagen die infektiösen, filamentösen Zellen keine morphologischen Änderungen. Weder das wurmartige Stadium der Zellen, das mit einer starken Vermehrung des Pilzes einherging, noch reife Sporen konnten im Tumorgewebe von $\Delta hda1$ -Stämmen nachgewiesen werden (Abb. 14). Vermutlich ist in $\Delta hda1$ -Zellen ein spezifischer Entwicklungsschritt blockiert, der normalerweise den Wechsel der filamentösen Zellmorphologie hin zu stark verzweigten, wurmartigen Zellen bestimmte.

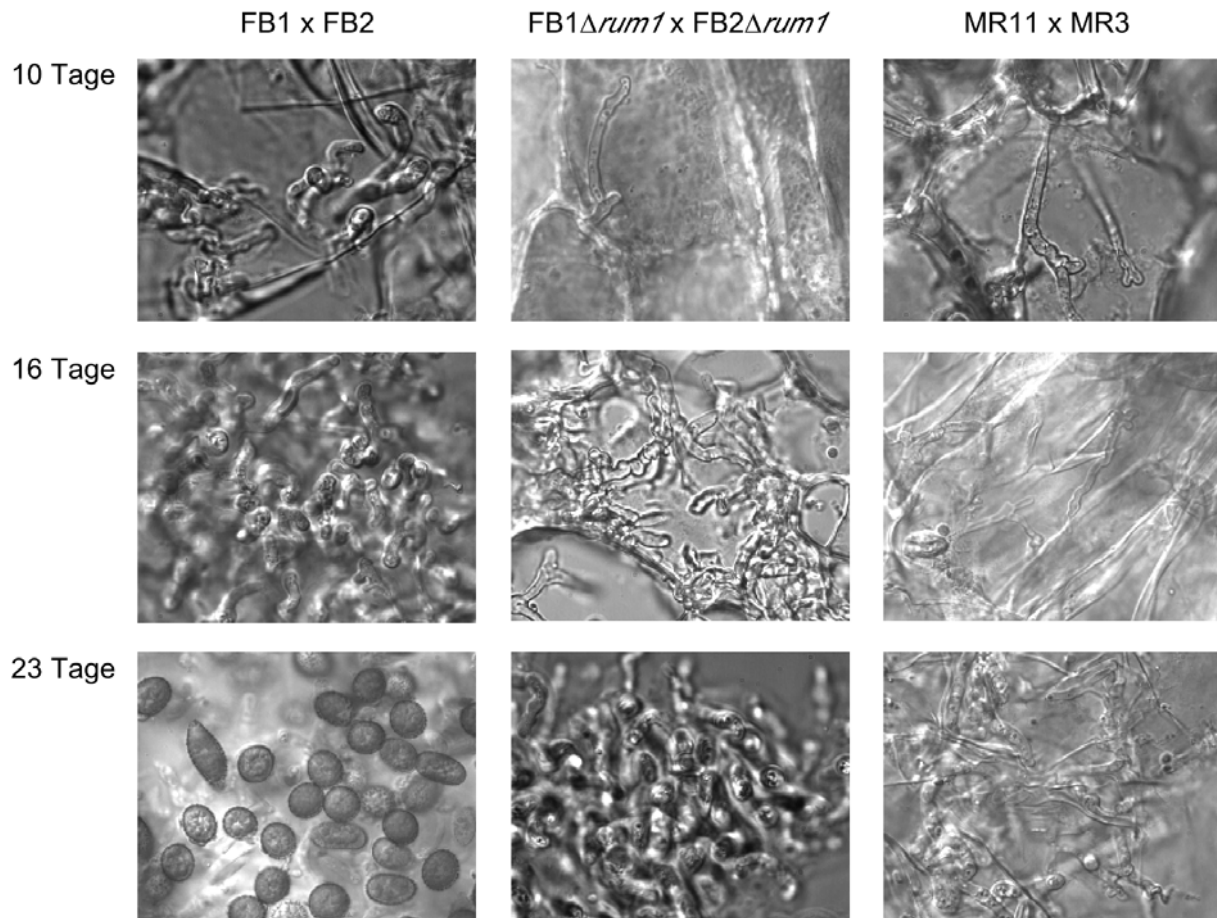


Abb. 14. Der Verlauf der Tumorentwicklung bei Wildtypstämmen, $\Delta rum1$ -Stämmen und $\Delta hda1$ -Stämmen.

Tumorquerschnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht (4.11). Dargestellt sind Photographien repräsentativer Entwicklungsstadien zu den angegebenen Zeitpunkten. Bereits 10 Tage nach Inokulation wurden in den untersuchten Tumoren Filamente detektiert. 16 Tage nach Inokulation war das charakteristische, wurmartige Proliferationsstadium des Wildtypinokulats in Tumorquerschnitten nachzuweisen. $\Delta hda1$ -Stämme und $\Delta rum1$ -Stämme wuchsen zu diesem Zeitpunkt filamentös. 23 Tage nach Inokulation bildeten sich im Tumorgewebe der Wildtypstämmen Sporen aus. In Tumoren von $\Delta rum1$ -Stämmen wurde nach 23 Tagen eine massive Proliferation des Pilzes beobachtet. Das wurmartige Stadium wurde erreicht. $\Delta hda1$ -Stämme konnten das wurmartige Proliferationsstadium auch nach 23 Tagen nicht ausbilden und entwickelten sich weiter filamentös. $\Delta hda1$ -Stämme und $\Delta rum1$ -Stämme führten nicht zur Bildung reifer Sporen, während im Wildtyp die Produktion von Sporen die pathogene Entwicklung von *U.maydis* abschloss.

Einen weiteren Hinweis, dass in Tumoren von $\Delta hda1$ -Stämmen keine Sporen gebildet wurden, ergab die Sporenanalyse von Gallen, die $\Delta hda1$ -Zellen enthielten (4.7.9). Dabei wurde die Verträglichkeit reifer Teliosporen gegenüber chemischer Behandlung mit CuSO_4 und Trockenheit ausgenutzt. Um alle lebensfähigen Zellen abzutöten, die nicht die Sporenentwicklung abschlossen, wurde 4 Wochen altes Tumormaterial mit CuSO_4 -Lösung behandelt und anschließend bei 28°C getrocknet. Nur reife Teliosporen überstanden diese Behandlung. Zur Untersuchung der Keimungsfähigkeit der Sporen wurde 100 mg Tumormaterial in Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde auf PD-Medium übertragen

und drei Tage bei 28°C inkubiert. Die Bildung von Kolonien zeigte die Präsenz von keimungsfähigen Sporen im untersuchten Tumormaterial an.

Aus Tumorgewebe der $\Delta hda1$ -Stämme ließen sich bei der Analyse der Sporen keine *U.maydis* Sporidien regenerieren. Dieses Ergebnis stand in völliger Übereinstimmung mit den oben gezeigten lichtmikroskopischen Daten, die eine dramatisch verzögerte Ausbildung von Sporen im Tumorgewebe von $\Delta hda1$ -Stämmen dokumentierten. Erwartungsgemäß wurden auch im untersuchten Tumormaterial von $\Delta rum1$ -Stämmen keine keimungsfähigen Dauerformen nachgewiesen. Dagegen enthielt Tumorgewebe der Wildtypstämme reife Teliosporen, die zur Keimung und Bildung von Kolonien in der Lage waren (Tab. 7).

Diese Ergebnisse zeigten, dass $\Delta hda1$ -Stämme zur Ausbildung von Tumoren nach Infektion von Maispflanzen in der Lage waren. Während es in Wildtypzellen zur Reifung von intakten Sporen kam und $\Delta rum1$ -Zellen das wurmartige Stadium im Tumorgewebe erreichten, führte die Entwicklung von $\Delta hda1$ -Zellen zur Bildung filamentöser Zellen, die die folgende Entwicklung nicht vollzogen. Die Bildung der Teliosporen war dramatisch verzögert. Es wurde vermutet, dass *hda1* an "frühen" Prozessen der Entwicklung von Sporen beteiligt ist.

Tab. 7. Die pathogene Entwicklung der $\Delta hda1$ und $\Delta rum1$ -Stämme.

	Tumorentwicklung [Tumore/Pflanzen]	Entwicklungsstadium im Tumor nach 23 Tagen	Anzahl der Kolonien nach Sporenanalyse
MR11 x MR3	15/21	Filamente	0
FB1 $\Delta rum1$ x FB2 $\Delta rum1$	7/8	wurmartige Zellen	0
FB1 x FB2	7/9	Teliosporen	>1000

Die Tumorentwicklung der $\Delta hda1$ -Stämme MR11 und MR3, und der Stämme FB1 $\Delta rum1$, FB2 $\Delta rum1$, FB1 und FB2 wurde 16 Tagen nach Inokulation von Mais bestimmt. Angegeben ist die Anzahl der gebildeten Tumore und der inokulierten Maispflanzen. Die Entwicklungsstadien von *U.maydis* im Tumorgewebe wurden lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 14). Zur Sporenanalyse wurde Tumormaterial 4 Wochen nach Inokulation entnommen und bei 28°C getrocknet. Das Wachstum von Sporidien zeigte die Bildung von reifen Teliosporen im Tumorgewebe an.

2.3. Die Kontrolle des *hda1*-abhängigen Gens *egl1* durch Modifikation von Chromatin

2.3.1. Die Zugänglichkeit von Chromatin der regulatorischen Region des *hda1*-abhängigen Gens *egl1*

Auf Grund der signifikanten Ähnlichkeit von Hda1 zu anderen Proteinen mit HDAC-Aktivität, lag die Vermutung nahe, dass Hda1 an Prozessen der Hypoacetylierung von Histonproteinen beteiligt sein könnte. Hda1 könnte über seine postulierte Deacetylierungsaktivität die Chromatinstruktur in regulatorischen Regionen *hda1*-abhängiger Gene betreffen und so die Genexpression von *egl1* steuern. Ein Vergleich der Zugänglichkeit von Chromatin der regulatorischen Region von *egl1* wurde im Wildtypstamm FB1 und im $\Delta hda1$ -Stamm MR11 durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss aktiver Transkription von *egl1* auf die Ausbildung der Chromatinstruktur im 5'-Bereich von *egl1* zu überprüfen, wurde zudem die Zugänglichkeit von Chromatin im $\Delta rum1$ -Stamm FB1 $\Delta rum1$ bestimmt.

Die Behandlung von Protoplastensuspensionen mit der vorwiegend sequenzunspezifisch wirkenden Endonuklease MNaseI (4.12) ist eine verlässliche Methode zur Analyse der Chromatinstruktur (Zaret, 1999). MNaseI durchdrang die Zellmembranen der Protoplasten und griff das Chromatin in intakten Zellkernen an. Bei kurzer Einwirkzeit waren internukleosomale DNA-Abschnitte für MNaseI zugänglich, so dass nach DNA-Isolation und gelelektrophoretischer Auftrennung das für *U.maydis* typische, mononukleosomale DNA-Fragment und dessen Multimere ("Nukleosomenleiter") detektiert werden konnte. Ein nukleosomales DNA-Fragment zeigte die durchschnittliche Länge der um ein Histonoktamer gewundenen DNA, die Nukleosomenleiter die Qualität der partiellen MNaseI-Restriktion von Chromatin. Die Länge des nukleosomalen Fragments betrug bei den untersuchten Stämmen übereinstimmend etwa 175 bp (Abb. 15b).

Um das 3'-Ende der erzeugten MNaseI-Fragmente zu definieren, wurden die Ansätze anschließend mit dem Restriktionsenzym *SphI* behandelt (4.12). Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragenen. Die Filter wurden mit einem ³²P-markiertem *egl1*-Fragment hybridisiert (4.8.2.5). Die Sonde entsprach den ersten 253 bp des offenen Leserahmens von *egl1* und zugleich dem 3'-Ende der erzeugten MNaseI/*SphI*-Fragmente der Sequenzen stromaufwärts von *egl1* (4.8.2.5). In Anlehnung an bestehende Protokolle (Zaret, 1999) wurde auf diese Weise die spezifische Markierung (=Hybridisierung) der stromaufwärts von *egl1* liegenden MNaseI-Fragmente erreicht (Abb. 15d).

Mit gereinigter DNA des Wildtyps und des $\Delta hda1$ -Stammes als Substrat, zeigte MNaseI konzentrationsabhängig eine partielle Restriktion der DNA ohne eine "Nukleosomenleiter" auszubilden (Abb. 15a). Nach Hybridisierung mit der *egl1*-spezifischen Probe ergab sich, ebenfalls unabhängig vom untersuchten Stamm, eine charakteristische, reproduzierbare Verteilung der MNaseI-Fragmente im 5'-Bereich von *egl1* (Abb. 15a). Das ermittelte

Fragmentmuster wurde als Referenz für "nackte", nicht mit Proteinen besetzte DNA angesehen.

Der Vergleich der MNaseI-Fragmente aus der regulatorischen Region von *egl1*, die ausgehend von "nackter" DNA und Chromatin des $\Delta hda1$ -Stammes MR11 erzeugt wurden, zeigte bis 400 bp und bei Fragmenten, die größer als 1,0 kb waren, deutliche Unterschiede (Abb. 15c, d). Die veränderte Zugänglichkeit der DNA für MNaseI bei Chromatin als Substrat wurde durch einen mögliche Besatz mit Histonproteinen und Aufbau einer übergeordneten Chromatinstruktur erklärt. Es wurden aber auch deutliche Übereinstimmungen erkannt. Vergleichbar zur Referenz von "nackter" DNA wurde ein Triplet von MNaseI-Fragmenten im Bereich von 800 bp bis 1,0 kb nachgewiesen. Beim Wildtyp dagegen wurde eine singuläre, hypersensitive 1,0 kb Bande detektiert. Bei MR11 trat zudem eine prominente, etwa im Bereich von 400 bp liegende Doppelbande auf, die ebenfalls im MNaseI-Experiment mit gereinigter, genomischer DNA beobachtet wurde (Abb. 15c, d). Chromatin des Wildtypstammes zeigte in diesem Größenbereich ein anderes Protektionsmuster, gekennzeichnet durch ein spezifisches Bandentriplett im Bereich von 400 bp bis 750 bp (Abb. 15d). Überraschenderweise war Chromatin der regulatorischen Region von *egl1* des $\Delta rum1$ -Stammes FB1 $\Delta rum1$ ebenso zugänglich, wie es für den $\Delta hda1$ -Stamm MR11 ermittelt wurde (Abb. 15d).

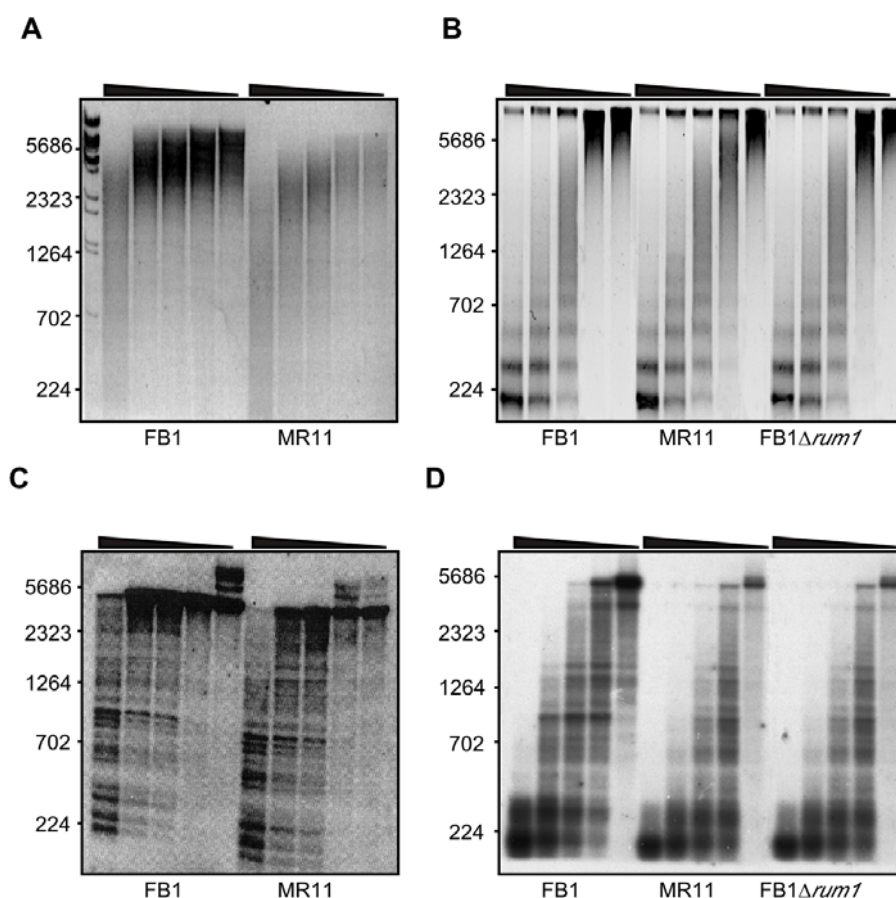


Abb. 15. Die Analyse der Chromatinstruktur der regulatorischen *egl1*-Region (vorherige Seite).

- (a) Die Behandlung von gereinigter, genomischer DNA der Stämme FB1 und MR11 mit unterschiedlichen Mengen der Endonuklease MNaseI führte konzentrationsabhängig zur Spaltung.
- (b) Die Behandlung von Chromatin der Stämme FB1, MR11 und FB1 $\Delta rum1$ mit MNaseI zeigte nach Aufreinigung der DNA und Auftrennung auf einem 1,1 %-igem Agarosegel ein "leiterartiges" Bandenmuster, die sog. "Nukleosomenleiter".
- (c) MNaseI-Fragmente aus (a) wurden mit dem Restriktionsenzym *SphI* gespalten und auf einer Membran fixiert. Unter Anwendung des indirekten Endmarkierungsverfahren nach Wu (1980) konnte ein MNaseI-Fragmentmuster aus der regulatorischen Region von *egl1* ermittelt werden, das als Referenz für "nackte" DNA diente.
- (d) Nukleosomale MNaseI-Fragmente aus (c) wurden mit dem Restriktionsenzym *SphI* gespalten und auf einen Filter übertragen. Nach indirekter Endmarkierung *egl1*-spezifischer DNA wurde ein Fragmentmuster ermittelt, das der Zugänglichkeit der regulatorischen *egl1*-Region im Chromatin für MNaseI entsprach. Näheres ist dem Text zu entnehmen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Genexpression von *egl1* in einem $\Delta hda1$ -Stamm und in einem $\Delta rum1$ -Stamm möglicherweise mit einer Öffnung der Chromatinstruktur korrelierte.

2.3.2. Die Acetylierung von Histon H3 in der regulatorischen Region des *hda1*-abhängigen Gens *egl1*

Besonders nahe lag, dass die Histondeacetylase Hda1 in Wildtypzellen die übergeordnete Chromatinstruktur der 5'-Region von *egl1* über die Deacetylierung der Histonproteine vermittelte. Man erwartete deshalb, dass in Zellen des $\Delta hda1$ -Stammes MR11 regulatorische *egl1*-Sequenzen in hyperacetylierten Chromatinkomplexen vorliegen könnten. Als Referenz wurden FB1 Wildtypzellen, die keine Endoglykanase exprimierten, und Zellen des $\Delta rum1$ -Stammes FB1 $\Delta rum1$ untersucht. In FB1 $\Delta rum1$ kam es vergleichbar zu $\Delta hda1$ -Zellen zur Expression von *egl1*. Es sollte geklärt werden, ob die Existenz möglicher, acetylierter Chromatinkomplexe im regulatorischen Bereich von *egl1* eine spezifische Folge der Deletion von *hda1* war.

Die Zellen der Stämme FB1, MR11 und FB1 $\Delta rum1$ wurden mit Formaldehyd behandelt, um eine Fixierung der Chromatinstruktur zu erreichen (4.13.5). Wichtige Parameter für die Vernetzung waren die Formaldehydkonzentration und die Einwirkzeit. Es wurden die Bedingungen aus den Protokollen für *S.cerevisiae* übernommen (Hecht et al., 1996; Strahl-Bolsinger et al., 1997). Die vernetzten Zellen wurden in einer hydraulischen "French Press" aufgeschlossen. Im Zellextrakt lag eine durchschnittlich Größe der DNA-Fragmente von 400 bp vor. Nach Zugabe eines Antikörpers, der spezifisch den di-acetylierten N-Terminus von Histon H3 erkannte (Braunstein et al., 1993), wurden im Immunpräzipitat hyperacetylierte Chromatinkomplexe angereichert. Um unspezifisch gebundene Moleküle zu entfernen, wurde das Immunpräzipitat mehrfach gewaschen. Zur Reversion der Formaldehyd-Vernetzung wurde der jeweilige Ansatz bei 65°C inkubiert. Die Proteinkomponenten wurden durch eine Proteinase-K Behandlung degradiert. Die copräzipitierte DNA wurde gereinigt, durch Fällung konzentriert und in einer PCR-Analyse untersucht (4.8.3.3). Dabei wurden mit den Primerkombinationen mic26/mic27 (relative Position zum *egl1*-Startkodon: -681 bp bis -417 bp) und mic28/mic29 (relative Position zum *egl1*-Startkodon: -311 bp bis -77 bp) jeweils ein

264 bp Fragment bzw. ein 234 bp Fragment aus der 5'-Region von *egl1* amplifiziert. Als interne Kontrolle wurde mit den Primerkombinationen mic19/mic21 ein 173 bp Fragment aus *hda1* und mit mic22/mic23 ein 208 bp Fragment aus *rum1* amplifiziert (Abb. 16). Da es als unwahrscheinlich gelten konnte, dass in einem $\Delta hda1$ -Stamm der Acetylierungsstatus des offenen Leserahmens (ORF) von *rum1* und in einem $\Delta rum1$ -Stamm der Acetylierungsstatus des ORFs von *hda1* betroffen war, erlaubten diese Reaktionen die Abschätzung der Menge unspezifisch präzipitierter DNA. Die *egl1*-spezifische PCR und die jeweilige Kontroll-PCR wurden in einem Ansatz durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Mengen coimmunpräzipitierter DNA als Matrize eingesetzt. Jeweils 20 μ l des PCR-Ansatzes wurde auf einem 2,0%-igem Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt (4.8.3.3).

Mit DNA aus dem Immunpräzipitat des Wildtypstammes als Matrize gelang die PCR mit Oligonukleotiden, die ein 173 bp *hda1*-spezifisches und ein 208 bp *rum1*-spezifisches Kontrollamplikon produzierten. Die Bandenintensitäten waren dabei vergleichbar zu den entsprechenden Amplikons, die mit präzipitierter DNA aus dem $\Delta hda1$ -Stamm MR11 und dem $\Delta rum1$ -Stamm FB1 $\Delta rum1$ erzeugt wurden. Das zeigte, dass DNA mit den Immunkomplexen oder direkt mit dem Antikörper assoziierte. Ein Vergleich der Bandenstärken der amplifizierten *hda1*-Fragmente und *rum1*-Fragmente mit 1,0 μ l und 0,25 μ l präzipitierter DNA als Matrize zeigte, dass die beobachtete Bandenintensität der jeweiligen PCR-Amplifikate mit der Menge eingesetzten, präzipitierten DNA korrelierte. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass sich die Reaktionsbedingungen in einem linearen Bereich bewegten und die Amplikommengen, die in einer Reaktion erzeugt wurden, direkt miteinander vergleichbar waren (Abb. 16).

Immunpräzipitate der Stämme FB1, MR11 und FB1 $\Delta rum1$ führten in einer PCR zur Amplifikation eines 264 bp *egl1*-Fragments, das den 5'-Bereich von *egl1* repräsentierte. Der Vergleich der Bandenintensitäten mit den Kontrollamplikons aus *hda1* und *rum1* zeigte jedoch, dass ausgehend von Immunpräzipitaten der Stämme MR11 und FB1 $\Delta rum1$ *egl1*-Sequenzen angereichert werden konnten. Dagegen wurde ein 234 bp mic28/mic29-Amplikon, das weiter 3'-gelegenen *egl1*-Sequenzen entsprach, mit vergleichbarer Intensität im Immunpräzipitat aller untersuchten Stämme detektiert (Abb. 16).

Diese Ergebnisse zeigten, dass in Immunpräzipitaten des Antikörpers Anti-AcH3 (4.6), der di-acetylierte N-Termini von H3 Histonproteinen erkannte, regulatorische *egl1*-Sequenzen vorlagen. Offenbar waren in acetylierten Chromatin-Immunkomplexen von $\Delta hda1$ -Zellen *egl1*-Sequenzen signifikant angereichert gegenüber Wildtypzellen. Überraschenderweise galt das auch für $\Delta rum1$ -Zellen. Es wurde deshalb vermutet, dass sich bei aktiver Transkription von *egl1* hyperacetylierte Chromatinkomplexe an regulatorischen *egl1*-Sequenzen ausbilden könnten. Hda1 könnte dem zu Folge ein Protein mit HDAC-Aktivität, Rum1 eine mögliche Komponente eines Proteinkomplexes mit HDAC-Aktivität darstellen.

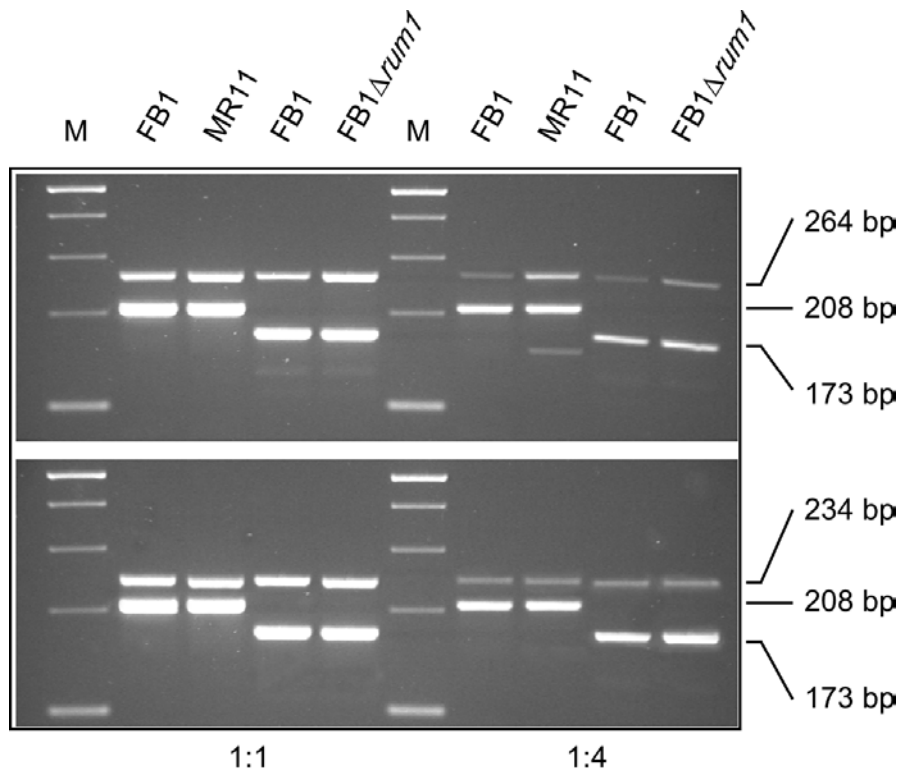


Abb. 16. PCR-Analyse hyperacetylierter Chromatinkomplexe der Stämme FB1, MR11 und FB1 Δ *rum1*.

Vernetzte Proteinextrakt der Stämme FB1, MR11 und FB1 Δ *rum1* wurden in eine Chromatinimmunpräzipitations-(ChIP)-Reaktion eingesetzt (4.13.5). Dabei wurden hyperacetylierte Chromatinkomplexe isoliert. Aus den Chromatinkomplexen gereinigte, coimmunpräzipitierte DNA wurde zur Amplifikation von *egl1*-spezifischen, *hda1*-spezifischen und *rum1*-spezifischen Amplikons in eine PCR eingesetzt (4.8.3.3). Zur Überprüfung, ob die PCR in einem linearen Bereich durchgeführt wurde, wurden Parallelreaktionen mit 1,0 μ l (1:1) und 0,25 μ l (1:4) der coimmunpräzipitierten DNA durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2,0%-igem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und anschließend gefärbt. Das 264 bp lange *egl1*-Amplikon und das 234 bp lange *egl1*-Amplikon der Primerkombinationen mic28/29 entsprach jeweils Fragmenten aus der 5'-regulatorischen Region von *egl1*. Die Kontrollamplikons der Primerkombinationen mic19/21 (173 bp) und mic22/23 (208 bp) entsprachen einem *hda1*-Fragment bzw. einem *rum1*-Fragment und galten als Maß für unspezifisch gebundene DNA der Chromatinkomplexe. Die Fragmentgrößen wurden mit einem kommerziell erhältlichem Größenmarker (M, PeqLab) im Bereich von 100 bp (unten) bis 500 bp (oben) verglichen.

2.4. Untersuchungen zur möglichen Interaktion von Hda1 mit Rum1

2.4.1. Hda1 und Rum1 im Zwei-Hybrid System

Die Gemeinsamkeiten von Hda1 und Rum1 bei der Genregulation *hda1*-abhängiger Gene könnte auf eine physikalische Interaktion von Hda1 und Rum1, und Bildung eines regulatorischen Komplexes mit HDAC-Aktivität deuten.

Die mögliche, direkte Wechselwirkung beider Proteine wurde in einem Zwei-Hybrid System von *S.cerevisiae* untersucht (Golemnis et al., 1999). Es wurden Fusionen der *lexA* DNA-Bindedomäne (DB) und VP16 Aktivierungsdomäne (AD) mit Hda1 und Rum1 hergestellt (4.4.6). Die entsprechenden Plasmidkonstrukte wurden mit pDB-Hda1, pAD-Hda1, pDB-Rum1 und pAD-Rum1 bezeichnet. DB-Fusionen konnten, ohne die β -Galaktosidase Aktivität zu betreffen, in Hefezellen eingebracht werden, die ein unter der Kontrolle von *lexA* Operatorsequenzen stehendes *lacZ*-Reportergen trugen (nicht gezeigt). Kommt es zu einem direkten physikalischen Kontakt zwischen DB-Fusionsproteinen und AD-Fusionsproteinen, wird die VP16 Aktivierungsdomäne über die Ausbildung eines Proteinkomplexes, der eine *lexA* DNA-Bindedomäne enthält, an *lexA* Sequenzen lokalisiert und so β -Galaktosidase Aktivität der Zellen ausgelöst.

Durch Cotransformation des Hefestammes EGY48 (4.3) wurden jeweils DB-Fusionen und AD-Fusionen kodierende Plasmide eingebracht (Tab. 8). Mit den im Zwei-Hybrid System eingesetzten Proteinfusionen wurde untersucht, ob Hda1 und Rum1 interagieren könnten, desweiteren, ob Hda1 oder Rum1 in *S.cerevisiae* möglicherweise multimerisieren. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität wurden jeweils fünf Transformanten herangezogen (4.7.5).

Im Kontrollexperiment zeigten die Transformanten, die pDB-E1₁₋₄₇₃ und pAD-W2₁₋₅₄₆ trugen (A. Jamnischek, pers. Mitteilung), β -Galaktosidase Aktivität ($136,2 \pm 45,3$; Miller-Einheiten \pm SD, Tab. 8). Transformanten, die die Kombination der Plasmide pLexA und pB42AD enthielten, führten nicht zur Umsetzung des Substrats und zeigten die Hintergrundaktivität des Zwei-Hybrid Systems. Bemerkenswert war, dass das DB-Rum1 Fusionsprotein kombiniert mit Rum1-AD zur Induktion von *lacZ* führte ($45,6 \pm 8,4$; Miller-Einheiten \pm SD, Tab. 8). Dieses Ergebnis wies auf eine mögliche Multimerisierung von Rum1-Proteinen in *S.cerevisiae* hin. Die Kombination von DB-Hda1 und Hda1-AD konnte hingegen keine β -Galaktosidase-Aktivität auslösen. Aber auch Stämme, die DB-Hda1 und AD-Rum1 oder DB-Rum1 und AD-Hda1 exprimierten, zeigten keine signifikante *lacZ*-Expression (Tab. 8).

Die Untersuchungen im Zwei-Hybrid System zeigten, dass Hda1 vermutlich keine Proteinkomplexe in *S.cerevisiae* ausbildete.

Tab. 8. Hda1 und Rum1 im Zwei-Hybrid System von *S.cerevisiae*.

Plasmide, die Hda1-Fusionen exprimieren		Plasmide, die Rum1-Fusionen exprimieren		β -Galaktosidase Aktivität
pDB-Hda1		—		2,0 \pm 1,5
pDB-Hda1		pAD-Rum1		1,1 \pm 0,6
pAD-Hda1		pDB-Rum1		3,2 \pm 1,2
—		pDB-Rum1		1,1 \pm 2,5
pDB-Hda1	pAD-Hda1	—		1,5 \pm 1,5
—		pDB-Rum1	pAD-Rum1	45,6 \pm 8,4
Kontrollkombinationen				
pDB-E1 ₁₋₄₇₃		pAD-W2 ₁₋₅₄₆		136,2 \pm 45,3
pLexA		pB42AD		2,6 \pm 1,3

β -Galaktosidase Aktivität wurde wie beschrieben bestimmt (4.7.5.2). Es sind die Mittelwerte der β -Galaktosidase Aktivität von jeweils 5 unabhängigen Stämmen in Miller-Einheiten \pm Standardabweichung angegeben.

2.4.2. Die Analyse der möglichen Interaktion von Hda1 und Rum1 durch Coimmunpräzipitation

Hda1 und Rum1 bildeten im Zwei-Hybrid Hefesystem keine Proteinkomplexe (2.4.1). Möglicherweise fehlten in *S.cerevisiae* wichtige Cofaktoren zur Formation des Hda1/Rum1-Komplexes. Die vermutete Interaktion von Hda1 und Rum1 wurde deshalb in einem Coimmunpräzipitations (CoIP)-Experiment in *U.maydis* untersucht. Um einen möglichst sensitiven Nachweis der mutmaßlich interagierenden Proteine führen zu können, wurden Stämme hergestellt, die die epitopmarkierten Proteinvarianten Hda1-Myc6° und Rum1-Flag4° exprimierten (4.3). Es handelte sich dabei um den Stamm MR59 (*a1 b1 hda1::P_{crgl}-bE1 pHda1 myc6°-cbx pRum1-flag4°*), der die Plasmide pHda1myc6°-cbx und pRum1-Flag4° trug, und die Kontrollstämme MR61 (*a1 b1 hda1::P_{crgl}-bE1 pHda1myc6°-cbx pRum1*) mit den Plasmiden pHda1myc6°-cbx und pRum1, und MR62 (*a1 b1 hda1::P_{crgl}-bE1 pHda1-cbx pRum1-flag4°*), der die Plasmide pHda1-cbx und pRum1-Flag4° enthielt (4.3 und 4.4.6). Für pHda1myc6°-cbx und pRum1-Flag4° wurde gezeigt, dass sie funktionelle Proteine kodierten (2.2.1.2 und 4.4.6). Die Stämme MR59, MR61 und MR62 wurden in PD kultiviert. Nach der Zellernte wurden die Pellets in einem physiologischen Puffer aufgenommen und in einer "French Press" aufgeschlossen. Jeweils 2,5 mg eines Gesamtproteinextrakts wurden mit 10 μ g eines monoklonalen, Myc6°-spezifischen Antikörpers (9E10, C. Koch. pers. Mitteilung), und in einem Parallelexperiment mit 10 μ g eines monoklonalen, Flag4°-spezifischen Antikörpers (M#2, Sigma) behandelt. Die Immunkomplexe wurden auf einer Protein A-Matrix immobilisiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch intensives Waschen entfernt. Das Präzipitat wurde auf einem 10%-igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Für den immunologischen Nachweis von Hda1-Myc6° (9E10) und Rum1-Flag4° (M#2) wurden die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert (4.13.3). Zur Abschätzung der

Immunpräzipitationsreaktion wurde jeweils ein Aliquot des ursprünglichen, unbehandelten Proteinextrakts aufgetragen. Zu bemerken war, dass Immunkomplexe im Nachweisverfahren durch den Einsatz sekundärer Antikörper bedingt zwei zusätzliche Banden einer molekularen Masse von 50 kDa und 20 kDa zeigten, die schwere und leichte Ketten der Antikörper aus den Immunkomplexen repräsentierten (Abb. 17).

Im unbehandelten Proteinextrakt und 9E10 Immunpräzipitat der Stämme MR59 und MR61 wurde jeweils eine singuläre, der erwarteten, molekularen Masse von Hda1-Myc6° entsprechende 70 kDa Bande nachgewiesen. In Proteinpräparationen des Kontrollstammes MR62 lag Hda1-Myc6° nicht vor und zeigte die spezifische Reaktion von antigenen Hda1-Myc6° Proteinen und dem Antikörper 9E10. Ein Vergleich der Immunpräzipitate und des ursprünglichen Zellextrakts ergab, dass etwa 10 % der epitopmarkierten Hda1-Myc6° Proteine immunpräzipitiert werden konnten (Abb. 17).

Interessanterweise war der Nachweis von Rum1-Flag4° im unbehandelten Proteinextrakt und M#2 Immunpräzipitat der Stämme MR59 und MR62 durch ein charakteristisches Bandenmuster gekennzeichnet, das Rum1-Flag4° Proteinvarianten einer molekularen Masse zwischen 250 kDa und 75 kDa entsprach. Da in Proteinpräparationen des Stammes MR61 diese Banden nicht vorlagen, wurde von einer spezifischen Reaktion des Antikörpers M#2 mit Rum1-Flag4° Proteinen ausgegangen. Des Weiteren wurde in M#2 Immunkomplexen der Stämme MR59 und MR62 eine Vielzahl kleinerer Banden im Größenbereich von 35 kDa bis 50 kDa detektiert, die auf einen möglichen Abbau der Rum1-Flag4° Proteine während der Immunpräzipitationsreaktion hinwiesen. Der Antikörper M#2 reagierte zudem unspezifisch mit Proteinen der untersuchten Zellextrakte. Die kreuzreagierende Bande entsprach dabei unbekanntem Proteinen mit einer molekularen Masse von 40 kDa. Es konnten jeweils etwa 10 % der Rum1-Flag4° Proteine aus Zellextrakten der Stämme MR59 und MR62 immunpräzipitiert werden (Abb. 17).

Die Hda1-Myc6° Immunkomplexe des Antikörpers 9E10 wurden hinsichtlich der Präsenz von Rum1-Flag4° Proteinen in einem immunologischen Nachweis mit M#2 untersucht. Weder im Immunpräzipitat des Stammes MR59, noch bei MR61 und MR62, die zur Abschätzung einer möglichen unspezifischen Immunpräzipitation dienten, konnten jedoch Rum1-Flag4° spezifische Banden detektiert werden. Vergleichbares galt für die Rum1-Flag4° Immunkomplexe des Antikörpers M#2. In der Western-Analyse war keine zusätzliche Bande erkennbar, die auf die Anwesenheit von Hda1-Myc6° in einem M#2 Immunkomplex schließen ließ. In den Kontrollreaktionen mit Zellextrakten der Stämme MR61 und MR62 konnten ebenfalls keine Hda1-Myc6° spezifische Bande nachgewiesen werden.

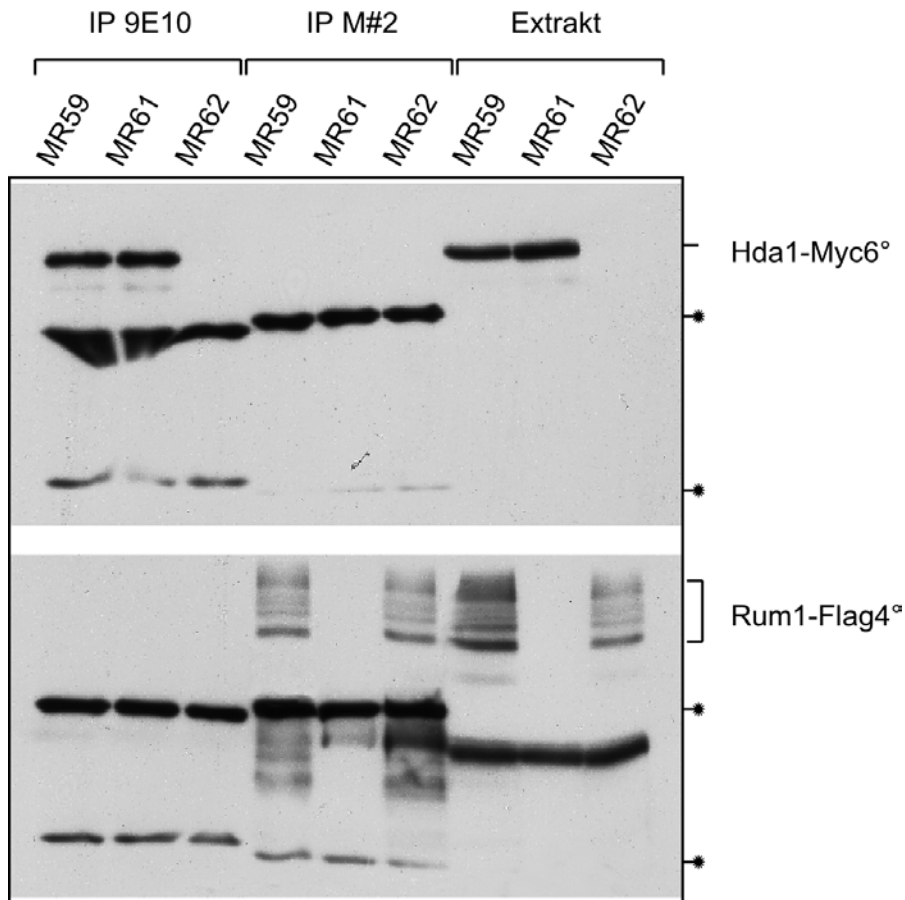


Abb. 17. Coimmunpräzipitationsexperimente zur möglichen Interaktion von Hda1 und Rum1.

Es wurden jeweils 10 µg der affinitätsgereinigten Antikörper 9E10 (anti-Myc6°) und M#2 (anti-Flag4°) zur Immunpräzipitation (IP) von Hda1-Myc6° oder Rum1-Flag4° aus jeweils 0,5 ml Proteinextrakt der Stämme MR59, MR61 und MR62 eingesetzt. Die Immunpräzipitate der Antikörper 9E10 (IP 9E10) und M#2 (IP M#2) wurden auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel geladen. Zur Abschätzung der IP-Reaktion wurde eine 10-fache Verdünnung des ursprünglichen Proteinextrakts aufgetragen (Extrakt). Etwa 10% der eingesetzten Myc6°-Fusionen und Flag4°-Fusionsproteine konnten immunpräzipitiert werden. Die Analyse der möglichen Präzipitate zeigte, dass Rum1-Flag4° nicht im Immunpräzipitat von Hda1-Myc6° vorlag. Ebenso konnte Hda1-Myc6° nicht im Immunpräzipitat von Rum1-Flag4° nachgewiesen werden.

2.5. Der Hda1-Komplex

Obwohl ein möglicher Hda1/Rum1-Komplex nicht nachgewiesen werden konnte (2.4), erschien auf Grund der Homologie von Hda1 zu anderen Proteinen, die im Verbund mit Cofaktoren durch Deacetylierung die Chromatinstruktur bestimmen, die Bildung eines Hda1-Komplexes wahrscheinlich. Zum Nachweis eines möglichen Hda1-Komplexes wurde der Stamm MR48 (*al b1 Δhda1 pHda1myc6°-cbx*) konstruiert, der das funktionelle Hda1-Protein Hda1-Myc6° exprimiert (4.3). Zellen einer exponentiell wachsenden MR48-Kultur wurden pelletiert, in physiologischer Pufferlösung aufgenommen und mittels "French-Press" aufgeschlossen (4.13.1). Die löslichen Proteinkomplexe wurden auf einer Superose 6 Gelfiltrationssäule entsprechend ihrer molekularen Masse getrennt (4.13.6). Jeweils 1,0 ml-Fraktionen wurden gesammelt und 20 µl Aliquots auf einem 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und hinsichtlich der Verteilung von Hda1-Myc6° untersucht. Die Massen der Proteinkomplexe, die in den einzelnen Fraktionen vorlagen, wurden mit Hilfe eines Gelfiltrationsstandards abgeschätzt (4.13.6).

Die Immundetektion mit dem monoklonalen Antikörper 9E10 zeigte, dass Hda1-Myc6° in Fraktionen vorlag, die etwa 2,0 MDa große Proteinkomplexe enthielten. Zudem konnte das monomeres Hda1-Myc6° Protein in niedermolekularen Fraktionen nachgewiesen werden, die etwa 70 kDa große Proteine enthielten (Abb. 18). Das Ergebnis zeigte die Existenz eines hochmolekularen Hda1-Komplexes in *U.maydis*.

Alle bislang durchgeführten Experimente wiesen darauf hin, dass Rum1 vermutlich nicht an der Ausbildung des Hda1-Komplexes beteiligt war. *hda1* unterlag weder einer transkriptionellen Kontrolle durch *rum1* (2.2.2.3), noch wurde eine mögliche physikalische Assoziation zwischen Hda1 und Rum1 beobachtet (2.4), obwohl beide regulatorischen Proteine die *egl1*-Genexpression bestimmten, die in *Δhda1*-Stämmen und *Δrum1*-Stämmen mit dem Aufbau einer zugänglichen Chromatinstruktur und Hyperacetylierung von Histonproteinen korrelierte (2.3). Auf Grund dieser Ergebnisse schien es möglich, dass *rum1* die Aktivität bislang unbekannter Cofaktoren des Hda1-Komplexes kontrollieren und so indirekt die Ausbildung des Hda1-Komplexes betreffen könnte.

Das Plasmid *pHda1myc6°-cbx* (2.2.1.2) wurde in den Stamm FB1 Δ *rum1* übertragen. Der resultierende Stamm wurde mit MR110 (*al b1 Δrum1-1 pHda1myc6°-cbx*) bezeichnet und exprimiert Hda1-Myc6° Proteinen, ohne dass funktionelle Rum1 Proteine vorlagen (4.3). Wie oben beschrieben, wurde die Hda1-Komplexbildung des Stammes MR110 verfolgt (Abb. 18).

Die Verteilung von Hda1-Myc6° Proteinen konnte in MR110 (*al b1 Δrum1-1 pHda1myc6°-cbx*) ohne wesentlichen Unterschied zu MR48 (*al b1 Δhda1 pHda1myc6°-cbx*) in hochmolekularen und in den der molekularen Masse der monomeren Hda1 entsprechenden Fraktionen nachgewiesen werden (4.13.6). Dieses Ergebnis zeigte, dass es mit hoher

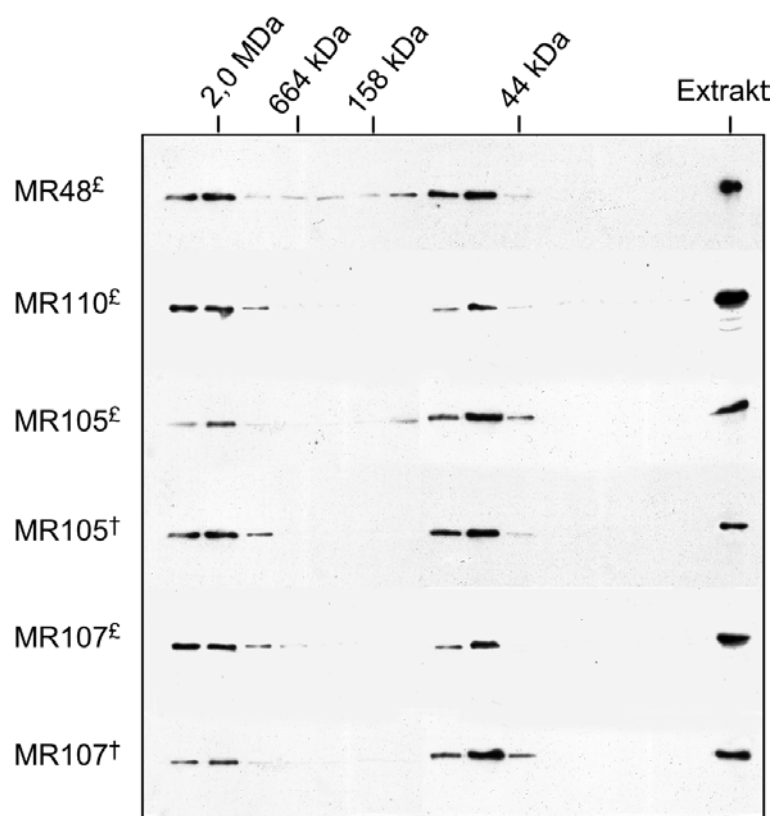
Wahrscheinlichkeit auch in einem haploiden Stamm, der kein funktionelles *rum1* besaß, zur Ausbildung des 2,0 MDa Hda1-Komplexes kam.

Bei der Herstellung von $\Delta hda1$ -Stämmen war besonders auffällig, dass in Stämmen, die eine aktives bE/bW-Heterodimer trugen, die Deletion von *hda1* nicht gelang. Mit dem $\Delta hda1$ -Stamm MR42 (*a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1*; 2.2.2.1 und 4.3) standen Zellen zur Verfügung, die nach Induktion von *bE1* in einem $\Delta hda1$ -Stamm ein aktives bE/bW-Heterodimer ausbilden konnten. Solche Zellen zeigten nach Wachstum auf Arabinose-haltigen Medien eine starke filamentöse Entwicklung. Durch Retransformation des Stammes MR42 mit einem *hda1*-kodierenden Expressionsplasmid konnte dieser Phänotyp wieder vollständig aufgehoben werden (nicht gezeigt). Mit Glukose als Kohlenstoffquellen bildete MR42 glatte Kolonien (2.2.2.1). Ob in solchen Zellen die Ausbildung des Hda1-Komplexes betroffen sein könnte, wurde durch Gelfiltrationsanalysen nativer Proteinextrakte der Stämme MR107 (*a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1 pHda1myc6°-cbx*) und MR105 (*a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1 pHda1myc6°-cbx*) untersucht (4.3. und 4.13.6). In Glukose-haltigen Medien kam es nicht zur Induktion von *bE1*. Bei Wachstum auf Arabinose-haltigen kam es zur Expression von *bE1*. In MR105-Zellen bildete sich daraufhin eines aktives bE/bW-Heterodimer (nicht gezeigt). MR107 war der entsprechende Kontrollstamm, der keine kompatiblen *bE* und *bW* Gene kodierte. Wie oben beschrieben, wurde die mögliche Ausbildung der Hda1-Komplexe in einer Gelfiltrationsanalyse der löslichen Proteinkomplexe verfolgt (4.13.6).

Die Ausbildung eines 2,0 MDa Hda1-Komplexes konnte ebenso in Proteinextrakten von MR105-Zellen und MR107-Zellen, die in induzierenden, Arabinose-haltigen oder in nicht-induzierenden Glukose-haltigen Nährlösungen kultiviert wurden, beobachtet werden (Abb. 18). Diese Resultate zeigten, dass die Formation eines aktives bE/bW-Heterodimers die Ausbildung des Hda1-Komplexes nicht betraf.

Abb. 18. Hda1-Myc6° lag in einem hochmolekularen 2,0 MDa Proteinkomplex vor (nächste Seite).

Proteinextrakte der Stämme MR48, MR110, MR105 und MR107 wurden über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt (4.13.6). Die Immundetektion von Hda1-Myc6° in den jeweiligen Fraktionen zeigte die Anwesenheit von Hda1-Myc6° in Proteinfractionen, die hochmolekulare Proteinkomplexe enthielten und einer molekularen Masse von etwa 2,0 MDa entsprachen. Darüberhinaus wurde Hda1-Myc6° in Fraktionen detektiert, die etwa 70 kDa große Proteinen enthielten. Die mit £ gekennzeichneten Stämme wurden in Glukose-haltigen Medien inkubiert. Die mit † gekennzeichneten Stämme MR105 und MR107 wurden in CM-Ara inkubiert. Daraufhin kam es zur Induktion von *bE1*. In MR107 kann sich ein aktives bE/bW-Heterodimer bilden. Die molekularen Massen der jeweiligen Proteinkomplexe wurden mit Hilfe eines Größenstandards abgeschätzt (4.13.6).



3. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung regulatorischer Gene aus *U.maydis*, die an der Kontrolle der *b*-abhängigen, pathogenen Entwicklung beteiligt sind. Zunächst wurde versucht, in einem direkten Selektionsprozess haploide, pathogene Stämme zu isolieren, die aus einer REMI-Mutagenese eines haploiden Wildtypstammes hervorgingen. Dabei wurde eine neuartige Mutagenesestrategie angewandt, die sowohl "loss of function" als auch "gain of function" Mutanten erzeugen sollte.

In einer UV-Mutagenese wurden durch Nutzung von *egl1* als Reporter gen Stämme mit EG-Aktivität isoliert. Die Expression des *b*-abhängigen, aber vermutlich nicht direkt durch das bE/bW-Heterodimer regulierten Gens *egl1*, sollte dabei eine Mutation in einem regulatorischen Gen anzeigen, das wiederum unter der Kontrolle des bE/bW-Heterodimers stehen könnte. Es wurde angenommen, dass interessante Mutanten neben *egl1* eine Vielzahl *b*-abhängiger Gene exprimieren.

Die Komplementation des erzeugten Stammes MR9-1 führte zur Isolierung des regulatorischen Gens *hda1*. Es kodiert für ein Protein mit signifikanter Homologie zu Histondeacetylasen und wirkt hauptsächlich als Regulator der Expression von *b*-abhängigen Genen. Vermutlich bestimmt ein hochmolekularer Hda1-Komplex den Aufbau einer höher geordneten Chromatinstruktur an regulatorischen Sequenzen und somit die Genexpression *hda1*-abhängiger Gene.

3.1. Der REMI^{on-off}-Mutageneseansatz

Seit der Entdeckung der zentralen Rolle der b-Proteine für die pathogene Entwicklung von *U.maydis*, rückte die Identifizierung nachgeschalteter Effektorgene in den Mittelpunkt des Interesses (Kahmann et al., 1995). Eine attraktive Hypothese ist, dass das aktive bE/bW-Heterodimer die Expression von zentralen Regulatoren bestimmt, die den weiteren Verlauf der pathogenen Entwicklung determinieren (1.6).

Weil das bE/bW-Heterodimer die Transkription nachgeschalteter, regulatorischer Gene aktivieren oder reprimieren könnte, wurde ein modifiziertes REMI-Verfahren (Kuspa and Loomis, 1992) gewählt, das sowohl zur Geninaktivierung als auch zu einer aktivierten Transkription betroffener Gene führen könnte. In einer Stichprobe wurde gezeigt, dass das Mutageneseplasmid pREMI^{on-off} vornehmlich in singulärer Kopie und zufällig verteilt in das Genom integriert. Es bestand damit einerseits die Möglichkeit, dass durch die Integration des Mutageneseplasmids unmittelbar ein Gen inaktiviert wird. Andererseits könnten eingebrachte Sequenzen auch zur Aktivierung benachbarter Gene führen, wie viele Beispiele belegen (Barkan and Martienssen, 1991; Gierl, 1990; Payne et al., 1982; Wilson et al., 1996). Als ein wesentlicher Vorteil gegenüber klassischen Mutageneseansätzen durch UV erschien die direkte Markierung des betroffenen Genortes und die damit erleichterte Identifizierung des entsprechenden Gens (Bölker et al., 1995a). Die Hoffnung war, direkt im Pathogenitätstest

mit Mischsuspensionen bestehend aus jeweils 50 REMI^{on-off}-Stämmen mögliche, pathogene Mutanten identifizieren zu können. Die Versuchsbedingungen wurden dabei so gewählt, dass vergleichbar zum Referenzexperiment mit CL13/FB1-Mischungen eine pathogene Zelle unter 1000 FB1-Zellen isoliert werden könnte. Dennoch wurde keine haploid-pathogene Mutante identifiziert.

Das Scheitern dieses Mutageneseansatzes könnte zum Einem in der mit $1,5 \times 10^4$ Transformanten umfassenden, zu geringen Mutantenzahl liegen. Gegebenenfalls waren die Selektionsbedingungen auch nicht geeignet, "schwach" pathogene Stämme zu identifizieren. Möglich ist darüber hinaus, dass die Integration des Mutageneseplasmids vorwiegend an zugänglichen Chromatinbereichen und damit nicht zufällig erfolgte. Ein prinzipielles Problem bestand außerdem darin, dass *Bam*HI Schnittstelle(n) in relevanten Gensequenzen vorliegen müssen, um entsprechende Mutationen durch Integration von pREMI^{on-off} zu erzeugen.

Es verdichten sich die Hinweise, dass möglicherweise ein Zusammenspiel mehrerer Zielgene der *b*-Homeodomänenproteine den erfolgreichen Verlauf der pathogenen Entwicklung bestimmt. In einem differentiellen Ansatz zur Isolierung von Genen, die während einer Phase von fünf Stunden nach Ausbildung eines aktiven *bE/bW*-Heterodimers exprimiert werden, konnten sieben neue *b*-induzierte und fünf neue *b*-reprimierte Gene isoliert werden. Übertragen auf das gesamte Transkriptom von *U.maydis* wären somit etwa 3,1% der Gene in Abhängigkeit des *bE/bW*-Heterodimers exprimiert (Brachmann, 2001). Die Untersuchungen zu früh *b*-abhängigen Genen ließen den Schluss zu, dass es sich um direkt durch das *bE/bW*-Heterodimer regulierte Gene handeln könnte (Brachmann, 2001; Brachmann et al., 2001). Obwohl frühere Ansätze die Gesamtzahl *b*-abhängiger Gene niedriger einschätzten (Bohlmann, 1996; Bohlmann et al., 1994), ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass das *bE/bW*-Heterodimer direkt oder indirekt eine große Anzahl von Genen reguliert. Arbeiten aus *Drosophila* führten zu einem vergleichbaren Modell der Genregulation durch Homeodomänenproteine. Die Autoren vermuten, dass viele Gene im Laufe der Entwicklung der Fliege durch Homeodomänenproteine Even-skipped (*Eve*) und Fushi-tarazu (*Ftz*) direkt reguliert sein könnten (Liang and Biggin, 1998). Für die direkte Regulation spricht dabei, dass die Homeodomänenproteine unerwartete Promotorsequenzen sowohl *in vitro* binden, als auch *in vivo* die Expression der entsprechenden Gene (z.B. *hsp70*) in einer kurzen Zeitspanne nach deren Aktivierung transkriptionell regulieren. Zudem besteht eine ungefähre Korrelation zwischen der Stärke der DNA-Bindung und dem Grad der Regulation eines Gens durch *Eve*.

Für die pathogene Entwicklung von *U.maydis* kann also möglicherweise gelten, dass das *bE/bW*-Heterodimer durch direkte Bindung an entsprechende regulatorische DNA-Sequenzen eine große Anzahl von Genen reguliert, die dann konzertiert wirken. Trifft diese Hypothese zu, ist nicht anzunehmen, dass durch die Mutation eines einzelnen Gens, was in der Mehrzahl der REMI^{on-off}-Stämme der Fall sein sollte, die pathogene Entwicklung von *U.maydis* eingeleitet werden kann.

Andererseits sind im nahe zu *U.maydis* verwandten Basidiomyceten *C.cinereus* Stämme bekannt, die ohne Ausbildung eines funktionellen Heterodimers des *A*-Keuzungstyplocus die sexuelle Morphogenese vollziehen können. Die entsprechenden Gene *pcc1* und *clp1* konnten kloniert werden. Es wird vermutet, dass sowohl Pcc1, das für ein HMG-Domänenprotein kodiert und als Repressor *A*-abhängiger Gene wirkt, als auch Clp1 mit bislang unbekannter Funktion wichtige Komponenten der *A*-Regulationskaskade und möglicherweise direkte Zielgene des *A*-Heterodimers darstellen (Murata et al., 1998; Inada et al., 2001). In diesem Zusammenhang besonders interessant war die Identifizierung der haploiden und pathogenen Mutante *rtfl* aus *U.maydis* (Banuett, 1991), die offenbar auch ohne einen funktionellen bE/bW-Heterodimer die pathogene Entwicklung einleiten kann. Es wurde allerdings nicht experimentell ausgeschlossen, dass es sich bei *rtfl* um einen Mutationstyp der *b*-Gene handeln könnte. Die Isolierung des Gens *rtfl* steht bislang aus.

3.2. Der UV-Mutageneseansatz zur Isolierung von haploiden Stämmen mit EG-Aktivität

In der hier durchgeführten UV-Mutagenese wurden 24 haploide Stämme erzeugt, die EG-Aktivität aufweisen, obwohl es in der natürlichen Situation erst nach Ausbildung von Filamenten zur Induktion der *egl1*-Expression kommt (Schauwecker et al., 1995). Vorhergehende Arbeiten führten zur Isolierung einer weiteren Mutante mit EG-Aktivität und zur Charakterisierung des entsprechenden regulatorischen Gens *rum1* (Quadbeck-Seeger, 1998). Demnach sind bislang 25 Stämme dieser Mutantenklasse erzeugt worden. Die diesen Arbeiten zu Grunde liegende Hypothese war, dass Mutationen in regulatorischen Genen, die *egl1* kontrollieren, zugleich die *b*-abhängige, pathogene Entwicklung betreffen könnten.

Bei den eingeführten Mutationen handelt es sich offensichtlich um Veränderungen von Genen, die in haploiden Zellen formal Repressoren von *egl1* kodieren. Einige der erzeugten Stämme sind durch EG-Aktivität gekennzeichnet, obwohl kein *egl1*-spezifisches Transkript nachgewiesen wurde. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass - wie schon Schauwecker et al. (1995) vermuteten - neben *egl1* noch weitere Gene vorliegen, die Proteine mit Glukanase-Aktivität kodieren. Möglicherweise liegen auch hier Mutationen in regulatorischen Genen mit Repressorfunktion vor, wobei allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um *cis*-Mutationen in regulatorischen Sequenzen von Glukanasegenen handelt.

Um das regulatorische Spektrum der vermuteten Repressoren während der haploiden Entwicklung aufzuzeigen, wurde die Koloniemorphologie der jeweiligen Mutanten in Abhängigkeit von verschiedenen Wachstumsmedien bewertet. Besonders auffällig war die dunkle Verfärbung von Kolonien der Stämme MR1-1, MR7-1 und MR9-1, die ein dunkles Pigment produzieren oder ein Enzym sekretieren, das Medienkomponenten zu dunkel erscheinenden Produkten umsetzt. Die Kontrolle der Pigmentierung in *U.maydis* ist weitestgehend unbekannt, jedoch zeigen Zellen, die eine Mutation in *ukc1* tragen, das für eine Proteinkinase kodiert, ähnlich wie MR1-1, MR7-1 und MR9-1 eine dunkle Morphologie

(Dürrenberger and Kronstad, 1999). Da dieser Effekt wie die Filamentbildung einiger Stämme mit EG-Aktivität vom Wachstumsmedium abhängig sein könnte, ist eventuell von weiteren, regulatorischen Funktionen der entsprechenden, mutierten Genorte auszugehen.

Jedoch allein die Aktivierung von Genen, die wie *egl1* in Wildtypstämmen unter der Kontrolle eines aktiven bE/bW-Heterodimers stehen, zeigte, dass in den entsprechenden Mutanten Regulatoren betroffen sind, die vermutlich innerhalb der b-Regulationskaskade liegen und die Genexpression *b*-abhängiger Gene in haploiden Zellen reprimieren.

An Hand dieser Kriterien konnten Stämme mit EG-Aktivität nach phänotypischen und funktionellen Aspekten eingeteilt werden (Tab. 3 und 4; Abb. 6). Augenscheinlich sind neben dem bE/bW-Heterodimer weitere regulatorische Gene an der transkriptionellen Kontrolle von *b*-abhängigen Genen beteiligt. Eine Vielzahl deregulierter Gene deutet dabei wahrscheinlich auf eine zentrale Stellung des jeweils mutierten Genortes innerhalb der Regulationskaskade bei der Kontrolle *b*-abhängiger Genexpression. Es könnte sich daher um ein regulatorisches Netzwerk handeln, mit einem bE/bW-Heterodimer als zentralem Regulator und weiteren, nachgeschalteten regulatorischen Genen. Dass keine Mutante erzeugt werden konnte, die in haploiden Zellen *dik6* exprimiert, liegt wahrscheinlich darin begründet, dass *dik6* ein direktes Zielgen des bE/bW-Heterodimers darstellt (Weinzierl et al., 2002).

Von zentraler Bedeutung waren die Untersuchungen zur möglichen pathogenen Entwicklung der haploiden Mutanten. Obwohl die EG-Aktivität der Stämme eine mögliche Aktivierung der *b*-abhängigen Regulationskaskade anzeigte, erfolgte bei keiner der haploiden Mutanten nach Infektion von Maispflanzen die Induktion von Tumoren. Wie im Falle der REMI^{on-off}-Mutagenese konnte kein *rtfl*-ähnlicher Stamm erzeugt werden. Vielmehr wird aus den Ergebnissen der Kreuzungs- und Pathogenitätstests deutlich, dass in dieser Mutantenklasse kompatible Kreuzungstypgene zur filamentösen und pathogenen Entwicklung vorliegen müssen. Vorläufige Analysen zu MR1-1 (K. Stahl, pers. Mitteilung), die Arbeiten zu FB1M#2 (Quadbeck-Seeger, 1998) und MR9-1 (diese Arbeit) zeigen, dass es sich in diesen Fällen vermutlich um eine rezessive Mutationen handelt, da nur kompatible Stämme, die die entsprechende Mutation trugen, keine Tumore mit reifen Sporen in Maispflanzen hervorrufen konnten. Es könnten in dieser Mutagenese Stämme isoliert worden sein, die vornehmlich in Genen betroffen sind, die nach Ausbildung des bE/bW-Heterodimers zur Vollendung der pathogenen Entwicklung benötigt werden. Besonders auffällig ist, dass die untersuchten Mutationen, die in haploiden Zellen formal Repressoren von *egl1* entsprechen, im filamentösen Dikaryon die weitere natürliche Entwicklung in der Pflanze unterdrücken und folglich während der pathogenen Entwicklung aktivierend wirken.

Dem mutierten Genort des Stammes MR9-1 wurde eine zentrale Stellung zugewiesen, da sowohl die Ausbildung der Koloniemorphologie als auch die Kontrolle von mindestens vier *b*-abhängigen Genen betroffen ist. Die Charakterisierung der Mutante führte zur Isolierung von *hda1*. Dessen Funktion und Rolle während der haploiden und nachfolgenden *b*-abhängigen Entwicklung wird im Folgenden diskutiert.

3.3. Hda1 zeigt Homologie zu Klasse (I) Histondeacetylasen

Ein Vergleich der Primärsequenzen konservierter Histondeacetylasen zeigt klar die nahe Verwandtschaft von Hda1 zu Rpd3p und HDAC1, die auf Grund ihrer Sequenz und Zugehörigkeit zu bestimmten Komplexen als Klasse (I) Histondeacetylasen bezeichnet werden (Rundlett et al., 1996). Proteine mit HDAC-Aktivität haben sich vermutlich aus einer gemeinsamen prokaryotischen Vorstufe entwickelt und während der Evolution in Klasse (I) und Klasse (II) Histondeacetylasen aufgespalten, die unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen könnten (Ahringer, 2000; Grozinger et al., 1999). Die Entstehung einer dritten Klasse mit Sir2p-ähnlichen HDAC-Proteinen verlief mit großer Wahrscheinlichkeit über einen parallelen, unabhängigen Weg (Graessle et al., 2001; Imai et al., 2000; Landry et al., 2000; Smith et al., 2000).

Der am stärksten konservierte Bereich von Hda1 zu ähnlichen Klasse (I) Proteinen umfasst etwa 75 Aminosäuren (Grozinger et al., 1999). Es erstreckt sich in Hda1 von Aminosäureposition 175 bis 243. Mutationsanalysen ähnlicher Proteine zeigen, dass in diesem Motiv konservierte Histidinreste und Aspartatreste eine essentielle, katalytische Funktion vermitteln (Hassig et al., 1998; Kadosh and Struhl, 1998). Die Positionen entsprechen H175, H176 und H213, sowie D209 und D226 in Hda1. Diese hoch konservierten Aminosäurereste sind auch bei prokaryotischen Enzymen zu finden, die am Grundumsatz von Acetat beteiligt sind oder als Deacetylase auf eine Vielzahl von acetylierten Polyaminen wirken (Grundy et al., 1993; Sakurada et al., 1996). In Anlehnung an Ergebnisse der Kristallstrukturanalysen HDAC-ähnlicher Proteine wird die Koordinierung eines Zink Atoms als essentiellm Cofaktor diskutiert (Finnin et al., 1999; Sakurada et al., 1996; Sun et al., 1999). Auf Grund der starken Konservierung essentieller Aminosäurepositionen im katalytischen Zentrums ist berechtigterweise davon auszugehen, dass *hda1* eine Histondeacetylase kodiert.

Diese Vermutung konnte in *S.cerevisiae* durch Komplementationsanalysen von $\Delta RPD3$ -Stämmen mit *hda1* bestätigt werden (Reichmann et al., 2002). Hda1 kann in Hefe bei der Kontrolle der *RPD3*-abhängigen Regulation des HO-Promotors die Funktion von Rpd3p partiell ersetzen. Während das funktionelle Homolog *zmRPD3* aus *Z.mays* ebenfalls *RPD3* ersetzen kann (Rossi et al., 1998), waren Komplementationsexperimente mit der verwandten Histondeacetylase HD1 aus Maus nicht erfolgreich, was durch den großen phylogenetischen Abstand von Maus und Hefe erklärt werden könnte (Bartl et al., 1997).

Hda1 zeichnet sich durch einen verlängerten C-Terminus aus, der besonders im Bereich von Position 435 bis 481 durch einen hohen Anteil (35%) an sauren Aminosäureresten gekennzeichnet ist. Eine Datenbankanalyse ergab keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinmotiven (nicht gezeigt). Es lässt sich deshalb nur schwer eine Funktion des C-Terminus ableiten. Interessanterweise zeigte die Analyse einer verkürzten Hda1-Variante (Hda1-myc6°), dass die 46 C-terminal gelegenen Aminosäurereste keine offensichtliche Funktion in *U.maydis* erfüllen. HDAC1 und HDAC2 aus Mensch, Huhn (cHDAC1) und

Maus (mHDAC1), homologe Proteine der Ascomyceten *Aspergillus nidulans* und *Cochliobolus carbonum* und AtHD1 von *A.thaliana* zeigen ebenfalls eine C-terminale Verlängerung. Eine spezifische Funktion ist auch hier bislang unbekannt.

Schon lange wurde vermutet, dass in eukaryotischen Zellen Histonacetylierung mit transkriptioneller Aktivität gekoppelt ist (Allfrey et al., 1964). Es konnte gezeigt werden, dass acetylierte Histone präferentiell mit transkriptionell aktivem Chromatin assoziiert sind (Sealy and Chalkley, 1978; Vidali et al., 1978). Acetylierung von Histonen führt zu Neutralisierung der positiv geladenen N-Termini, Deacetylierung hingegen zur lokalen Erhöhung des Ladungszustandes und damit zu einer hohen Affinität zum negativ geladene Rückgrat der DNA (Hong et al., 1993). Kristallstrukturanalysen von Nukleosomen zeigten darüber hinaus, dass die N-Termini vermutlich mit negativ geladenen Regionen eines benachbarten Nukleosoms interagieren können (Luger et al., 1997; Luger and Richmond, 1998). Deacetylierung der N-Termini könnte demnach zu einer kompakten, wenig zugänglichen Chromatinstruktur führen. Als Konsequenz der Änderung des Acetylierungszustandes von Histonen werden Konformationsänderung der Nukleosomen diskutiert (Norton et al., 1989), was ebenfalls die Zugänglichkeit von Chromatin für Transkriptionsfaktoren ändern könnte (Lee et al., 1993).

3.4. Hda1 betrifft die Chromatinstruktur und den Acetylierungsstatus von Histon H3

Da Hda1 auf Grund der Homologie zu Proteinen mit HDAC-Aktivität die Struktur von Chromatin ändern (Workman and Kingston, 1998) und dadurch die Transkription *hda1*-abhängiger Gene reprimieren könnte, wurden Untersuchungen zur Chromatinstruktur in Wildtypzellen und in $\Delta hda1$ -Zellen durchgeführt.

In partiellen Restriktionsansätzen schneidet MNaseI die im Chromatin organisierte DNA vorwiegend an den zugänglichen, internukleosomalen DNA-Abschnitten. Im Falle von *U.maydis* konnten so mononukleosomale DNA-Fragmente von 175 bp Länge und deren Vielfache erzeugt werden. In Anlehnung an strukturellen Daten der in Hefe um ein Histonoktamer gewundenen DNA (Luger et al., 1997) bedeutet dieses Ergebniss, dass in *U.maydis* vermutlich etwa 30 bp als Verbindungsglied zwischen den Nukleosomen fungieren, die gegebenenfalls von anderen Chromatinproteinen gebunden sein könnten (Felsenfeld, 1978; Zhou et al., 1998). Das Auftreten einer typischen Leiterstruktur von MNaseI-Fragmenten im Agarosegel zeigt, dass das Chromatin von *U.maydis* eine bevorzugte Struktur einnimmt und Nukleosomen nicht zufällig verteilt vorliegen. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung zu Ergebnissen anderer eukaryotischer Organismen (Zaret, 1999). Der Vergleich der MNaseI-Zugänglichkeit für Chromatin von Wildtypstämmen und $\Delta hda1$ -Stämmen ergab keine erkennbaren Unterschiede. Hda1 betrifft demnach nicht generell die Chromatinstruktur. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur spezifischen Wirkung von Hda1 auf die Genexpression ist vielmehr wahrscheinlich, dass Hda1 die Topologie des Chromatins nur an bestimmten Bereichen organisiert. Rpd3p-ähnliche HDAC-Komplexe können methyl-CpG-

reiche Chromatinregionen kondensieren und so zur Genrepression führen (Wade, 2001). Für die Gene *PHO8* und *ADH2* aus *S.cerevisiae* konnte bereits die direkte Verbindung von Histondeacetylierung, Positionierung von Nukleosomen und Genexpression bewiesen werden (Reinke et al, 2001; Verdone et al., 2002)

Am Beispiel der regulatorischen 5'-Region des *hda1*-abhängigen Gens *egl1*, wurde eine mögliche lokale Änderung der Chromatinstruktur verfolgt (Wu, 1980). Dabei wurde die Zugänglichkeit für MNaseI von Wildtypzellen mit dem MNaseI-Muster von $\Delta hda1$ -Zellen verglichen. Interessanterweise zeigen $\Delta hda1$ -Zellen ein verändertes MNaseI-Muster im regulatorischen Bereich von *egl1*. Auffällig bei $\Delta hda1$ -Zellen ist besonders das Auftreten charakteristischer Bandentriplets und Dupletts, die ebenfalls im entsprechenden MNaseI-Kontrollexperiment mit nackter DNA zu beobachten waren. Dieses Ergebnis deutet an, dass dieser Bereich möglicherweise nicht mit Proteinen besetzt ist, die die Zugänglichkeit für MNaseI beeinträchtigen können. In Wildtypzellen, die *hda1* exprimieren und keine *egl1*-Transkripte zeigen, ist dagegen diese Region durch eine hypersensitive Bande gekennzeichnet, die im Kontrollexperiment mit nackter DNA nicht auftritt. Eventuell ist die veränderte MNaseI-Aktivität auf die Anwesenheit eines Nukleosoms oder anderer Chromatinbindender Proteine zurückzuführen. Hda1 würde demnach die Positionierung eines Histonoktamers oder anderer Protein(e) im regulatorischen Bereich von *egl1* vermitteln. Weil die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie dadurch verändert wird, könnte es so zur Blockierung der Transkription von *egl1* kommen.

Ist der durch Hda1 verursachte Positionierungseffekt im regulatorischen Bereich von *egl1* durch die Beteiligung von Hda1 an reversiblen Deacetylierungsprozessen der N-Termini der Histone zurückzuführen? Bekanntermaßen ragen die N-terminalen Regionen der Kernhistone als flexible, irreguläre Ketten aus den nukleosomalen, scheibenartigen Strukturen heraus und gelten als Ziel vielfältiger posttranslationaler Modifikationen (Berger, 2001). Die Analyse von Chromatinkomplexen aus $\Delta hda1$ -Zellen, die mit einem Antikörper, der spezifisch gegen den diacetylierten N-Terminus von Histon H3 gerichtet ist, isoliert wurden, ergaben eine im Vergleich zum Wildtyp signifikante Anreicherung von *egl1*-spezifischen DNA-Fragmenten. Wie im Falle der geänderten Zugänglichkeit der regulatorischen 5'-Region von *egl1* korreliert auch die in $\Delta hda1$ -Zellen vorliegende Acetylierung von *egl1*-Chromatinkomplexen mit der Expression des nachgeschalteten *egl1*-Gens. Interessanterweise kann die verwandte Histondeacetylase Rpd3p aus *S.cerevisiae* Histon H4 als Substrat zur Deacetylierung verwenden (Rundlett et al., 1998). Da jedoch keine vergleichbaren experimentellen Daten von *hda1* vorliegen, ist dieser Befund zur Zeit nicht abschließend zu bewerten.

Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, die eine über einen großen Chromatinbereich verteilte Deacetylierungsaktivität von Histondeacetylasen beschreiben (Vogelauer et al., 2000), scheint die Histondeacetylase Hda1 bei der Kontrolle von *egl1* lokal zu wirken, da im Immunpräzipitat *egl1*-Sequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft zur angereicherten *egl1*-Sequenz nicht vermehrt auftraten. Eine detailliertere, quantitative Analyse der in

Chromatinkomplexen von $\Delta hda1$ -Zellen vorliegenden DNA könnte diesen Befund abschließend klären. Des Weiteren ist interessant, ob Hda1 nur im speziellen Fall von *egl1* begrenzt wirkt oder ob es sich dabei um eine generelle Eigenschaft von Hda1 handelt.

Überraschenderweise ist das für $\Delta hda1$ -Zellen ermittelte MNaseI-Muster auch bei $\Delta rum1$ -Zellen festzustellen. Aus Chromatinkomplexen der $\Delta rum1$ -Zellen konnten ebenfalls *egl1*-spezifische DNA-Fragmente angereichert werden. Dabei stimmen die im Immunpräzipitat acetylierter Chromatinkomplexe angereicherte *egl1*-Sequenzen weitgehend mit der *egl1*-Region überein, die im MNaseI-Experiment von $\Delta hda1$ -Zellen und $\Delta rum1$ -Zellen eine geänderte, vermutlich "offene" Chromatinstruktur aufweist. Es ist deshalb reizvoll anzunehmen, dass Hda1 und Rum1 möglicherweise als Komponenten eines regulatorischen Komplexes mit HDAC-Aktivität die Repression von *egl1* durch Positionierung von Proteinen in einem definierten Bereich der regulatorischen *egl1*-Sequenz vermitteln. Auf Grundlage dieser Experimente kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die *hda1/rum1*-abhängige Ausbildung der Chromatinstruktur und Deacetylierung von Histon H3 direkt die transkriptionelle Kontrolle von *egl1* betrifft, oder ob die beobachteten Modifikationen im regulatorischen Bereich von *egl1* lediglich die Folge der aktiven Transkription in $\Delta hda1$ -Stämmen und $\Delta rum1$ -Stämmen sind.

3.5. Der Hda1-Komplex

Histondeacetylasen liegen wie viele andere "Maschinen" der Chromatinmodellierung *in vivo* in Multiproteinkomplexen vor (Travers, 1999). Aus den Ergebnissen vieler Untersuchungen wird klar, dass Histondeacetylasen im Komplex mit anderen Proteinen durch Bindung eines Transkriptionsfaktors an entsprechende Chromatinbereiche geleitet werden (Heinzel et al., 1997; Jones et al., 1998; Kehle et al., 1998; Kim et al., 1999; McLeskey-Kiefer et al., 2002; Melnick et al., 2002). Obwohl Histondeacetylasen *in vitro* assemblierte Histon-DNA Komplexe deacetylieren können (Emiliani et al., 1998; Hassig et al., 1998), werden komplexe nukleosomale Strukturen in vergleichbaren Experimenten nicht modifiziert (Zhang et al., 1998b). Wahrscheinlich benötigen Histondeacetylasen Cofaktoren, um höher geordnetes Chromatin angreifen zu können.

Gelfiltrationsexperimente mit nativen Proteinextrakten zeigten, dass Hda1 in hochmolekularen Proteinfractionen vorliegt, die Proteinkomplexen einer molekularen Masse von 2,0 MDa und größer enthalten. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen in *S.cerevisiae*. Die nahe verwandte Klasse (I) Histondeacetylase Rpd3p ist ebenso eine Komponente eines etwa 2,0 MDa großen Multiproteinkomplexes (Kasten et al., 1997), während die Klasse (II) Histondeacetylase Hda1p aus Hefe als Komponente des HDA-Komplexes gereinigt wurde (Carmen et al., 1996; Rundlett et al., 1996).

In Eukaryoten findet man Klasse (I) Histondeacetylasen vornehmlich in zwei distinkten Multiproteinkomplexen, die gemeinsame Untereinheiten aufweisen. Die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2, sowie die ursprünglich als Retinoblastoma (Rb)-assoziierten Proteine

beschriebenen RbAp46 und RbAp48 sind gemeinsame Komponenten des Sin3-Komplexes und des NuRD-Komplexes (Ahringer, 2000; Hassig et al., 1997; Taunton et al., 1996; Verreault et al., 1996). Spezifisch assoziiert mit Sin3 sind SAP18 und SAP30 (Kornberg and Lorch, 1999; Vidal et al., 1991; Zhang et al., 1997). N-CoR und SMRT sind essentielle Cofaktoren, die die Repression der HDAC-Komplexe erleichtern. Sie fungieren als Bindungsbrücke zwischen Transkriptionsfaktoren und dem Sin3-Komplex (Heinzel et al., 1997; Nagy et al., 1997). Sin3-Komplexe sind vor allem aus Säugersystemen und Hefe bekannt, während NuRD-Komplexe in Säugerzellen und bei *Xenopus* analysiert wurden (Björklund et al., 1999; Zhang et al., 1997). NuRD enthält im Unterschied zu Sin3-Komplexen eine ATP-abhängige Aktivität der Nukleosomenremodellierung. Verantwortlich dafür zeichnen Proteine der Mi2/CHD-Familie, PHD-Fingerproteine und DNA-Helikasen der SWI/SNF-Familie (Zhang et al., 1998a). Unterschiedliche Komponenten beider Komplexe sind in *D.melanogaster*, *C.elegans* und *A.thaliana* beschrieben, was auf eine weite Verbreitung solcher, evolutionär konservierter Komplexe schließen lässt (Ahringer, 2000) und vermutlich auch *U.maydis* einschließt.

Ob Sin3-Komplexe und NuRD-Komplexe in *U.maydis* vorliegen und welchem dieser HDAC-Komplexe Hda1 bei der Regulation von *egl1* zuzuordnen ist, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass Rum1 an der Kontrolle vieler *hda1*-abhängiger Gene (z.B. *egl1*, *hum2*, *b*-Gene) beteiligt ist, gibt jedoch Anlass zur Vermutung, dass Hda1 und Rum1 zusammen in einem HDAC-Komplex vorliegen könnten. Rum1 zeigt eine starke Ähnlichkeit zu dem Rb-bindenden Protein RBP2 (Defeo-Jones et al., 1991), wobei bemerkenswerterweise Rb-assoziierte Proteine als Komponenten von HDAC-Komplexen beschrieben wurden (Brehm et al., 1998; Luo et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998). Rum1 enthält eine ARID (Dri)-Domäne die ebenso in Swi1p vorliegt und eine Rolle bei der Chromatin-vermittelten transkriptionellen Kontrolle spielt. Die in Rum1 konservierte PHD-Domäne wurde bei einigen Proteinen gefunden, die über die Interaktion mit oder durch Modifikation von Chromatin wirken (Aasland et al., 1995). Bei Mi2 β , einer Komponente von NuRD, ist die PHD-Domäne beteiligt an der Interaktion mit der Histondeacetylase HDAC1 (Zhang et al., 1998a). Rum1 zeigt zwar keine extensive Homologie zu CHD3, ebenfalls einem Vertreter der Mi2/CHD-Familie, aber einen in Art und Abfolge bestimmter Motive ähnlichen Aufbau (Tong et al., 1998). Es scheint daher möglich, dass Hda1 und Rum1 bei der Kontrolle von *egl1* in HDAC-Komplexen vorliegen, die vielleicht sogar wie NuRD eine ATP-abhängige Nukleosomenmodellierungsaktivität aufweisen. Die Genregulation *hda1*-abhängiger Gene wie *ssp1*, die offensichtlich ohne Beteiligung von Rum1 abläuft, wird offenbar von anderen Hda1-Komplexen übernommen.

Die direkte Wechselwirkung von Hda1 und Rum1 konnte im Zwei-Hybrid System von *S.cerevisiae* nicht demonstriert werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die in Rum1 vorhandene PHD-Domäne vermutlich nicht alleine die Interaktion mit Histondeacetylasen vermitteln kann (Zhang et al., 1998a). Es könnten demnach für die postulierte Interaktion

weitere, essentielle Cofaktor(en)/Untereinheiten des Hda1-Komplexes benötigt werden, die im Hefesystem nicht vorliegen. Zum Anderen könnten die jeweiligen Fusionsproteine geänderte Proteinkonformationen aufweisen, die eine mögliche Ausbildung von Interaktionsoberflächen beeinflussen und somit die mögliche physikalische Wechselwirkung stören.

Andererseits gaben aber auch die durchgeführten Coimmunpräzipitationsexperimente, die eine direkte oder indirekte Wechselwirkung von Hda1 mit Rum1 nachweisen könnten, keine Hinweise auf die vermutete Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch die Analyse der 2,0 MDa Hda1-Komplexe im Gelfiltrat von $\Delta rum1$ -Zellen. Wäre das 250 kDa Rum1-Protein eine Komponente des Hda1-Komplexes, müsste eine merkliche Größenabnahme des Hda1-Komplexes in $\Delta rum1$ -Zellen festzustellen sein. Da die Expression von Rum1 in Zellen, die entsprechende Genkonstrukte tragen, auch zur Produktion von Rum1-Proteinen mit einem niedrigen Molekulargewicht führte, ist nicht auszuschließen, dass eine niedermolekulare Rum1-Variante im Hda1-Komplex vorliegt. Voraussetzung für weitere Experimente wäre deshalb eine detaillierte Deletionsanalyse von *rum1*, die die essentiellen Bereiche von Rum1 eingrenzt. Die Hypothese eines stabilen Komplexes mit Hda1 und Rum1 als dessen gemeinsame Untereinheiten konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

3.6. Genregulation durch Hda1

Die Expression des *hda1*-abhängigen Gens *egl1* wird in haploiden Zellen durch Hda1 reprimiert. Dabei korreliert die Genrepression mit einer Deacetylierung von H3 Histonproteinen und Bildung einer wenig zugänglichen Chromatinstruktur.

In Anlehnung an detaillierte Untersuchungen zur Verteilung von Rpd3p im Genom der Bäckerhefe ist eine Lokalisierung des Hda1-Komplexes über sequenzspezifisch bindende Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich (Kurdistani et al., 2002). Für die gezielte Genrepression durch Histondeacetylasen bestehen zwei Möglichkeiten (Ayer, 1999): Der Hda1-Komplex könnte an regulatorische Sequenzen geleitet werden und in einer Konkurrenzreaktion vorliegende Transkriptionsfaktoren wie im Falle der Genregulation durch Mad-Max verdrängen (Ayer and Eisenman, 1993; Ayer et al., 1993). Der Hda1-Komplex könnte aber auch wie z.B. MBD-Corepressorkomplexe an methylierte Bereiche der regulatorischen Region positioniert werden (Ballestar and Wolffe, 2001; Robertson et al., 2000). In beiden Fällen könnten Hda1-Komplexe zu einer lokalen Deacetylierung der N-Termini der Histone führen und damit zum Aufbau einer weniger zugänglichen Chromatinstruktur im regulatorischen Bereich *hda1*-abhängiger Gene. Die Genexpression wird in haploiden Zellen reprimiert (Abb. 19).

Es sind vor allem *b*-abhängige Gene und die *b*-Gene selbst, die der Kontrolle durch *hda1* unterliegen. Da sich während der haploiden Entwicklung kein aktives bE/bW-Heterodimer ausbildet (Kämper et al., 1995), kann die erhöhte Expression der *b*-Gene nicht die Ursache der

Expression *b*-abhängiger Gene in $\Delta hda1$ -Zellen sein. Vielmehr vermitteln vermutlich andere Transkriptionsfaktor(en) die Expression von *egl1*, *hum2*, *dik1*, *bE*, *bW* und weiteren *hda1*-abhängigen Genen, nachdem die Genrepression durch Hda1 in haploiden $\Delta hda1$ -Zellen entfällt.

Nach Zellfusion und Ausbildung eines aktiven bE/bW-Heterodimers wird die Expression der *b*-Gene und *b*-abhängiger Gene induziert, die in haploiden Zellen unter der Repressionskontrolle von Hda1 stehen. Auffällig ist, dass die Transkriptmengen von *egl1*, *hum2*, *bE*, *bW* und *dik1* in den Kreuzungsprodukten der $\Delta hda1$ -Stämme MR11 und MR3 z.T. deutlich erhöht gegenüber entsprechenden Signalen aus einer Wildtypkreuzung waren. Da es sich bei der Analyse der Transkripte von Kreuzungsprodukten immer um eine Mischung von nichtfusionierten haploiden und dikaryotischen Zellen handelt, könnte diese Beobachtung mit der Anwesenheit haploider Zellen bei der Präparation der RNA erklärt werden.

Vor Aktivierung von *hda1*-abhängigen Genen muss es im Zuge eines Derepressionsmechanismus zur Auf- oder Ablösung von Hda1-Komplexen kommen. Das klassische Beispiel der Regulation des *HO*-Gens aus *S.cerevisiae* zeigt, dass es zur Interaktion des *RPD3*-Gens mit einer Vielzahl regulatorischer Gene kommt (Sternberg et al., 1987). Die vorliegenden Expressionsanalysen zu *hda1* unterstützen nicht die Annahme, dass *hda1* einer transkriptionellen Kontrolle unterliegt und somit die Hda1-Aktivität durch b-Proteine oder anderer Faktoren wie z.B. Rum1 gesteuert wird. Da Histondeacetylasen als Komponenten multifaktorieller Proteinkomplexe vorliegen, bestehen dennoch breite Regulationsmöglichkeiten. Beispielsweise könnten Cofaktor(en) des Hda1-Komplexes ihrerseits einer transkriptionellen Kontrolle unterliegen, wie es für die Unterheiten Sin3p, SAP18 und RbAp46 von HDAC-Komplexen gezeigt wurde (Boehmelt et al., 1998; Guan et al., 2001; Wang et al., 1990). Fehlten essentielle Cofaktor(en), könnten in der Folge aktive Hda1-Komplexe nicht aufrecht erhalten werden. Zudem könnte Hda1 wie HDAC1 über posttranslationale Prozesse modifiziert und so direkt ihre Aktivität gesteuert werden (Pflum et al., 2001). Zumindest für Klasse (II) Histondeacetylasen gilt, dass auch über die Kontrolle der Kernlokalisierung von Histondeacetylasen die Genexpression geregelt werden kann (Grozinger and Schreiber, 2000; McKinsey et al., 2000a; McKinsey et al., 2000b). Da der *b*-Locus selbst unter der Kontrolle von Hda1 steht, scheint eine Beteiligung aktiver bE/bW-Heterodimere an Derepressionsvorgängen eher unwahrscheinlich.

Die regulatorische *egl1*-Region könnte nach Derepression von einem Transkriptionsaktivator gebunden werden, der möglicherweise Histonacetyltransferase (HAT)-Komplexe an die regulatorischen Regionen leitet. N-Terminale Sequenzen der Histone, die im proximalen Promotorbereich lokalisiert sind, liegen nun hyperacetyliert vor und bilden eine nukleosomale, zugängliche Chromatinstruktur aus. Es kann nun zur Expression des nachgeschalteten Gens kommen. Es wäre spannend zu klären, ob der aktivierte Zustand *b*-abhängiger Gene haploider $\Delta hda1$ -Zellen, dem der natürlichen Situation nach Zellfusion und Ausbildung eines infektiösen Dikaryons entspricht. Bei direkt *b*-abhängigen Genen ist davon

auszugehen, dass die Bindung eines bE/bW-Heterodimers zur Aktivierung der nachgeschalteten Gene führt (J. Kämper, pers. Mitteilung). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es sehr spekulativ zu vermuten, dass bE/bW-Heterodimere in Zusammenspiel mit HAT-Komplexen die Genexpression direkter Zielgene aktivieren könnten.

Die Expression von *dik6* in dikaryotischen Zellen stellt einen besonders interessanten Fall der Genregulation durch Hda1 und das bE/bW-Heterodimer dar. Der fehlende Nachweis von *b*-abhängigen *dik6*-Transkripten in dikaryotischen Δ *hda1*-Zellen zeigt, dass in bestimmten Fällen die Kombination eines bE/bW-Heterodimers mit einer funktionellen Hda1 zur aktivierten Expression führen kann. Eventuell wirkt Hda1 nun im Zusammenspiel mit einem aktiven bE/bW-Heterodimer als Repressor eines Repressors oder als Aktivator der Genexpression. Viele Beispiele belegen, dass eine Inhibierung der HDAC-Aktivität mit einem veränderten Genexpressionsmuster verbunden ist (Bernstein et al., 2000; Chen and Pikaard, 1997; Kim et al., 1999; Schlake et al., 1994; Selker, 1998; Vidal and Gaber, 1991). *RPD3*-Nullmutationen führen in *S.cerevisiae* oder *D.melanogaster* neben Genrepression auch zu einem verstärkten "Silencing" an Telomeren oder anderen Heterochromatinregionen des Genoms (De Rubertis et al., 1996; Rundlett et al., 1996; Sun and Hampsey, 1999). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass der jeweiligen Chromatinstruktur eines HDAC-abhängigen Gens eine entscheidende Bedeutung zukommt, ob Histondeacetylasen zur Genrepression oder Genaktivierung führen. Möglicherweise ist *dik6* im Gegensatz zu anderen *b*-abhängigen Genen im Heterochromatin lokalisiert, was wiederum auch die Hda1-abhängige Aktivierung erklären könnte.

Die Annahme, dass Hda1 als Corepressor agiert und an spezifische Promotoren geleitet wird, findet Unterstützung durch den Befund, dass Hda1 ein Subset an Genen reguliert: Hda1 wirkt in Sporidien als Repressor der Expression von *egl1*, sowie von *hum2*, *ssp1*, *bE*, *bW*, und *dik1*. In *a2*-Stämmen unterliegt zudem das direkt *b*-abhängige Gen *lga2* der Kontrolle durch Hda1 (Reichmann et al., 2002).

Eine limitierte "Array"-Analyse zur Erstellung eines *hda1*-spezifischen Expressionsprofils konnte die Ergebnisse aus Northern-Blot Experimenten für *egl1*, *hum2* und *ssp1* bestätigen. Des Weiteren wurde eine Vielzahl anderer, verfügbarer Gene untersucht. Als besonders interessant stellte sich heraus, dass eine Mutation in *hda1* nicht global zu einer Änderung der Genexpression führt, sondern nur ein spezifisches Set *hda1*-abhängiger Gene betrifft. Weil in diese Untersuchung neben bereits bekannten Genfragmenten zu einem Großteil unbekannte cDNA-Sequenzen einbezogen wurden, die aus einer Mischung eines haploiden Wildtypstammes und eines Stammes, der ein aktives bE/bW-Heterodimer exprimiert, isoliert wurden (A. Brachmann und J. Kämper, pers. Mitteilung), war durchaus zu erwarten, dass weitere *hda1*-regulierte Gene identifiziert werden, die ebenso unter der Kontrolle des aktiven bE/bW-Heterodimers stehen. Überraschenderweise wurden jedoch keine weiteren Gene detektiert, die *hda1*-abhängig exprimiert werden. Allerdings konnte eine gesicherte Aussage nur bei einer signifikant erhöhten Signalstärke gegenüber der Wildtypkontrolle getroffen

werden. Da besonders bei schwachen Signalen z.T. erhebliche Schwankungen auftraten, war der Nachweis einer Änderung im Expressionsprofil nicht möglich. Dies traf bei der Untersuchung der Genexpression der *b*-Gene und *dik1* zu. Erlaubt das eingesetzte Verfahren den Nachweis "schwacher" Transkripte, ist zu erwarten, dass sich die Anzahl der in dieser Arbeit entdeckten, *hda1*-abhängig regulierten Gene erhöhen wird. Diese Annahme basiert zum einen auf Ergebnissen aus *S.cerevisiae*, wo 7,1% der Gene in Abhängigkeit von der Histondeacetylase Rpd3p exprimiert werden (Bernstein et al., 2000). Zum anderen konnte in der hier durchgeführten "Array"-Analyse die Deregulation des *hda1*-abhängigen Gens *mig1* im Gegensatz zu nachfolgenden Experimenten nicht festgestellt werden (Basse et al., 2000; Reichmann et al., 2002; Torreblanca et al., 2002). Offensichtlich kann über eine Optimierung der Technik ein genaueres Expressionsprofil von $\Delta hda1$ -Zellen erstellt werden (J. Kämper, pers. Mitteilung).

Die Histondeacetylase Hda1 stellt bei der Kontrolle der Genexpression eine Komponente eines regulatorischen Komplexes dar, der sowohl regulatorische Gene (*bE/bW*) als auch deren direkte Zielgene wie *dik6* und indirekte Zielgene betrifft. Aber auch weitere Gene, die in diploiden Zellen vermutlich nicht über das *bE/bW*-Heterodimer kontrolliert werden, sondern erst im Laufe der pathogenen Entwicklung in der Pflanze induziert werden, werden durch Hda1 bestimmt (Huber et al., 2002; Torreblanca et al., 2002). Die Vermutung, dass mit Hda1 eine wichtige Komponente der *b*-Regulationskaskade entdeckt wurde, die generell die pathogene Entwicklung bestimmt, erscheint außerordentlich attraktiv. Da auch Rum1 zu einer vergleichbaren Expression einiger *b*-abhängiger Gene führt, ist nicht auszuschließen, dass sich in bestimmten Fällen ein funktioneller Hda1/Rum1-Komplex ausbilden kann, auch wenn dessen Nachweis bislang nicht gelang.

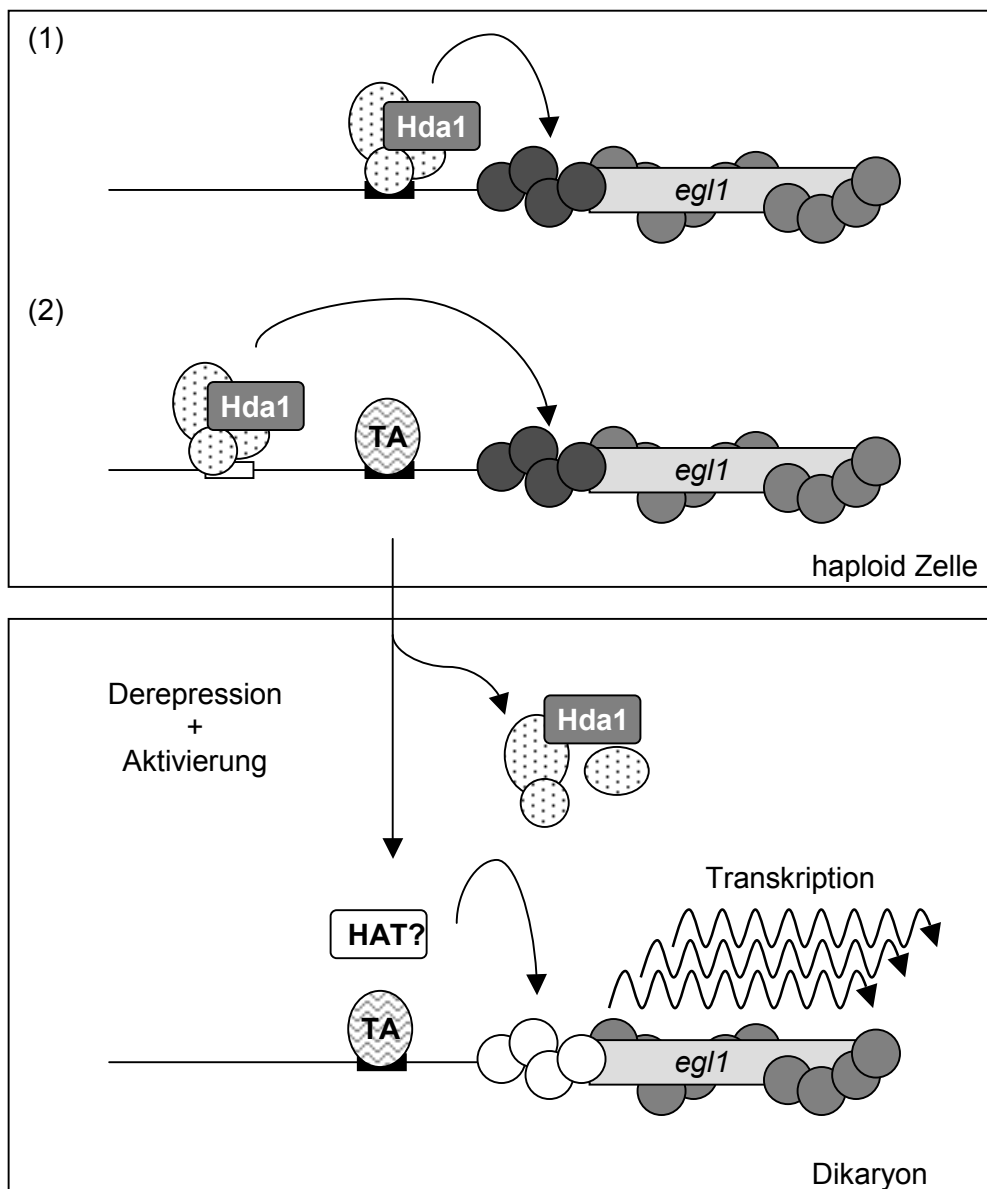


Abb. 19. Modell der Genregulation des *b*-abhängigen Gens *egl1* durch Hda1

(1) Der Hda1-Komplex könnte über einen sequenzspezifisch bindenden Transkriptionsfaktor an Bindestellen (schwarzes Rechteck) eines Transkriptionsaktivators geleitet werden. In einer Konkurrenzreaktion würde dieser verdrängt. (2) Der Hda1-Komplex könnte ein anderes, möglicherweise methyliertes Sequenzmotiv (weißes Rechteck) binden, das in der Nähe zu Bindungssequenzen eines vermuteten Transkriptionsaktivators liegt. In beiden Fällen führt die Lokalisation des Hda1-Komplexes zur Deacetylierung der N-Termini der Histone und zum Aufbau einer weniger zugänglichen Chromatinstruktur (dunkle Kreise). Die Genexpression wird daraufhin reprimiert.

Nach Ausbildung des Dikaryons könnte es im Zuge eines Derepressionsmechanismus zur Auf- oder Ablösung des Hda1-Komplexes kommen. Vermutlich führen Histonacetyltransferase-(HAT)-Komplexe zur Acetylierung von Histonen und zu einer erhöhten Zugänglichkeit des Chromatins im regulatorischen Bereich von *egl1*. Transkriptionsaktivator(en) vermitteln in der Folge die Transkription von *egl1* im Dikaryon.

3.7. $\Delta hda1$ -Stämme bilden Tumore, die keine reifen Teliosporen enthalten

Hda1 ist neben seiner Funktion als Repressor in haploiden Zellen ein für die Vollendung der pathogenen Entwicklung von *U.maydis* in der Pflanze essentielles regulatorisches Protein. Zunächst entwickeln sich $\Delta hda1$ -Stämme nach Infektion von Maispflanzen ohne auffälligen Unterschied zu Wildtypstämmen und führen zur Bildung von Tumoren. Es bilden sich im frühen Infektionsstadium lange filamentöse Zellen. Diese Beobachtungen stimmen mit vergleichbaren Beschreibungen der Entwicklung von *U.maydis* im Tumorgewebe überein (Banuett and Herskowitz, 1996; Quadbeck-Seeger et al., 2000; Snetselaar and Mims, 1994). Nach Infektion mit $\Delta hda1$ -Stämmen werden jedoch keine reifen Teliosporen im Tumorgewebe gebildet. Dieser Phänotyp erinnert stark an die Bildung grüner Tumore, die keine Sporen enthalten, wenn Maispflanzen mit $\Delta rum1$ -Stämmen infiziert werden (Quadbeck-Seeger et al., 2000).

Weiterführende Arbeiten zeigen, dass es sowohl in $\Delta hda1$ als auch in $\Delta rum1$ -Zellen zur Karyogamie kommen kann (Reichmann et al., 2002). Obwohl sich bei vielen Basidiomyceten unmittelbar an die Kernfusion die Meiose anschließt, folgt bei *U.maydis* zunächst eine dazwischen geschaltene mitotische Teilung diploider Zellen (Holliday, 1961; Snetselaar and Mims, 1992; Snetselaar and Mims, 1994). Da in den untersuchten Tumoren keine fragmentierten Hyphen der infektiösen $\Delta hda1$ -Stämme beobachtet werden konnten, während es bei $\Delta rum1$ -Stämmen ähnlich zur Wildtypsituation zur Bildung großer Areale mit "wurmartigen", fragmentierten Hyphen kam, könnte *hda1* den Entwicklungsschritt vor der mitotischen Teilung diploider Zellen bestimmen, *rum1* dagegen spätere Prozesse. Interessanterweise wird auch für $\Delta RPD3$ -Stämme angenommen, dass mitotische Rekombinationsprozesse betroffen sein könnten (Dora et al., 1999). Dennoch zeigen $\Delta hda1$ und $\Delta rum1$ -Stämme ein ähnliches Expressionsmuster, was wiederum die Anwesenheit eines funktionellen Hda1/Rum1-Komplexes während der biotrophen Phase anzeigen könnte (Reichmann et al., 2002). Für Hda1 und Rum1 kann daher gleichermaßen vermutet werden, dass der Entwicklungsblock auf eine Deregulation der Expression eines spezifischen Gensets zurückzuführen ist, dessen zeitliche oder räumliche Expression in $\Delta hda1$ und $\Delta rum1$ -Stämmen die geeignete Entwicklung verhindert. Die Tatsache, dass *hda1* frühe Prozesse auf dem Weg zur Sporenentwicklung betrifft, könnte durch einen von Rum1 unabhängigen Hda1-Komplex erklärt werden, der spezifisch Gene reguliert, die notwendig für die mitotische Kernteilung diploider Zellen sind.

Darüber hinaus könnten Signalverarbeitungsprozesse und/oder Assimilataufnahme in $\Delta hda1$ -Zellen betroffen sein. Analysen regulatorischer Komponenten der cAMP-Kaskade zeigen, dass eine gestörte Verarbeitung von Signalmolekülen zwar zur Tumorentwicklung führen kann, sich aber dort keine Teliosporen ausbilden (Bencina et al., 1997; Kronstad et al., 1998; Krüger, 1999; Küger et al., 2000). Auf Grund der genetischen Interaktion mit *adr1*, das die katalytische Untereinheit der PKA kodiert, wurde das Gen *hgl1* entdeckt, das interessanterweise ebenso an der Sporenbildung von *U.maydis* beteiligt ist. Hgl1 ist

vermutlich ein wichtiges Verbindungsglied der Kreuzungstypkontrolle und der regulatorischen cAMP-Signalkaskade (Dürrenberger et al., 2001). Als vermutete Komponente der b-Regulationskaskade könnten daher Hda1 und die cAMP-abhängige Signaltransduktion gemeinsame Zielgene kontrollieren, die im Verlauf der Sporenentwicklung im Tumorgewebe benötigt werden (Krüger, 1999).

Die Mechanismen, die während der Sporenentwicklung eine kontrollierte Expression spezifischer Gene sicherstellen, scheinen in *S.cerevisiae* und *U.maydis* ähnlich. Daher liegt nahe, die detailliert untersuchte Sporenentwicklung von Ascomyceten zum weiteren Verständnis der Vorgänge bei *U.maydis* heranzuziehen, zumal sowohl *RPD3*-Nullmutanten aus *S.cerevisiae* als auch $\Delta phd1$ -Zellen aus *S.pombe*, wie $\Delta hda1$ -Zellen, die Sporenbildung nicht vollziehen (Kim et al., 1998; Vidal and Gaber, 1991). Erstaunlich dabei ist die Vielzahl und Komplexität regulatorischer Elemente, die in *S.cerevisiae* die Sporenbildung betreffen können. Mindestens 500 der bekannten Hefegene sind direkt oder indirekt an der Sporulation beteiligt und mehr als 1000 Gene zeigen Änderungen in ihrem mRNA-Level (Chu et al., 1998; Mitchell, 1994).

Grundsätzlich könnte die in $\Delta RPD3$ -Stämmen vorliegende Hyperacetylierung pleiotrope Effekte hinsichtlich der Expression der Sporulationsgene, der Kontrolle der Rekombination und der Chromatinstruktur hervorrufen, die dann in Kombination zu einem meiotischen Arrest führen (Hepworth et al., 1998). Vermutlich ist aber Rpd3p eher an spezifischen Prozessen, wie der Vermittlung von Signalen aus der zur Initiierung der Meiose notwendigen DNA-Replikation und der Expressionskontrolle früher und mittlerer meiotischer Gene in diploiden Hefezellen beteiligt (Bowdish and Mitchell, 1993; Lamb and Mitchell, 2001). Diese Kontrolle koordiniert die Entwicklung während der Meiose und der Sporenentwicklung (Clancy, 1998). Da jedoch *hda1* offensichtlich vor der Meiose an mitotischen Kontrollmechanismen beteiligt ist und daraufhin in $\Delta hda1$ -Zellen die Entwicklung stoppt, kann über eine mögliche Rolle von *hda1* bei der Kontrolle meiotischer Prozesse im späteren Verlauf der Sporenbildung nur spekuliert werden.

3.8. Weitere Histondeacetylasen in *U.maydis* und anderen phytopathogenen Pilzen

In *S.cerevisiae* und anderen Modellorganismen sind eine Vielzahl von Histondeacetylasen und ihre biologische Funktion bekannt (Grozinger and Schreiber, 2002). Expressionsanalysen von Hefestämmen, die Mutationen in HDAC-Genen tragen, zeigten, dass Rpd3p vornehmlich die Kontrolle des Zellzyklus beeinflusst, während Hda1p eher am Transport und der Nutzung von C-Metaboliten und Kohlehydraten beteiligt ist, und Sir2p die Aminosäurebiosynthese beeinflusst (Bernstein et al., 2000). Eine neuartige "Microarray"-Technologie ermöglichte sogar die Erstellung genomweiter Enzymaktivitätskarten aller sechs in Hefe vorkommenden Histondeacetylasen (Robyr et al., 2002). Bei dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* sind *HDA1* und *RPD3* an unterschiedlichen Prozessen der Suppression des morphologischen Wechsels beteiligt, vermutlich auf Grund ihrer selektiven Aufgaben bei der Kontrolle der

Genexpression phasenspezifischer Gene (Srikantha et al., 2001). Offenbar ist es ein generelles Phänomen, dass redundante Funktionen der jeweiligen HDAC-Klassen vermieden werden, dagegen "Arbeitsteilung" bevorzugt wird (Peterson, 2002).

Diese Forschung steht in phytopathogenen Pilzen erst am Anfang. HDAC-Gene aus phytopathogenen Pilzen wie *U.maydis* sind derzeit nur noch in *Cochleobolus carbonum* beschrieben (Brosch et al., 2001). Die Histondeacetylase Hdc1 aus *C.carbonum* ist sehr ähnlich zu Hos2p, einer Klasse (I) Histondeacetylase. Ähnlich wie Hda1 ist Hdc1 an der Kontrolle der pathogenen Entwicklung involviert. Während jedoch Hda1 aus *U.maydis* erst zu einem späten Zeitpunkt der pathogenen Entwicklung eingreift, übernimmt Hdc1 eine essentielle Funktion bei frühen Infektionsprozessen (Baidyaroy et al., 2001).

Bislang wurden aus *U.maydis* zwei weitere Gene mit Ähnlichkeit zu Histondeacetylasen kloniert (J. Kämper, pers. Mitteilung). Eine in der Datenbank der "National Library of Medicine" verfügbare DNA-Sequenz kodiert für die putative Histondeacetylase HDAUm (Accession number: AJ133752) und zeigt hohe Ähnlichkeit zu Klasse (I) HDAC-Proteinen (nicht gezeigt). HDAUm weist eine Abfolge von Aminosäureresten auf, die sowohl auf eine nahe Verwandtschaft zu Rpd3p-ähnlichen als auch Hos2p-ähnlichen Histondeacetylasen schließen lassen (nicht gezeigt). Die Beteiligung von HDAUm an der Kontrolle der Pathogenität ist noch nicht abschließend untersucht. Jedoch zeigen vorläufige Analysen der HDAC-Gene, dass sie vermutlich keine redundante Funktion während der Entwicklung von *U.maydis* erfüllen. Die nahe Verwandtschaft von *U.maydis* zu *C.carbonum* legt nahe, dass ebenfalls eine Hos2p-ähnliche Histondeacetylase mit vergleichbarer Funktion während der frühen pathogenen Entwicklung vorliegen könnte (A. Jamnischek und J. Kämper, pers. Mitteilung).

Bereits aus diesen Ergebnissen wird klar, dass Histondeacetylasen eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der pathogenen Entwicklung einnehmen. Obwohl bislang keine weiteren Kenntnisse über den Aufbau von HDAC-Komplexen in phytopathogenen Pilzen vorliegen, zeigt besonders die Vielzahl der in dieser Arbeit isolierten Stämme mit EG-Aktivität, dass weitere Faktoren an der Repression von *b*-abhängigen Genen beteiligt sein könnten. Neben Rum1 konnten bislang aus diesen Ansätzen zwei weitere regulatorische Gene identifiziert werden.

Eine vorläufige Komplementationsanalyse der Mutante MR8-1 zeigte, dass eine Mutation im Gen *dial* vorliegen könnte (K. Stahl, pers. Mitteilung). Die Sequenzanalyse eines komplementierenden genomischen Fragments führte zur Vermutung, dass *dial* ein kleines, sequenzspezifisch bindendes HMG-Protein kodiert. Die größte Ähnlichkeit in der HMG-Box besitzt Dial1 zu den HMG1/2-Proteinen Nhp6Ap und Nhp6Bp aus *S.cerevisiae* (Paull et al., 1996), die Chromatinstrukturen verändern und den Aufbau von Protein-DNA Komplexen stimulieren (Grosschedl et al., 1994). Nhp6Ap und Nhp6Bp ähneln in ihrer HMG-Domäne dem Transkriptionsrepressor Sin1 aus Hefe (Lefebvre and Smith, 1993). Dieses Protein stabilisiert zum Einen die Chromatinstruktur durch Interaktion mit Histonen, zum Anderen

interagiert es mit dem SWI/SNF-Komplex, der Nukleosomen aus dem Chromatin entfernen kann und dadurch die Transkription reguliert (Perez-Martin and Johnson, 1998). Der Einfluss eines sequenzspezifisch DNA-bindenden HMG-Proteins wie Dia1 auf die Expression von *egl1* ist noch nicht untersucht, aber auf Grund der Funktion von HMG-Proteinen beim Aufbau der Chromatinstruktur möglich. Eventuell ist Dia1 auch eine Komponente des hochmolekularen Hda1-Komplexes.

MR1-1 Kolonien zeigen einen interessanten Phänotyp und exprimieren *egl1*. Wahrscheinlich als Antwort auf unterschiedliche, nicht charakterisierte Mediensignale entwickeln haploide Zellen Filamente oder zeigen einen dunklen Koloniephänotyp, der stark an MR9-1-Zellen erinnert. Die molekulare Analyse ergab, dass eine Mutation im Gen *roe1* vorliegt (nicht gezeigt). *roe1* kodiert für eine putative Serin/Threonin-Kinase und ist homolog zu Ypk1p und Ypk2p aus Hefe (Chen et al., 1993). Ypk1p und Ypk2p sind homologe, essentielle Proteinkinasen der *PKC* β -abhängigen MAP Kinase Kaskade und könnten als Verbindungsglied an der Sphingolipid-vermittelten Signalübertragung und Kontrolle der Zellintegrität beteiligt sein (Hunter and Plowman, 1997; Schmelzle et al., 2002; Sun et al., 2000). *Roe1* könnte demnach in *U.maydis* in vergleichbare Signalprozesse eingeordnet werden. Interessanterweise sind Δ *roe1*-Stämme stark in ihrer pathogenen Entwicklung gestört (K. Stahl, pers. Mitteilung).

Mit dem Abschluss der Genomsequenzierung von *U.maydis* stehen die nötigen Sequenzinformationen möglicher Kandidatengene zur Verfügung, die in Anlehnung an andere Systeme bei der Ausbildung des Hda1-Komplexes beteiligt sein könnten. Zudem sind die in *U.maydis* vorliegenden HDAC-Gene verfügbar. In Kombination mit den in dieser Arbeit hergestellten Mutanten mit EG-Aktivität könnten neue, essentielle Komponenten des Hda1-Komplexes und weiterer HDAC-Komplexe identifiziert werden, die an der b-Regulationskaskade und pathogenen Entwicklung von *U.maydis* beteiligt sind.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden bei folgenden Firmen bezogen: Amersham, J.T. Baker, BioRad, Boehringer, BRL, Difco, Mallinckrodt, Merck, Pharmacia, Riedel-de Haën, Roth, SeaKem, Serva und Sigma. Enzyme und bioaktive Substanzen stammten von Boehringer, Eurogentech, Gibco, New England Biolabs, Novo Nordisc, Pharmacia und Stratagene. Für Standard-PCR's wurden Laborpräparationen der Taq DNA-Polymerase verwendet (G. Weinzierl und A. Brachmann, pers. Mitteilung).

4.2. Sonstige Materialien

BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Dialysefilter VSPW 0,025 μm (Millipore), Elektroporationsküvetten 0,2 cm (BioRad), Filterpapier 3MM (Whatman), GigaPrep (Qiagen) zur Aufreinigung von DNA im Milligrammbereich, MaxiPrep (Qiagen), Glasperlen 150-212 μm Durchmesser (Sigma), MicroSpin S-300 Säulen (Pharmacia bzw. MoBiTek), Nylonfilter Biodyne B (Pall) oder Hybond N+ (Amersham), Papierfilter (S&S 595), Petrischalen (Sarstedt, Greiner), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Sarstedt, Greiner), JetSorb (Genomed), JetQuick (Genomed), JetStar (Genomed), RNeasy Kit (Qiagen) zur Präparation hochreiner Gesamt-RNA, Röntgenfilme CEA RP (CEA) und Kodak X-omat XAR-5 (Kodak), Sepharose-Protein-A/G zur Immunpräzipitation von Antikörperkomplexen (Sigma), Sterilfilter 0,22 μm (Millipore), Thermalpapier (Hitachi), TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten.

4.3. Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Tab. 9. *Escherichia coli*

Stamm	relevante Marker	Referenz
DH5 α	F ⁺ , <i>endA1</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>sup44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>lacZ</i> Δ M15	(Hanahan, 1985)
TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
NM514	<i>hsdR</i> , <i>argH</i> , <i>galE</i> , <i>galX</i> , <i>strA</i> , <i>lycB7</i> , (<i>Hfl⁺</i>)	Amersham

Die Nomenklatur von *E.coli* Stämmen richtet sich nach (Demerec et al., 1966). DH5 α und TOP10 wurden für Klonierungen verwendet. λ gt10 Derivate wurden im Stamm NM514 propagiert.

Tab. 10. *Saccharomyces cerevisiae*

Stamm	relevante Marker	Referenz
EGY48	MAT α , <i>ura3</i> , <i>his3</i> , <i>trp1</i> , LexA((<i>op(x6)</i>)-LEU2	(Gyuris et al., 1993)

EGY48 wurde in Zwei-Hybrid-Experimenten zur Bestimmung von Proteinwechselwirkungen eingesetzt.

Tab. 11. *Ustilago maydis*

Stamm	Genotyp	Referenz
FB1	<i>al b1</i>	(Banuett and Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	(Banuett and Herskowitz, 1989)
FBD11	<i>al a2 b1 b2</i>	(Banuett and Herskowitz, 1989)
FB1M#2	<i>al b1 M#2 (rum1)</i>	(Quadbeck-Seeger, 1998)
FB1 Δ <i>rum1</i>	<i>al b1 Δrum1-1</i>	(Quadbeck-Seeger, 1998)
FB2 Δ <i>rum1</i>	<i>a2 b2 Δrum1-1</i>	(Quadbeck-Seeger, 1998)
CL13	<i>al bE1 bW2</i>	(Bölker et al., 1995b)
SG200	<i>al mfa2 bE1 bW2</i>	(Bölker et al., 1995b)
MR1-1	<i>al b1 M#1 (roe1)</i>	diese Arbeit
MR2-1	<i>al b1 M#2</i>	diese Arbeit
MR6-1	<i>al b1 M#6</i>	diese Arbeit
MR7-1	<i>al b1 M#7</i>	diese Arbeit
MR8-1	<i>al b1 M#8 (dia1)</i>	diese Arbeit
MR9-1	<i>al b1 M#9 (hda1)</i>	diese Arbeit
MR10-1	<i>al b1 M#10</i>	diese Arbeit
MR11-1	<i>al b1 M#11</i>	diese Arbeit
MR12-1	<i>al b1 M#12</i>	diese Arbeit
MR15-1	<i>al b1 M#15</i>	diese Arbeit
MR17-1	<i>al b1 M#17</i>	diese Arbeit
MR18-1	<i>al b1 M#18</i>	diese Arbeit
MR19-1	<i>al b1 M#19</i>	diese Arbeit
MR20-1	<i>al b1 M#20</i>	diese Arbeit
MR21-1	<i>al b1 M#21</i>	diese Arbeit
MR23-1	<i>al b1 M#23</i>	diese Arbeit
MR24-1	<i>al b1 M#24</i>	diese Arbeit
MR25-1	<i>al b1 M#25</i>	diese Arbeit
MR26-1	<i>al b1 M#26</i>	diese Arbeit
MR27-1	<i>al b1 M#27</i>	diese Arbeit
MR28-1	<i>al b1 M#28</i>	diese Arbeit
MR29-1	<i>al b1 M#29</i>	diese Arbeit
MR30-1	<i>al b1 M#30</i>	diese Arbeit
MR31-1	<i>al b1 M#31</i>	diese Arbeit
MR3	<i>a2 b2 Δhda1</i>	diese Arbeit
MR11	<i>al b1 Δhda1</i>	diese Arbeit
MR16	<i>al b1 P_{crg1}::hda1</i>	diese Arbeit
MR17	<i>a2 b2 P_{crg1}::hda1</i>	diese Arbeit
MR36	<i>al b1 hda1::P_{crg1}-bE1</i>	diese Arbeit
MR42	<i>a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1</i>	diese Arbeit
MR47	<i>al b1 Δhda1 pHda1-cbx</i>	diese Arbeit
MR48	<i>al b1 Δhda1 pHda1myc6°-cbx</i>	diese Arbeit
MR49	<i>al b1 Δrum1-1 pRum1</i>	diese Arbeit
MR50	<i>al b1 Δrum1-1 pRum1-flag2°</i>	diese Arbeit
MR51	<i>al b1 Δrum1-1 pRum1-flag4°</i>	diese Arbeit
MR52	<i>al b1 Δrum1-1 pRum1-flag8°</i>	diese Arbeit
MR53	<i>al b1 Δrum1-1 pRum1-flag8°*</i>	diese Arbeit
MR54	<i>al b1 Δrum1-1 pRum1-myc6°*</i>	diese Arbeit

MR55	<i>a1 b1 Δrum1-1 pGE79</i>	diese Arbeit
MR56	<i>a1 b1 M#9 p9-1#14</i>	diese Arbeit
MR57	<i>a1 b1 M#9 pHda1-myc6°</i>	diese Arbeit
MR58	<i>a1 b1 M#9 pHda1-flag8°</i>	diese Arbeit
MR59	<i>a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1 myc6°-cbx pRum1-flag4°</i>	diese Arbeit
MR60	<i>a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1myc6°-cbx pRum1-myc6°</i>	diese Arbeit
MR61	<i>a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1myc6°-cbx pRum1</i>	diese Arbeit
MR62	<i>a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1-cbx pRum1-flag4°</i>	diese Arbeit
MR63	<i>a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1 myc6°-cbx pRum1-flag4°</i>	diese Arbeit
MR64	<i>a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1myc6°-cbx pRum1-myc6°</i>	diese Arbeit
MR65	<i>a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1myc6°-cbx pRum1</i>	diese Arbeit
MR66	<i>a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1-cbx pRum1-flag4°</i>	diese Arbeit
MR67	<i>a1 b1 rum1-myc6°</i>	diese Arbeit
MR70	<i>a1 b1 rum1-flag8°</i>	diese Arbeit
MR73	<i>a2 b2 rum1-myc6°</i>	diese Arbeit
MR76	<i>a2 b2 rum1-flag8°</i>	diese Arbeit
MR105	<i>a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1myc6°-cbx</i>	diese Arbeit
MR107	<i>a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1</i> <i>pHda1myc6°-cbx</i>	diese Arbeit
MR110	<i>a1 b1 Δrum1-1 pHda1myc6°-cbx</i>	diese Arbeit

Zur einfachen Unterscheidung werden MR-Stämme aus der UV-Mutagenese mit einem Zusatz (-1) bezeichnet. Alle MR-Stämme, die durch homologe Integration von Fremd-DNA erzeugt wurden, wurden im Southern-Verfahren überprüft. MR-Stämme, die frei replizierende Vektoren tragen, wurden auf entsprechenden, Antibiotika-haltigen Medien propagiert. Bei der Beschreibung des jeweiligen Genotyps nicht integrativer Transformanden sind die eingesetzten Plasmide aufgeführt.

Tab. 12. Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Stamm	Bezugsquelle
Early Golden Bantam	Olds Seed Company, Madison, WI
Gaspar Flint	BEN BURR; Brookhaven

4.4. Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Im Regelfall ist für die im Folgenden beschriebenen Plasmide die genaue DNA-Sequenzabfolge bekannt oder wurde in dieser Arbeit ermittelt. Die jeweiligen Fragmentlängen können deshalb exakt angegeben werden. Bei manchen, funktionellen Plasmidensequenzen wurde jedoch auf eine vollständige Bestimmung der Basenabfolge verzichtet, so dass die Größe der zur Herstellung weiterer Genkonstrukte verwendeten Restriktionsfragmente auf Agarosegelen abgeschätzt wurde. In diesen Fällen liegen kb-Angaben vor. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Plasmide in dieser Arbeit erstellt.

4.4.1. Allgemeine Vektoren

p0508964 (C. Quadbeck-Seeger, pers. Mitteilung) ist ein Derivat von p2410951, das ein 6,9 kb *EcoRI/NotI rum1*-Fragment trägt und ein funktionelles Rum1 kodiert.

p2410951 (C. Quadbeck-Seeger, pers. Mitteilung) trägt ein 11,0 kb *Bg/III*-Fragment aus dem Cosmid 7H2, welches den kompletten Leserahmen von *rum1* umfasst und in die *Bg/III*-Schnittstelle von pSL1180 eingesetzt wurde.

pB42AD (Gyuris et al., 1993) ist ein 6449 bp langes, in *S.cerevisiae* frei replizierendes Plasmid, das eine B42-Transaktivierungsdomäne zur Fusion mit Zielproteinen kodiert und in Zwei-Hybrid-Experimenten eingesetzt wird.

pBluescript II SK⁺ (Stratagene) diente zur Klonierung und Sequenzierung.

pBSerg1p-Nde (Brachmann, 2001) ist ein Derivat von pBluescript II SK⁺ und trägt ein 3522 bp *crg1*-Fragment.

pCM54 (Tsukuda et al., 1988) In die *SspI*-Schnittstelle von pHL1 wurde ein 383 bp *SspI*-Fragment inseriert, das eine autonom replizierende Sequenz von *U.maydis* (UARS) trägt.

pCK152 (C. Koch, pers. Mitteilung) enthält ein 265 bp *BamHI*-Fragment, das für ein Hexa-Myc-Epitop kodiert.

pCR-Topo (Invitrogen) wurde zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität verwendet.

pCM54 (Tsukuda et al., 1988) ist ein frei replizierendes Plasmid, das eine Hygromycin-Resistenzkassette und eine UARS (*Ustilago* autonomously replicating sequence) enthält.

pDB-E1₁₋₄₇₃ (A. Jamnischek, pers. Mitteilung) kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus der *lexA*-DNA-Bindedomäne und *bE1₁₋₄₇₃*.

pDik1c (Bohlmann, 1996) ist ein Derivat von pBluescript II SK⁺, das eine 820 bp cDNA von *dik1*, als *EcoRI*-Fragment in die *EcoRI*-Schnittstelle kloniert, trägt.

pDik6c (Bohlmann, 1996) enthält eine 1,5 kb cDNA von *dik6*, kloniert als *EcoRI*-Fragment in die *EcoRI*-Schnittstelle von pBS.

pE1₁₃₆-GA (Kämper et al., 1995) enthält die variable Region von *bE1* als Fusion mit der Gal4p-Aktivierungsdomäne.

pEG1 (Schauwecker et al., 1995) ist ein pTZ18R-Derivat und trägt das genomische *egl1*-Gen, welches als 3,6 kb *EcoRI*-Fragment in die entsprechende Restriktionsschnittstelle des Vektors kloniert wurde.

pflag1^o ist ein pSL1180-Derivat und trägt die gepaarten Oligonukleotide f1 und f2 an den *XmaI/XhoI*-Schnittstellen des Polylinkers.

pflag2^o ist ein Derivat von pflag1^o. Ein *AgeI/XmnI*-Fragment aus pflag1^o wurde mit einem *XmaI/XmnI*-Fragment aus pflag1^o verbunden. *flag*-Sequenzen wurden somit dupliziert.

pflag4^o ist ein Derivat von pflag2^o. Ein *AgeI/XmnI*-Fragment aus pflag2^o wurde mit einem *XmaI/XmnI*-Fragment aus pflag2^o verbunden. *flag*-Sequenzen wurden auf diese Weise vervierfacht.

pflag5^o ist ein Derivat von pflag4^o und pflag1^o. Ein *AgeI/XmnI*-Fragment aus pflag4^o wurde mit einem *XmaI/XmnI*-Fragment aus pflag1^o verbunden. *flag*-Sequenzen wurden auf diese Weise verfünffacht.

pflag6° ist ein Derivat von pflag4° und pflag2°. Ein *AgeI/XmnI*-Fragment aus pflag4° wurde mit einem *XmaI/XmnI*-Fragment aus pflag2° verbunden. *flag*-Sequenzen wurden auf diese Weise versechsfacht.

pflag8° ist ein Derivat von pflag4°. Ein *AgeI/XmnI*-Fragment aus pflag4° wurde mit einem *XmaI/XmnI*-Fragment aus pflag4° verbunden. *flag*-Sequenzen wurden auf diese Weise verachtffacht.

pGE79 (G. Weinzierl, pers. Mitteilung) ist ein in *U.maydis* frei replizierendes Plasmid, das eine UARS trägt und Resistenz gegenüber Phleomycin vermittelt.

pHind700 (Wösten et al., 1996) trägt einen 700 bp Subklon von *rep1*, als *HindIII*-Fragment in pUC19 kloniert.

pJBbE1 (Bergemann, 1993) enthält ein Intron-freies *bE1*-Gen, kloniert als *NdeI/BamHI*-Fragment.

pJBbW2 (Bergemann, 1993) enthält ein Intron-freies *bW2*-Gen, kloniert als *NdeI/BamHI*-Fragment. Die *NdeI*-Schnittstelle liegt im Start-Codon, wobei für das *bW2*-Gen ein ATG-Codon gewählt wurde, das 57 bp unterhalb des wahrscheinlich verwendeten Starts liegt (Kämper et al., 1995).

plexA (Gyuris et al., 1993) ist ein 10166 bp langes, in *S.cerevisiae* frei replizierendes Plasmid, das eine *lexA*-DNA-Bindedomäne zur Fusion mit Zielproteinen kodiert und in Zwei-Hybrid-Experimenten eingesetzt wird.

pNB11000 ist ein Derivat von p2410951, aus dem ein 6624 bp *NcoI*-Fragment entfernt wurde. pNB11000 enthält 1,9 kb der 3'-Region von *rum1*.

pNEB193 (New England Biolabs) diente als allgemeiner Klonierungsvektor.

pPpi (Bohlmann, 1996) ist ein pUC19-Derivat, welches ein 112 bp *PstI-SalI*-Fragment des Peptidyl Prolyl Isomerase (*ppi*) Gens aus *U.maydis* enthält.

pREMI^{on-off} ist ein Derivat von pSMUT, das zusätzlich ein 890 bp *BamHI-HindIII*-Fragment des *otef*-Promotors trägt. Während REMI wurde das Plasmid an der singulären *BamHI*-Schnittstelle linearisiert.

pRep/ORF (Bohlmann, 1996) ist ein pUC19-Derivat, das den offenen Leserahmen von *hum2* unter der Kontrolle des *rep1*-Promotors trägt. Mittels PCR wurden *SphI*-Schnittstellen vor dem ATG und dem Stop beider Gene generiert. Nach Deletion des Leserahmens von *rep1* wurde der gesamte Leserahmen von *hum2* als *SphI*-Fragment mit dem *rep1*-Promotor fusioniert.

pRum1 diente zur Expression des Rum1-Proteins in *U.maydis*. In einer 4-Fragment Ligationsreaktion wurden ein 5,4 kb *BamHI/SacI*-Fragment von pGE79, ein 2,0 kb *KpnI/SacI*-Fragment aus pSLble(+), ein 8536 bp *BglII/XmaI*-Fragment aus p2410951 und ein 2,5 kb *XmaI/KpnI*-Fragment aus p2410951 verbunden. MR49 (*al b1 Δrum1-1 pRum1*) trägt pRum1 und zeigte keine EG-Aktivität.

pSKII-HM (T. Walter, pers. Mitteilung) ist ein Derivat von pCK152 mit einem modifizierten Polylinker und kodiert ein Hexa-Myc-Epitop.

pSL1180 (Pharmacia) ist ein allgemeiner Klonierungsvektor.

pSLble(+) (Brachmann, 2001) enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2407 bp *NotI*-Fragment aus pUTHsp70Not in pSL1180. Das *ble*-Gen wird von einem *hsp70*-Promotor aus *U.maydis* und einem *trpC*-Terminator aus *A.nidulans* flankiert.

pSLhyg(+) (Brachmann, 2001) enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2896 bp *NotI*-Fragment aus pbE1-k-W2 in pSL1180. Das *hph*-Gen wird von einem *hsp70*-Promotor und einem *hsp70*-Terminator aus *U.maydis* flankiert.

pSLotef (A. Bottin, pers. Mitteilung) trägt den *otef*-Promotor als 890 bp *BamHI-HindIII*-Fragment, das in die *StuI*-Schnittstelle von pSL1180 eingesetzt wurde.

pSMUT (Bölker et al., 1995a) ist ein REMI-Plasmid, das eine Hygromycin-Resistenzkassette trägt.

pSS1 (X. Boergen, pers. Mitteilung) ist ein in *U.maydis* frei replizierendes Plasmid, das eine UARS trägt und Resistenz gegenüber Carboxin vermittelt.

pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985) ist ein allgemeiner Klonierungsvektor.

pUCbE1häm (J. Kämper, pers. Mitteilung) ist ein pUC19-Derivat, das ein 820 bp *XbaI/KpnI*-Fragment von *bE1* in translationaler Fusion mit einem HA-Epitop trägt.

pW2₆₂₃-GA (Kämper et al., 1995) enthält die variable Region von *bW2* als Fusion mit der Gal4p-Aktivierungsdomäne.

4.4.2. DNA-Bibliotheken für *U.maydis*

λgt10 cDNA-Bank von *U.maydis* (Schauwecker et al., 1995) wurde ausgehend von dem *U.maydis* Stamm FBD11 angefertigt.

U.maydis wurde für 48 h bei 22°C auf aktivkohlehaltigen CM-Platten kultiviert. Anschließend wurde poly (A)+ RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurden an die cDNA *EcoRI*-Linker (GGAATTCC, Biolabs) angefügt. Alle Fragmente größer als 0,7 kb wurden aus einem Agarose-Gel eluiert, mit einem cDNA Klonierungs Kit (Amersham, RPN 1257) nach Ligation an λgt10-Arme in Phagenproteine verpackt und im *E.coli* Stamm NM514 amplifiziert.

pCM54 genomische DNA-Bank von *U.maydis* (Bauchwitz and Holloman, 1990) enthält etwa 8,0 kb lange, partiell mit *Sau3A* behandelte genomische Fragmente, die in den mit *BamHI* linearisierten frei replizierenden Vektor pCM54 eingesetzt wurden.

4.4.3. Genomische Subklone von *hda1*

p9-1#14 wurde als ein die EG-Aktivität des Stammes MR9-1 komplementierender Plasmidklon isoliert und stammt aus einer frei replizierenden genomischen Plasmidbank (Bauchwitz and Holloman, 1990). Neben *hda1* trägt p9-1#14 zwei weitere offene Leserahmen (ORF1, ORF3) mit unbekannter Funktion.

pHda1-cbx ist ein Derivat des in *U.maydis* frei replizierenden Vektors pSS1 (Laborpräparat), der als *HindII/BamHI*-Fragment mit einem 4378 bp *BamHI/NcoI*-Fragment aus p9-1#14 und mit einem 1997 bp *NcoI/HindIII*-Fragment aus p9-1#14 verbunden wurde. Das 6375 bp *hda1*-Fragment komplementiert die EG-Aktivität von MR9-1. Die im Fragment des *hda1*-Locus aus p9-1#14 enthaltenen weiteren Leserahmen ohne bekannte Funktion wurden dabei teilweise deletiert.

pKB7260 ist ein Derivat von pΣ5, der mit *KpnI* und *NcoI* linearisiert und mit einem 1319 bp *KpnI/NcoI* *hda1*-Fragment aus p9-1#14 verbunden wurde. Das Plasmid enthält das 3'-Ende des Leserahmens und weitere 3'-Sequenzen von *hda1*.

pNA4272 trägt ein 1853 bp *NsiI/AscI*-Fragment aus p9-1#14, das mit dem *PstI/AscI*-geschnittenen Klonierungsvektor pNEB193 verbunden wurde. Das klonierte Fragment entspricht der 5'-Region von *hda1*.

pNNΔBgl trägt 3386 bp *NcoI/BgIII*-Fragment aus p9-1#14, das mit einem 3085 bp *BgIII/NotI*-Fragment aus p9-1#14 verbunden und in den *NcoI/NotI*-geschnittenen Klonierungsvektor pSL1180 eingesetzt wurde. Dabei wurde ein 1086 bp langes *hda1*-Fragment deletiert.

pΣ1 ist ein pNEB193-Derivat und enthält ein 543 bp *BssHIII*-Fragment des *hda1*-Locus, das in die *AscI*-Schrittstelle der multiplen Klonierungsstelle eingesetzt wurde.

pΣ2 ist ein pNEB193-Derivat und enthält ein 872 bp *BssHIII*-Fragment des *hda1*-Locus, das in die *AscI*-Schrittstelle der multiplen Klonierungsstelle eingesetzt wurde.

pΣ3 ist ein pNEB193-Derivat und enthält ein 1168 bp *BssHIII*-Fragment des *hda1*-Locus, das in die *AscI*-Schrittstelle der multiplen Klonierungsstelle eingesetzt wurde.

pΣ4 ist ein pNEB193-Derivat und enthält ein 1349 bp *BssHIII*-Fragment des *hda1*-Locus, das in die *AscI*-Schrittstelle der multiplen Klonierungsstelle eingesetzt wurde.

pΣ5 ist ein pNEB193-Derivat und enthält ein 1639 bp *BssHIII*-Fragment des *hda1*-Locus, das in die *AscI*-Schrittstelle der multiplen Klonierungsstelle eingesetzt wurde.

pΣ6 ist ein pNEB193-Derivat und enthält ein 1844 bp *Bss*HIII-Fragment des *hda1*-Locus, das in die *Asc*I-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle eingesetzt wurde.

4.4.4. cDNA Subklone von *hda1*

pc6-1 ist ein pCR-Topo Derivat und trägt ein 916 bp cDNA-Fragment von *hda1*, das in einer PCR mit 100 ng DNA der λgt10 cDNA-Bank (Schauwecker et al., 1995) als Matrize und den Oligonukleotiden mic19 und mic20 amplifiziert wurde.

pCHda1-1 trägt ein 1,5 kb *Eco*RI-Fragment eines λ-Phagens der *U.maydis* cDNA-Bank (Schauwecker et al., 1995), der mit Hilfe einer *hda1*-Sonde detektiert wurde. Das Fragment repräsentiert den 3'-Anteil eines *hda1*-Transkripts und wurde in die *Eco*RI-Schnittstelle von pBluescript II SK⁺ eingesetzt.

pCHda1-6 trägt ein 0,8 kb *Eco*RI-Fragment eines λ-Phagens der *U.maydis* cDNA-Bank (Schauwecker et al., 1995), der mit Hilfe einer *hda1*-Sonde detektiert wurde. Das Fragment repräsentiert den 5'-Anteil eines *hda1*-Transkripts und wurde in die *Eco*RI-Schnittstelle von pBluescript II SK⁺ eingesetzt.

4.4.5. Konstrukte zur homologen Integration in den *hda1*-Locus

pKOhda1 wurde zur Disruption von *hda1* mittels Gen-Austausch in einer 5-Fragment Ligation erzeugt. Der *Pst*I/*Asc*I geschnittene Klonierungsvektor pNEB193 wurde mit einem 1795 bp *Nsi*I/*Sal*I-Fragment aus p9-1#14, mit einem 2659 bp *Xho*I/*Hind*III-Fragment aus pSLhyg(+), mit einem 298 bp *Hind*II/*Nco*I-Fragment aus pSL1180 und mit einem 2397 bp *Nco*I/*Asc*I-Fragment aus p9-1#14 zu pKOhda1 verbunden. Dabei wurde ein 2256 bp *Sal*I/*Bam*HI Fragment des ursprünglichen *hda1*-Locus durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt und der Leserahmen von *hda1* bis auf 6 bp des 5'-Endes entfernt. Das Plasmid pKOhda1 wurde vor der Transformation mit *Asc*I linearisiert. Die genomische DNA der Transformanden wurde mit *Bam*HI restringiert und im Southern-Blot mit einem 1086 bp *Bg*III-Fragment aus p9-1#14 hybridisiert. Im Falle eines Gen-Austauschs wurde anstatt der 5072 bp Bande des intakten Gens eine 5755 bp Bande detektiert.

pREHda1 ist ein Derivat von pKOhda1 und wurde zur Insertion regulatorischer *crg1*-Sequenzen an den *hda1*-Locus in einer 5-Fragment Ligation erstellt. pKOhda1 wurde über *Not*I/*Bam*HI linearisiert und mit einem 2908 bp *Not*I/*Bst*BI-Fragment aus pBScrg1p-Nde, mit einem 711 bp *Bst*BI/*Sal*I-Fragment aus pBScrg1p-Nde, mit einem 1550 bp *Sal*I/*Nco*I-Fragment aus pHda1-cbx und mit einem 694 bp *Nco*I/*Bam*HI-Fragment aus pHda1-cbx verbunden. Das Plasmid pREHda1 wurde vor der Transformation mit *Ssp*I linearisiert. Die genomische DNA der Transformanden wurde mit *Bam*HI restringiert und im Southern-Blot mit einem 1086 bp *Bg*III-Fragment aus p9-1#14 hybridisiert. Im Falle eines Gen-Austauschs wurde anstatt der 5072 bp Bande des intakten Gens eine 2256 bp Bande detektiert. Die erzeugten Stämme MR16 (*a1 b1 P_{crg1}::hda1*) und MR17 (*a2 b2 P_{crg1}::hda1*) zeigten unter induzierenden Bedingungen auf Arabinose-haltigen CMC-Medien keine EG-Aktivität. Auf CMC-Medien, die Glukose enthielten, wiesen MR16 und MR17 EG-Aktivität auf.

pKIRE ist ein Derivat von pREHda1 und wurde zur Integration eines unter der Kontrolle regulatorischer *crg1*-Sequenzen stehenden *bE1*-Gens in den *hda1*-Locus erzeugt. Ein 11825 bp *Bst*BI/*Bam*HI-Fragment von pREHda1 wurde mit einem 1353 bp *Bst*BI/*Xba*I-Fragment aus pBScrg1p-Nde, mit einem 820 bp *Xba*I/*Kpn*I-Fragment aus pUCbE1häm und mit einem 2213 bp *Kpn*I/*Bam*HI-Fragment aus pREHda1 verbunden. Das Plasmid pKIRE wurde vor der Transformation mit *Ssp*I linearisiert. Die genomische DNA der Transformanden wurde mit *Mlu*I restringiert und im Southern-Blot mit einem 2821 bp *Mlu*I-Fragment aus p9-1#14 hybridisiert. Im Falle eines Gen-Austauschs wurde anstatt der 2821 bp Bande des intakten Gens eine 4170 bp und eine 6431 bp Bande detektiert. Die erzeugten Stämme MR36 (*a1 b1 hda1::P_{crg1}-bE1*) und MR42 (*a2 b2 hda1::P_{crg1}-bE1*) zeigten EG-Aktivität. Nach Wachstum

auf CMC-Medien, die Arabinose enthielten, wurden in einer Western-Analyse des Stammes MR36 bE1-HA Proteine nachgewiesen.

4.4.6. Fusionskonstrukte

pB42AD-Hda1 diente zur Expression eines Hda1-Proteins in *S.cerevisiae*, das an seinem N-Terminus eine B42 Aktivierungsdomäne trägt. Es wurde ein 6437 bp *EcoRI/XhoI*-Fragment aus pB42AD, ein 72 bp *EcoRI/AscI*-Fragment aus plexA-Hda1 und ein 1521 bp *AscI/SalI*-Fragment aus plexA-Hda1 verbunden. Die B42AD-Hda1 Fusion steht unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors aus Hefe und wird von einem *ADHI*-Terminator aus Hefe begrenzt.

pB42AD-Rum1 diente zur Expression eines Rum1-Proteins in *S.cerevisiae*, das an seinem N-Terminus eine B42 Aktivierungsdomäne trägt. Es wurde ein 5947 bp *EcoRI/NotI*-Fragment aus pB42AD und 6,9 kb *EcoRI/NotI*-Fragment aus p0508964 verbunden. Die B42AD-Rum1 Fusion steht unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors aus Hefe.

pflag2°-rum1-3' ist ein Derivat von p2410951. Der über *XmaI/EcoRI* linearisierte Vektor wurde mit einem 86 bp *AgeI/EcoRI*-Fragment aus pflag2° verbunden.

pflag4°-rum1-3' ist ein Derivat von p2410951. Der über *XmaI/EcoRI* linearisierte Vektor wurde mit einem 154 bp *AgeI/EcoRI*-Fragment aus pflag4° verbunden.

pflag8°-rum1-3' ist ein Derivat von p2410951. Der über *XmaI/EcoRI* linearisierte Vektor wurde mit einem 284 bp *AgeI/EcoRI*-Fragment aus pflag8° verbunden.

pKHda1flag8° stellt ein Derivat von pKB7260 dar. In den mit *NcoI* restringierten und anschließend mit Klenow-Polymerase behandelten Vektor wurde ein ebenfalls mit Klenow-Polymerase behandeltes 335 bp *XmaI/StuI*-Fragment aus pflag8° eingesetzt.

pKHda1myc6° stellt ein Derivat von pKB7260 dar. In den mit *NcoI* restringierten und anschließend mit Klenow-Polymerase behandelten Vektor wurde ein ebenfalls mit Klenow-Polymerase behandeltes 265 bp *NotI/TaqI*-Fragment aus pCK152 eingesetzt.

pHda1-flag8° wurde zur Expression eines Hda1-Fusionsproteins erstellt, das am C-Terminus von Hda1 ein 8-faches FLAG-Epitop trägt. Das Plasmid enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette und eine UARS zur freien Replikation in *U.maydis*. Es wurde der 11,5 kb *NotI/AscI*-geschnittene Vektor p9-1#14 mit einem 1215 bp *AscI/NsiI* *hda1*-Fragment aus p9-1#14, mit einem 1,5 kb *NsiI/EcoRI*-Fragment aus pKHda1flag8° und mit einem 2083 bp *EcoRI/NotI*-Fragment aus p9-1#14 verbunden. pHda1-flag8 kodiert eine funktionelle Hda1 und komplementiert die EG-Aktivität von MR9-1 (MR58).

pHda1-myc6° wurde zur Expression eines Hda1-Fusionsproteins erstellt, das am C-Terminus von Hda1 ein 6-faches Myc-Epitop trägt. Das Plasmid enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette und eine UARS zur freien Replikation in *U.maydis*. Es wurde der 11,5 kb *NotI/AscI*-geschnittene Vektor p9-1#14 mit einem 1215 bp *AscI/NsiI* *hda1*-Fragment aus p9-1#14, mit einem 1334 bp *NsiI/EcoRI*-Fragment aus pKHda1myc6° und mit einem 2083 bp *EcoRI/NotI*-Fragment aus p9-1#14 verbunden. pHda1-myc6° kodiert eine funktionelle Hda1 und komplementiert die EG-Aktivität von MR9-1 (MR57).

pHda1myc6°-cbx wurde zur Expression eines Hda1-Fusionsproteins erstellt, das am C-Terminus von Hda1 ein 6-faches Myc-Epitop trägt. Das Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenzkassette und eine UARS zur freien Replikation in *U.maydis*. Das Plasmid ist ein Derivat von pSS1, der als *HindII/BamHI*-Fragment mit einem 4378 bp *BamHI/NcoI*-Fragment aus p9-1#14 und mit einem 2262 bp *NcoI/HindIII*-Fragment aus pHda1-myc6° verbunden wurde. Das 6640 bp *hda1*-Fragment komplementiert die EG-Aktivität von MR9-1.

plexA-Hda1 diente zur Expression eines Hda1-Proteins in *S.cerevisiae*, das an seinem N-Terminus eine *lexA* DNA-Bindedomäne trägt. Es wurde ein 10155 bp *BamHI/NcoI*-Fragment aus plexA mit Klenow-Polymerase behandelt und mit einem ebenfalls Klenow-Polymerase behandelten 1562 bp *SalI/NcoI*-Fragment aus pHda1-cbx verbunden. Die *lexA*-Hda1 Fusion steht unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors aus Hefe und wird von einem *ADHI*-Terminator aus Hefe begrenzt.

plexA-Rum1 diene zur Expression eines Rum1-Proteins in *S.cerevisiae*, das an seinem N-Terminus eine lexA DNA-Bindedomäne trägt. Es wurde ein 10139 bp *EcoRI/NotI*-Fragment aus *plexA* mit einem 6,9 kb *EcoRI/NotI*-Fragment aus p0508964 verbunden. Die *lexA-Rum1* Fusion steht unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors aus Hefe und wird von einem *ADHI*-Terminator aus Hefe begrenzt.

pRum1-flag2° diene zur Expression eines Rum1-Proteins, das an seinem C-Terminus ein dupliziertes FLAG-Epitop trägt. In einer 4-Fragment Ligationsreaktion wurden ein 5,4 kb *BamHI/SacI*-Fragment von pGE79, ein 2,0 kb *KpnI/SacI*-Fragment aus pSLble(+), ein 8536 bp *BglII/XmaI*-Fragment aus p2410951 und ein 2,5 kb *XmaI/KpnI*-Fragment aus pflag2°-rum1-3' verbunden. MR50 (*al bl Δrum1-1 pRum1-flag2°*) trägt pRum1-flag2° und zeigte keine EG-Aktivität. Die Detektion FLAG-markierter Proteine im Rohextrakt von MR50 ergab reproduzierbar neben der erwarteten 250 kDa Rum1-flag2° Bande ein komplexes Bandenmuster kleinerer Rum1-flag2° Varianten (nicht gezeigt).

pRum1-flag4° diene zur Expression eines Rum1-Proteins, das an seinem C-Terminus ein dupliziertes FLAG-Epitop trägt. In einer 4-Fragment Ligationsreaktion wurden ein 5,4 kb *BamHI/SacI*-Fragment von pGE79, ein 2,0 kb *KpnI/SacI*-Fragment aus pSLble(+), ein 8536 bp *BglII/XmaI*-Fragment aus p2410951 und ein 2,6 kb *XmaI/KpnI*-Fragment aus pflag4°-rum1-3' verbunden. MR51 (*al bl Δrum1-1 pRum1-flag4°*) trägt pRum1-flag4° und zeigte keine EG-Aktivität. Die Detektion FLAG-markierter Proteine im Rohextrakt von MR51 ergab reproduzierbar neben der erwarteten 250 kDa Rum1-flag4° Bande ein komplexes Bandenmuster kleinerer Rum1-flag4° Varianten (nicht gezeigt).

pRum1-flag8° diene zur Expression eines Rum1-Proteins, das an seinem C-Terminus ein dupliziertes FLAG-Epitop trägt. In einer 4-Fragment Ligationsreaktion wurden ein 5,4 kb *BamHI/SacI*-Fragment von pGE79, ein 2,0 kb *KpnI/SacI*-Fragment aus pSLble(+), ein 8536 bp *BglII/XmaI*-Fragment aus p2410951 und ein 2,6 kb *XmaI/KpnI*-Fragment aus pflag8°-rum1-3' verbunden. MR52 (*al bl Δrum1-1 pRum1-flag8°*) trägt pRum1-flag8° und zeigte keine EG-Aktivität. Die Detektion FLAG-markierter Proteine im Rohextrakt von MR52 ergab reproduzierbar neben der erwarteten 250 kDa Rum1-flag8° Bande ein komplexes Bandenmuster kleinerer Rum1-flag8° Varianten (nicht gezeigt).

pRum1-flag8°* diene zur Expression eines Rum1-Proteins, das an seinem C-Terminus ein dupliziertes FLAG-Epitop trägt. In einer 4-Fragment Ligationsreaktion wurden ein 5,4 kb *BamHI/SacI*-Fragment von pGE79, ein 2,0 kb *KpnI/SacI*-Fragment aus pSLble(+), ein 8536 bp *BglII/XmaI*-Fragment aus p2410951 und ein 288 bp *XmaI/KpnI*-Fragment aus pflag8° verbunden. MR53 (*al bl Δrum1-1 pRum1-flag8°**) trägt pRum1-flag8°* und zeigte keine EG-Aktivität. Die Detektion FLAG-markierter Proteine im Rohextrakt von MR53 ergab reproduzierbar neben der erwarteten 250 kDa Rum1-flag8°* Bande ein komplexes Bandenmuster kleinerer Rum1-flag8°* Varianten (nicht gezeigt).

pRum1-myc6°* diene zur Expression eines Rum1-Proteins, das an seinem C-Terminus ein dupliziertes Hexa-Myc-Epitop trägt. In einer 4-Fragment Ligationsreaktion wurden ein 5,4 kb *BamHI/SacI*-Fragment von pGE79, ein 2,0 kb *KpnI/SacI*-Fragment aus pSLble(+), ein 8536 bp *BglII/XmaI*-Fragment aus p2410951 und ein 0,2 kb *XmaI/KpnI*-Fragment aus pSKII-HM verbunden. MR54 (*al bl Δrum1-1 pRum1-myc6°**) trägt pRum1-myc6°* und zeigte keine EG-Aktivität. Die Detektion Myc-markierter Proteine im Rohextrakt von MR54 ergab reproduzierbar neben der erwarteten 250 kDa Rum1-myc6°* Bande ein komplexes Bandenmuster kleinerer Rum1-myc6°* Varianten (nicht gezeigt).

4.5. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen ARK Scientific (Sigma) und Metabion GmbH synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben.

Tab. 13. Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Applikation
f1	CCG GGT GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GGA CCG GTC TGA C	Konstruktion eines FLAG-Epitops
f2	TCG AGT CAG ACC GGT CCC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCA C	Konstruktion eines FLAG-Epitops
mic1	GAA GCT TGG CAG GTT GCG AGC	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic2	TGG GTA CCG TTT GTT TGC TCC	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic3	CTC TCT ACG TGT GAT CTG CGC	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic4	AAC TTA GCG CCG TCT ACC TCG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic5	CAC ACG CCA CGT GCC GTA CAG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic6	ACT TTT CGA TCT CGT GTG GCC	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic7	GGT GTG ATT GGA CGA AGG CGG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic8	CAT ACT CGC GAC GAA TCC GGG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic9	ACG GAA TGC AGA TCT TGG ACG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic10	GCA GCA CGA GCG TGG ACA GCG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic11	CGA GCG CTC GCA TGC ACA CGC	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic12	AGG CAA GAC CCC AGC TCA ACG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic13	TCG TGC GAC ATC GTC GGT GGC	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic14	TCG TCG ATG TGC TCG CCA GCC	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic15	CTG CTA AAG ACG AAG CAC CGC	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic16	AAA CCC ACA CGT CGG CGA TCG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic17	TAC TTT GGG CCG GAC TAT CGG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic18	CTC ATC CGT GAT GCC GTC GCG	Sequenzierung <i>hda1</i>
mic19	CAT ACG GAC GAG TAC GTC GAG	PCR und Sequenzierung <i>hda1</i>
mic20	GTA CCG AAG GCG CAT GTG CCG	PCR und Sequenzierung <i>hda1</i>
mic21	CGA CAG CTT CGC GGC TCC CTC	PCR und Sequenzierung <i>hda1</i>
mic22	CCG CAC CGT CGA CCG CAC CGG	PCR <i>rum1</i>
mic23	CAT CTG TCT AGC CTG CTG ACG	PCR <i>rum1</i>
mic24	TCA CCC ACG TGC TTT CGG	PCR <i>egl1</i>
mic25	TCT CTC AAG CCG CTC GAC	PCR <i>egl1</i>
mic26	ACG ATC GGT TGT GTG GGC	PCR <i>egl1</i>
mic27	GCT CGG TCT CGT CAC ATG	PCR <i>egl1</i>
mic28	TCA CAG CTG TGT CCC TGG	PCR <i>egl1</i>
mic29	GAG TTC GGT CTT GTC CAG C	PCR <i>egl1</i>
M13-Reverse	AAC AGC TAT GAC CAT G	Sequenzierung
SP6(24/Boe)	CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG	Sequenzierung
T7(24/pSP72)	ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG	Sequenzierung
Universal	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Sequenzierung
oligo (dT) ₁₂₋₁₈	TTT TTT TTT TTT (TTT TTT)	cDNA-Synthese
otef-821	CCA ATA AAG GGC GCT GTC TCG GC	Sequenzierung
Nos-Ter	CAT CGC AAG ACC GGC AAC AGG	Sequenzierung

4.6. Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden zum Nachweis Epitop-markierter Proteine und zur Immunpräzipitation von hochmolekularen Protein- und Chromatinkomplexen eingesetzt.

Tab. 14. Verwendete Antikörper

Name	Bemerkung	Referenz
9E10	Monoklonaler Antikörper aus Maus, der gegen ein Myc-Epitop gerichtet ist. Es wurden Kulturüberstände von Hybridomazellkulturen oder über Affinitätschromatographie (Protein A) gereinigte Antikörper eingesetzt.	C. Koch, pers. Mitteilung
Anti-Ach3	Über Protein A-Chromatographie gereinigter Antikörper aus Hase, der ein di-acetyliertes Peptid (ARTKQTAR[K*]STGG[K*]APR KQLC wobei K* acetyliert vorliegt) bindet, das den Aminosäuren 1-21 von Histon H3 entspricht	(Braunstein et al., 1993)
M#2	Monoklonaler Antikörper aus Maus, der gegen ein FLAG-Epitop gerichtet ist	Sigma
W402B	HRP-gekoppelter Anti-Maus IgG	Promega

4.7. Mikrobiologische und genetische Methoden

4.7.1. Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *Escherichia coli* erfolgte in dYT, YT und LB (Miller, 1972) bei 37°C. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg ml⁻¹), Kanamycin (40 µg ml⁻¹) und X-Gal (40 µg ml⁻¹).

Ustilago maydis Stämme wurden bei 28°C inkubiert. Als Nährmedien dienten YEPS (Tsukuda et al., 1988), CMC (4.9.), CM und MM mit 1,0% Glucose (Holliday, 1974) oder PD (24 g Potato Dextrose (Difco); 20 g Bacto Agar; auf 1,0 l H₂O). Zur Selektion von Resistenzen wurde Carboxin (2,0 µg ml⁻¹), Phleomycin (40 µg ml⁻¹) oder Hygromycin (100-200 µg ml⁻¹) zugesetzt.

S.cerevisiae Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen YEPD-Platten, -WL+Glukose-Platten oder -WL+Raffinose-Platten, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert waren, angeimpft. Nähere Angaben sind Kämper et al. (1995) zu entnehmen.

Die Bestimmung der Zelldichte einer Kultur erfolgte photometrisch in einem LKB-Novaspec Photometer bei 600 nm. 1,0 OD₆₀₀ entspricht einer Zelldichte von ca. 5,0 x 10⁷ (für *U.maydis* und *S.cerevisiae*) bzw. 1,0 x 10⁹ (für *E.coli*) Zellen ml⁻¹. Zur genauen Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm x 0,1 mm) verwendet (ein Kleinquadrat entspricht dabei einem Volumen von 2,5 x 10⁻⁷ ml).

4.7.2. Transformation von *E.coli*

Die Transformation von *E.coli* DH5α oder Top10 erfolgte in der Regel mit Hilfe der CaCl₂-Methode (Cohen et al., 1972). Zur Herstellung Transformations-kompetenter Zellen wurde eine exponentiell wachsende Bakterienkultur bei einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,4 zunächst 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (15 min, 4000 Upm, GSA, 4°C) und in 0,5 Volumen eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 1/50 Volumen 50 mM CaCl₂; 15%

(v/v) Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz dieser Zellen lag in der Regel bei $1,0 \cdot 10^6$ Transformanden pro μg Plasmid-DNA.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils $200 \mu\text{l}$ mit $10 \mu\text{l}$ Ligationsansatz oder $1,0 \text{ ng}$ Plasmid-DNA vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde $1,0 \text{ ml}$ dYT-Medium zugegeben und die Zellen zur phänotypischen Expression der Antibiotikaresistenz 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungen auf selektiven YT-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Die Transformation durch Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser[®] von BIO-RAD durchgeführt. Die Herstellung elektrokompenter Zellen und deren, durch ein elektrisches Feld (25 mF , $2,5 \text{ kV}$, 200 W) vermittelte, Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.7.3. Transformation von *U.maydis*

Die Transformation von *U.maydis* wurde wie beschrieben durchgeführt (Schulz et al., 1990). 50 ml einer exponentiellen Kultur wurden geerntet (10 min , 3000 Upm , Heraeus Varifuge 3.0 R), mit 25 ml SCS gewaschen und in $2,0 \text{ ml}$ SCS; $12,5 \text{ mg ml}^{-1}$ Novozym 234 (Novo Nordisc) resuspendiert. Die Protoplastierung erfolgte bei Raumtemperatur für 10 bis 20 min und wurde mikroskopisch verfolgt. Nach vollständiger Protoplastierung wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch eine 10 min Zentrifugation bei 2000 Upm pelletiert. Dieser Waschgang wurde zweimal wiederholt, um das Novozym vollständig zu entfernen. Anschließend wurde noch einmal mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet in $0,5 \text{ ml}$ STC aufgenommen. Die Protoplasten wurden entweder sofort zur Transformation verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden $50 \mu\text{l}$ der Protoplastensuspension mit ca. $3,0 \mu\text{g}$ DNA und $1,0 \mu\text{l}$ Heparin (15 mg ml^{-1}) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von $0,5 \text{ ml}$ STC/PEG erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 15 min . Die Regeneration der Transformanden erfolgte auf selektiven YEPS-Platten ($1,5\%$ Agar in 10 ml YEPS, $1,0 \text{ M}$ Sorbitol; $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ Hygromycin, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Phleomycin oder $4,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ Carboxin), welche unmittelbar vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes mit $1,5\%$ Agar in 10 ml YEPS; $1,0 \text{ M}$ Sorbitol überschichtet wurden. Nach $3-5$ Tagen Inkubation bei 28°C wurden die Kolonien auf PD-Platten, die Hygromycin, Phleomycin oder Carboxin enthielten, vereinzelt.

Das REMI^{on-off} Verfahren stellt eine Variante der oben beschriebenen Transformationsmethode dar. Dabei wurde das linearisierte Plasmid pREMI^{on-off} stabil in *U.maydis* übertragen. Zur Transformation wurden $50 \mu\text{l}$ der Protoplastensuspension mit $2,0 \mu\text{g}$ DNA, $1,0 \mu\text{l}$ $10 \times$ B-Puffer (Boehringer), variablen *Bam*HI-Enzymmengen (30 U , 40 U , 50 U , 56 U , 75 U , 94 U) und $1,0 \mu\text{l}$ Heparin (15 mg ml^{-1}) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Das weitere Transformationsverfahren wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Im Verlauf dieser Ansätze wurden etwa $1,5 \times 10^4$ Transformanden hergestellt. Zur weiteren Analyse im Pathogenitätstest wurden jeweils $40-60$ Transformanden von den Transformationsplatten abgeschwemmt und zu einer Mischkultur zusammengefasst.

SCS:	20 mM Na-Citrat; $1,0 \text{ M}$ Sorbitol
STC:	10 mM Tris-Cl, pH $7,5$; 100 mM CaCl_2 ; $1,0 \text{ M}$ Sorbitol
STC/PEG:	STC; 40% (w/v) PEG3500

4.7.4. Transformation von *S.cerevisiae*

Die Transformation von *S.cerevisiae* wurde modifiziert nach (Gyuris et al., 1993) durchgeführt. Von einem Verdünnungsausstrich auf YEPD Platten ausgehend, wurden mit einer EGY48 Kolonie 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 pelletiert. Die Zellen wurden mit 10 ml H₂O_{bid.} gewaschen, anschließend in einer frisch hergestellten LiAc/TE Lösung (1,0 ml 10 x LiAc; 1,0 ml 10 x TE, pH 7,5; 8,0 ml H₂O_{bid.}) aufgenommen und darin nochmals gewaschen. Die pelletierten Zellen werden daraufhin in 500 µl 1 x LiAc-Lösung aufgenommen und zu 50 µl aliquotiert. Es wurde zu den Aliquots 10 µl ST-DNA und 0,1 – 2,0 µg Plasmid-DNA zugegeben, kräftig gemischt und 5-7 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 36 µl DMSO werden die Zellen bei 30°C für 15 min weiterinkubiert, ehe für 15 min bei 42°C ein Hitzeschock folgt. Die Zellen werden zweimal mit 1,0 ml YEPD-Medium gewaschen, in 200 µl YEPD Medium aufgenommen und auf selektiven Medien ausgestrichen.

10 x LiAc: 1,0 M LiAc, pH 7,5

4.7.5. Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität von Hefestämmen

4.7.5.1. Der *lacZ* Filtertest

X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) ist ein Substratanalogon für β -Galaktosidase, welche vom *lacZ*-Gen kodiert wird. Das Enzym hydrolysiert das Zuckerderivat und durch Luftoxidation entsteht als Reaktionsprodukt ein unlöslicher, blauer Indigofarbstoff. Der *in vivo* Nachweis der Interaktion von Proteinen aus *U.maydis* nach Kämper et al. (1995) ist so empfindlich, dass ca. ein Molekül des Enzyms pro Zelle nachgewiesen werden kann. Um möglichst alle bei einer Transformation erhaltenen Stämme auf β -Galactosidaseaktivität zu testen, wurden die Kolonien von einer Transformationsplatte auf einen Nitrocellulose-Filter (BA 85, Schleicher und Schüll) übertragen. Der beladene Filter wurde mit den Hefezellen nach oben gerichtet auf -WL+Raffinose Platten gelegt. Als Kohlenstoffquelle dient Raffinose, um das bekannte Phänomen der Repression der β -Galaktosidase Expression durch Glukose zu vermeiden (Johnston et al., 1994). Nach 48 - 72 h Inkubation bei 28°C wurden die Filter für etwa eine min in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend auf einem Papierfilter (595, Schleicher und Schüll), der mit 1.5 ml Z-Puffer/X-Gal getränkt war, im Deckel einer Petrischale aufgetaut. Die Filter wurden für zwei bis 72 h bei 37°C inkubiert. Auch nach mehrtägiger Inkubation bei 37°C ließ sich bei Transformanden, die die Ausgangsplasmide *plexA* und *pB42AD* tragen, keine Blaufärbung feststellen.

4.7.5.2. Der *lacZ* Flüssigtest

ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid) ist ein Substratanalogon für Galaktose. Das Enzym β -Galaktosidase, das vom *lacZ*-Gen kodiert wird, hydrolysiert das Zuckerderivat und es entsteht als Reaktionsprodukt das lösliche, gelbe o-Nitrophenol. Diese Nachweisreaktion modifiziert nach (Miller, 1972) ist so empfindlich, dass auch wenige Moleküle des Enzyms pro Zelle nachgewiesen werden können.

Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde über Nacht bei 28°C und 200 Upm eine 3,0 ml Flüssigkultur in selektiven Medien mit Raffinose angelegt. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt und sollte am nächsten Morgen zwischen 0,8 und 1,2 betragen. Anschließend wurden 0,5 ml der Kultur mit 0,5 ml Z-Puffer/SDS versetzt. Es wurden 50 ml Chloroform zugegeben und gemischt. Nachdem 200 ml ONPG-Lösung hinzugesetzt wurden, wurde die

Probe bei 37° bis zur Gelbfärbung inkubiert. Dabei wurde die Zeit gemessen. Auch nach eintägiger Inkubation ließ sich bei Transformanden, die die Ausgangsplasmide *plexA* und *pB42AD* tragen, keine Gelbfärbung nachweisen. Nach dem Eintreten der Gelbfärbung wurde die Reaktion durch sofortige Zugabe von 0,5 ml 1,0 M NaCO₃ gestoppt und die Probe für 5 min bei 14000 Upm abzentrifugiert. Anschließend wurde 1,0 ml des Überstandes abgenommen und bei 420 nm vermessen.

Der *lacZ* Flüssigkeitstest kann als quantitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität herangezogen werden (Estojak et al., 1995). Eine statistisch signifikante Aussage ließ sich sowohl durch die mehrfache Ausführung des Tests mit dem gleichen Klon, als auch durch den Vergleich verschiedener Klone des selben Genotyps erreichen. Die Aktivität ist ein direkter Hinweis auf die Stärke der Interaktion zweier Proteine im Zweihybridsystem. Sie berechnet sich nach folgender Formel:

$$\beta\text{-Galaktosidase Aktivität} = 1000 \times \text{OD}_{420} / \text{Zeit (min)} \times \text{OD}_{600}$$

OD₄₂₀ gibt die optische Dichte der ONPG-Reaktion und OD₆₀₀ die optische Dichte der eingesetzten Hefekultur an.

4.7.6. Infektion und Amplifikation von λ gt10-Phagen in *E.coli*

λ gt10-Phagen wurden in dem *E.coli* Stamm NM514 amplifiziert. Um die Kompetenz der Zellen für eine Phageninfektion zu erhöhen, wurden diese mit MgSO₄ behandelt. 50 ml LB und 0,4% Maltose wurden mit 1,0 ml Vorkultur von NM514 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C geschüttelt. Dann wurde die Bakterienkultur auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und in 15 ml eiskaltem 10 mM MgSO₄ resuspendiert. 0,2 ml der MgSO₄ behandelten Zellen wurden mit 0,2 ml Phagenverdünnung für 15 min bei 37°C inkubiert, mit 9,0 ml vorgewärmten Top-Agar (0,8% Bacto Agar in LB; 45°C) gemischt und auf LB-Platten ausgebracht, die 0,4% Maltose und 10 mM MgSO₄ enthielten. Die Platten wurden bis zu einer erkennbaren Plaquebildung (nach etwa 8 h) bei 37°C inkubiert. Einzelplaques wurden ausgestochen, in 0,5 ml SM resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

4.7.7. Kompatibilitätstest und filamentöses Wachstum

Um *U.maydis* Stämme auf sexuelle Kompatibilität und filamentöses Wachstum zu testen (Schulz et al., 1990), wurden Übernachtskulturen in YEPS-Medium kultiviert. Aliquots der Flüssigkulturen der Kreuzungspartner wurden gemischt und auf CM-Aktivkohleplatten getropft. Nach 1-3 Tagen Inkubation bei 22°C oder Raumtemperatur ist bei kompatiblen Stämmen der Fuz⁺-Phänotyp erkennbar. Es kommt hierbei zur Ausbildung eines weißen, auf Aktivkohleplatten gut sichtbaren Mycel, das sich deutlich vom glatten Phänotyp (Fuz⁻) nicht filamentös wachsender Stämme unterscheidet. Diploide Stämme, bei denen die Allele beider Inkompatibilitätsloci unterschiedlich sind, zeigen ebenfalls den Fuz⁺-Phänotyp.

4.7.8. Pathogenitätstest

Die für den Pathogenitätstest verwendeten Maispflanzen der Sorte Gaspar flint und Early Golden Bantam wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (14 h 20000 lux, 28°C; 10 h Dunkelperiode, 18°C) angezogen und 14 bis 16 Tage nach der Aussaat infiziert. Die *U.maydis* Stämme wurden zum Infizieren über Nacht in YEPS angezogen, anschließend abzentrifugiert und in sterilem Wasser aufgenommen. Für Kreuzungen wurden Suspensionen kompatibler Sporidien im gleichen Verhältnis gemischt. Zur Infektion von Gaspar flint wurden 0,5 ml einer Suspension von 10⁸-10⁹ Zellen ml⁻¹ (in H₂O_{bid.}) in den Blattwirtel getropft. Zur Infektion von Early Golden Bantam wurden Zellsuspensionen durch Injektion in den Stengel eingebracht. Nach 1-2 Wochen konnte bei Infektion mit pathogenen Stämmen die

Bildung von Tumoren an den Pflanzen beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass die in *U.maydis* eingebrachten Resistenzgene keine Auswirkung auf die Interaktion des Pilzes mit seiner Wirtspflanze haben (Topp et al., 2002).

4.7.9. Sporenanalyse

Die sporenhaltigen Tumore infizierter Maispflanzen wurden abgeschnitten und getrocknet. Die trockenen Tumore wurden grob zerkleinert und anschließend in 1,0% CuSO₄ gemörsert. Zur Reinigung der Sporen wurde die Suspension durch silanisierte Glaswolle filtriert und über Nacht inkubiert, um vegetative Zellen abzutöten. Danach wurden die Sporen abzentrifugiert und mehrfach in sterilem Wasser gewaschen. Die resuspendierten Sporen wurden auf PD-Platten mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin und 25 µg ml⁻¹ Tetracyclin ausplattiert. Eine andere Methode zur Isolierung von Sporen bestand darin, die Sporenlager aus den frischen Tumoren herauszupräparieren. Diese wurden dann in sterilem Wasser resuspendiert oder, im Falle von sehr kleinen Sporenlagern, direkt auf PD-Platten mit Ampicillin und Tetracyclin ausgestrichen. Die aus einer Spore entstehenden Sporidien unterschiedlichen Genotyps wurden gegebenenfalls mehrfach vereinzelt.

4.8. Molekularbiologische Standardtechniken

Standardtechniken wie die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten oder die Reinigung und Präzipitation von Nukleinsäuren wurden wie beschrieben durchgeführt (Ausubel et al., 1997; Sambrook et al., 1989). Bei der Verwendung von Restriktions- und DNA-modifizierenden Enzymen wurden die Protokolle der Hersteller befolgt. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der JetSorb DNA Extraktion Kit (Genomed) verwendet.

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch in einem Perkin Elmer LambdaBio-Spektrophotometer bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem Weg von 1,0 cm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg ml⁻¹ dsDNA bzw. 40 µg ml⁻¹ RNA. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm sollte 1,8 betragen und zeigte hochreine DNA an.

4.8.1. Isolierung von Nukleinsäuren

4.8.1.1. Plasmid-Präparation aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli* erfolgte in der Regel nach der "boiling" Methode (Sambrook et al., 1989) 1,5 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur wurden 30 sek bei 14000 Upm geerntet, das Pellet in 350 µl STET resuspendiert und nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg ml⁻¹ in 10 mM Tris-CL, pH 8,0) geschüttelt. Die Lyse der Zellen erfolgte bei 95°C für 45 sek. Anschließend wurden die Zelltrümmer und die denaturierte genomische DNA von der Plasmid DNA durch eine 10 min Zentrifugation abgetrennt. Mit Hilfe eines Zahnstochers wurde das Pellet aus dem Reaktionsgefäß entfernt, die verbleibenden Nukleinsäuren durch Zugabe von 800 µl Ethanol präzipitiert und 5 min bei 14000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid DNA wurde der JetStar-Kit (Genomed) oder GigaPrep (Qiagen) nach Angaben der Hersteller verwendet.

STET: 10 mM Tris-Cl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 1,0 mM EDTA; 5,0% (v/v)
 Triton X-100

4.8.1.2. Präparation von λ -DNA

Ein Phagen-Plaques wurde in 0,5 ml SM (Sambrook et al., 1989) resuspendiert. 200 μ l einer 1:10 Verdünnung wurden zu 200 μ l phagenkompetenter Zellen (*E.coli* NM514, MgSO₄ behandelt; siehe 4.7.6) gegeben und für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Die Mischung aus Phagen und Bakterien wurde in 15 ml LB-Medium (mit 0,4% Maltose und 10 mM MgSO₄) überführt und für 10-12 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Zusatz von 5,0% (v/v) Chloroform wurde weitere 20 min geschüttelt. Die Bakterienreste wurden abzentrifugiert (30 min, 3500 Upm, RT) und der Überstand 30 min bei 37 °C mit RNaseA und DNaseI verdaut (jeweils 12,5 μ l einer 10 mg/ml Lösung). Die Phagen wurden anschließend durch Zugabe von 15 ml 20% PEG 2000 (w/v), 2,0 M NaCl (frisch hergestellt) 30 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 10000 Upm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das restliche PEG sorgfältig entfernt. Das Pellet wurde in 3,0 ml SM resuspendiert und mit 3,0 ml Phenol extrahiert (30 min, 30 °C unter Schütteln). Nach Wiederholung der Extraktion mit Phenol für 20 min wurde weitere 20 min mit Phenol/Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die Phagen-DNA aus der wässrigen Phase mit 1/10 Volumen 3,0 M Natriumacetat, pH 4,8 und 2 Volumen Ethanol 30 min bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 10000 Upm, 4°C) wurde mit 70% Ethanol gewaschen, das Pellet getrocknet und in 100 μ l TE aufgenommen.

4.8.1.3. Präparation von chromosomaler DNA aus *U.maydis*

Die Isolation von chromosomaler DNA aus *U.maydis* erfolgte nach einer modifizierten Methode von (Hoffmann and Winston, 1987). 15 ml einer Übernachtskultur wurden geerntet und in 200 μ l Restflüssigkeit sowie 200 μ l Lysispuffer resuspendiert. Es wurden 400 μ l Phenol/Chloroform und 300 mg Glasperlen zugesetzt und die Probe für 3,5 min gemischt. Nach Zugabe von 200 μ l TE wurde zur Phasentrennung 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert (Zentrifugation 5 min, 14000 Upm). Das Pellet wurde getrocknet und in 400 μ l TE, 75 μ g/ml RNaseA resuspendiert. Nach 45 min Inkubation bei 37°C erfolgte eine Extraktion mit 400 μ l Phenol/Chloroform. Durch Zugabe von 5,5 μ l 7,5 M NH₄-Acetat und 1,0 ml Ethanol wurde die DNA erneut präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50 μ l TE gelöst (30 min bei 37°C oder über Nacht bei 4°C). Die DNA-Konzentration wurde auf einem 1,0% Agarose-Gel abgeschätzt.

Lysispuffer: 10 mM Tris-Cl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 1,0 mM EDTA; 1,0% (w/v) SDS; 2,0% (v/v) Triton X-100

4.8.1.4. RNA-Isolierung aus Zellen nach Wachstum auf Agarplatten

Die Methode wurde an bestehende Protokolle angelehnt (Timberlake, 1986). Das Pilzmyzel wurde nach 48 h von Festmedien abgekratzt, sofort in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Das trockene Pulver wurde in 10 ml TE-gesättigtem Phenol (auf Eis) überführt, 20 ml Lysispuffer zugesetzt und sofort vermischt. Nach Zugabe von 0,5 g Glasperlen (150 μ m) wurde die Probe 2 min stark gemischt. Dem Ansatz wurden 9,0 ml Chloroform zugesetzt und nach einer Zentrifugation (15 min, 10000 Upm, 4°C) wurde die wässrige Phase dreimal mit 20 ml Phenol/Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die RNA durch Zusatz von 1/3 Volumen 8,0 M LiCl für 8-24 h auf Eis gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation (30 min, 10000 Upm, 4°C) pelletiert, in 3,0 ml H₂O_{bid.}, 300 μ l 3,0 M Natriumacetat und 9,0 ml Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde danach mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 μ l H₂O_{bid.} aufgenommen. Zur Kontrolle von Qualität und Konzentration der RNA wurde 1,0 μ l auf einem 1,0% Agarose-Gel überprüft. Die genaue Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

Lysepuffer:	40 ml Lösung 2 werden langsam auf Eis in 40 ml Lösung 3 gegeben, dann werden 20 ml Lösung 1 zugefügt und der pH-Wert mit 3,0 M NaOH auf pH 8,9 eingestellt. Der Puffer wurde 1 h langsam auf Eis gerührt und anschließend filtriert.
Lösung 1:	250 mM EGTA; 1,25 M NaCl; 1,0 M Tris-Cl, pH 8,5
Lösung 2:	12% (w/v) Natrium-p-Aminosalicylsäure
Lösung 3:	2,0% (w/v) tri-iso-Propylnaphtalinsulfonat

4.8.1.5. RNA-Isolierung aus Tumor und Pflanzengewebe

Nach sofortigem Überführen des Materials in flüssigen Stickstoff wurde wie unter 4.8.1.4. beschrieben verfahren. Es wurden allerdings 2-4 zusätzliche Phenol/Chloroform Extraktionen vor der LiCl-Fällung durchgeführt.

4.8.1.6. RNA-Isolierung aus Zellen nach Wachstum in Flüssigkultur

Die Isolierung von *U.maydis* RNA aus Flüssigkulturen erfolgte nach der sauren Phenol-Methode (Schmitt et al., 1990). 15 ml einer *U.maydis* Kultur (OD₆₀₀ 1,0) wurden geerntet (10 min, 2500 Upm) und in 400 µl AE-Puffer resuspendiert. Nach Zusatz von 50 µl 10% SDS und 550 µl AE-äquilibriertem Phenol wurde die Probe 30 sek gemischt. Die Extraktion erfolgte bei 65°C unter Schütteln. Anschließend wurde die Probe bis zur Bildung von Phenolkristallen bei -80°C gelagert, zentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und die wässrige Phase mit AE-Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNA wurde danach mit 1/10 Volumen 3,0 M Natriumacetat, pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol für 1 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min 13000 Upm, 4°C) wurde die RNA mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl H₂O_{bid.} aufgenommen.

AE-Puffer: 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA

4.8.2. Immobilisierung und Analyse von Nukleinsäuren

4.8.2.1. Southern-Blot

3,0 µg chromosomale DNA wurden in einem 20 µl Ansatz mit den entsprechenden Enzymen restringiert und in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran (Biodyne B, 0,45 µm; Pall) erfolgte durch ein alkalisches Saugblotverfahren in 0,4 M NaOH (Southern, 1975) und wurde gemäß dem Protokoll von (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Das Gel wurde vor dem Transfer 20 min in 250 mM HCl inkubiert, um den Transfer großer DNA-Fragmente durch die dabei stattfindende Abspaltung eines Teils der Purine zu erleichtern. Anschließend wurde das Gel zur Renaturierung 20 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Danach wurde der Filter getrocknet und einer UV-Behandlung (280 nm, 2 min) unterzogen, um die DNA-Moleküle kovalent mit der Membran zu verknüpfen.

Der spezifische Nachweis von membrangebundener DNA erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden. Nach einer 20 min Präinkubation der Membran bei 65°C in Southern-Hybridisierungspuffer wurde die denaturierte (5 min, 100°C) radioaktive DNA-Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Anschließend wurden die Membranen zweimal für jeweils 20 min bei 65°C mit Southern-Waschpuffer gewaschen und auf einem Röntgenfilm exponiert. Alternativ wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphoimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 h wurden die strahlungsensitiven Membranen der Kassetten im Phosphoimager eingelesen und mit dem Programm ImageQuant (Molecular Dynamics) bearbeitet.

Zum Entfernen der radioaktiven Sonde wurde der Filter ca. 20 min bei 95 °C in 0,1% (w/v) SDS inkubiert.

Southern-Hybridisierungspuffer: 0,5 M Na₂HP0₄, pH 7,0; 7,0% SDS
 Southern-Waschpuffer: 0,1 M Na₂HP0₄, pH 7,0; 1,0% SDS

Die nicht-radioaktive Detektion immobilisierter Nukleinsäuren wurde mit DIG-markierten Proben nach den Angaben des Herstellers (Boehringer) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Chemi-Imagers (Biozym) dokumentiert.

4.8.2.2. Durchmusterung einer Phagenbank

In dieser Arbeit wurde eine λ gt10 cDNA-Bibliothek verwendet (Schauwecker et al., 1995). Der geeignete *E.coli* Wirtsstamm NM514 wurde in LB mit 0,4% Maltose kultiviert und mit MgSO₄ behandelt, um die Kompetenz der Zellen für eine Phageninfektion zu erhöhen (siehe 4.7.6.). Eine geeignete Verdünnung der Phagenbank wurde mit 0,2 ml der Zellen für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 9,0 ml Top-Agar (45°C) auf eine LB-Platte (12x12 cm) ausgebracht. Die Platten wurden bei 37°C für 6-8 h inkubiert, bis Plaques deutlich sichtbar waren. Anschließend wurde für 2 min eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) auf die Platten gelegt, abgezogen und umgedreht für 10 bis 15 min in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl denaturiert. Die Renaturierung erfolgte in 0,5 M Tris-Cl, pH 7,2; 1,5 M NaCl. Die Membran wurde danach kurz in 20 x SSC gewaschen, getrocknet und 2 min mit UV-Licht (280 nm) bestrahlt. Die Hybridisierung und Auswertung der Filter erfolgte wie oben (4.8.2.1.) beschrieben.

4.8.2.3. Northern-Blot

Zur Analyse der Genexpression wurden ca. 30 µg Gesamt-RNA durch eine denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese aufgetrennt. Eine Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen ist sinnvoll, da RNA-Moleküle, insbesondere solche mit hohem Molekulargewicht, häufig durch partielle Doppelstrangbildung Sekundärstrukturen ausbilden, welche das Laufverhalten im Gel beeinflussen. Die RNA wurde in 1 x MOPS-Puffer, 6,7% (v/v) Formaldehyd und 50% Formamid (deionisiert) für 15 min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben mit 1/10 Volumen Auftragspuffer und Ethidiumbromid (50 µg ml⁻¹ Endkonzentration) versetzt. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1,0% Agarose-Gel (1 x MOPS, 6,7% (v/v) Formaldehyd) für 2 h bei einer Feldstärke von 5-7 V/cm. Nach dem Lauf wurde das Gel 45 min in 20 x SSC gewaschen. Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Biodyne B, 0,45 µm, PALL) erfolgte durch Kapillar-Blot (Sambrook et al., 1989) in 20 x SSC über Nacht. Der Filter wurde anschließend getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (2 min, 280 nm) kovalent mit der Membran verknüpft. Zum spezifischen Nachweis von RNA wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Nach einer 30 min Präinkubation in Northern-Hybridisierungspuffer bei 60°C wurde die denaturierte (5 min, 100°C) radioaktive Sonde zugegeben und für 8-16 h hybridisiert. Die Filter wurden danach erst 10 min und dann 20 min bei 60°C mit Northern-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden sie auf einem Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert. Die Auswertung der Filter erfolgte wie oben (4.8.2.1.) beschrieben.

10 x MOPS:	200 mM MOPS, pH 7,0; 80 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA
20 x SSC:	300 mM Na-Citrat, 3,0 M NaCl, pH 7,0
Northern-	50 mM PIPES, pH 6,5; 100 mM NaCl; 50 mM Na ₂ HP0 ₄ , pH
Hybridisierungspuffer:	7,0; 1,0 mM EDTA; 5,0% (w/v) SDS
Northern-Waschpuffer:	1 x SSC; 5,0% (w/v) SDS

4.8.2.4. Expressionsanalyse mit Dot-Blot-Hybridisierung

Diese Technik wurde zur simultanen Analyse der Expression von 274 unterschiedlichen Genen eingesetzt. Dabei wurden entsprechende Genfragmente auf Membranen mittels eines Roboters aufgebracht. Die Filter wurden freundlicherweise von der LION AG zur Verfügung gestellt und konnten bereits erfolgreich zur Expressionsanalyse eingesetzt werden (Quadbeck-Seeger et al., 2000). Die Vorhybridisierung der Membranen erfolgte für 1 h bei 65°C in Church-Hybridisierungspuffer. Hybridisiert wurde mit ca. $3,0 \times 10^6$ cpm ml⁻¹ Hybridisierungssonde für 12 h bei 65°C. Die Membranen wurden zweimal für jeweils 30 min bei 65°C mit Church-Waschpuffer gewaschen, danach für 36 h auf in Kassetten für einen Phosphoimager gelegt und mit einem Phosphoimager (Molecular Dynamics) eingelesen.

Auf den Membranen wurden die Genfragmente in jeweils zwei Parallelen aufgebracht. Dabei handelte es sich um Fragmente aus bekannten Genen bzw. zufällig ausgewählte Fragmente aus einem RNA-Fingerprint Ansatz (A. Brachmann und J. Kämper, pers. Mitteilung). Die Hybridisierungssonden wurden nach reverser Transkription von RNA aus den Stämmen FB1 und MR11 mit 50 ng cDNA als Matrize hergestellt. Es wurden je zwei Membranen mit einer Sonde hybridisiert.

Die Filter wurden 48 h exponiert und in einen Phosphoimager eingelesen. Die Daten wurden im Programm ImageQuant (Molecular Dynamics) analysiert und in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel 98, Microsoft) verarbeitet. Weil die Hybridisierungssignale in Abhängigkeit der Signalstärke unterschiedliche Flächen einnahmen, wurden die Messwerte der Parallelexperimente normalisiert. Die Hintergrundhybridisierung wurde an Hand von 11 Kontrollspots ermittelt (C6, D12, D16, D22, D24, G14, I8, I24, K4, K7, L17), die keine DNA enthielten. Diese Werte wurden zum Abgleich der Filter verwendet. Für jeden Zustand wurden so pro untersuchtem Gen vier Werte erhalten, von denen der Median für die weitere Auswertung ermittelt wurde, um den Effekt eventueller großer Abweichungen auf den Membranen zu eliminieren. Signifikante Signalunterschiede wurden im t-Test nach Student auf der 1% Wahrscheinlichkeitsebene ermittelt. Messwerte bis 25 Arbeitseinheiten wurden auf Grund fehlender Signifikanz als nicht verlässlich eingestuft. Unter diesen befanden sich die *hda1*-abhängigen Gene *bE1*, *bW1* und *dik1*. Bei ausreichend hoch exprimierten Genen zeigte sich in Übereinstimmung mit konventionellen Northern-Daten eine Signalanreicherung bei *egl1*, *hum2* und *ssp1* nach Einsatz radioaktiv markierter cDNA des Δ *hda1*-Stammes MR11 im Vergleich zu entsprechenden Experimenten mit FB1. Die Messwerte der relativen Signalstärken wurden als Logarithmen gegeneinander aufgetragen (Abb. 11b).

Church-Hybridisierungspuffer: 0,5 M Na₂HP0₄, pH 7,2; 1,0 mM EDTA, 7,0% SDS
 Church-Waschpuffer: 40 mM Na₂HP0₄, pH 7,2; 0,1% SDS

4.8.2.5. Gensonden

- bE1*: ein 1,4 kb *NdeI*/*BamHI*-Fragment aus pJBbE1 (Bergemann, 1993)
- bW2*: ein 1,9 kb *NdeI*-Fragment aus pJBbW2 (Bergemann, 1993)
- dik1*: ein 460 bp *NcoI*/*MluI*-Fragment aus pDik1c (Bohlmann, 1996)
- dik6*: ein 420 bp *HindIII*/*BamHI*-Fragment aus pDik6c (Bohlmann, 1996)
- egl1*: ein 520 bp *NcoI*/*HindIII*-Fragment aus pEG1 (Schauwecker et al., 1995)
 ein 253 bp *NcoI*/*SphI*-Fragment aus pEG1 (Schauwecker et al., 1995)
- hda1*: ein 1086 bp *BglII*-Fragment aus p9-1#14 (diese Arbeit)
 ein 2821 bp *MluI*-Fragment aus p9-1#14 (diese Arbeit)
- hum2*: ein 500 bp *SphI*-Fragment aus pRep/ORF (Bohlmann, 1996)

<i>ppi</i> :	ein 112 bp <i>PstI/SalI</i> -Fragment aus pPpi (Bohlmann, 1996)
rDNA:	ein 300 bp PCR-Fragment (A.Brachmann, pers. Mitteilung)
<i>rep1</i> :	ein 700 bp <i>HindIII</i> -Fragment aus pHind700 (Wösten et al., 1996)
<i>rum1</i> :	ein 720 bp <i>PstI/StuI</i> -Fragment aus pRum1 (diese Arbeit)
<i>tefl</i> :	ein 900 bp <i>BamHI/SphI</i> -Fragment aus pREMI ^{on-off} (diese Arbeit)

4.8.2.6. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die Herstellung von Hybridisierungs-Sonden erfolgte mit Hilfe des Megaprime-DNA-Labeling-System-Kits (Amersham). Dabei werden kurze Oligonukleotide zufälliger Sequenz als Primer an das denaturierte DNA-Fragment hybridisiert und mit Hilfe des Klenow Enzyms unter Verwendung von [α -³²P]dCTP elongiert (Feinberg and Vogelstein, 1984).

Die Abtrennung überschüssiger Nukleotide von dem markierten DNA-Fragment erfolgte mit MicroSpin[®] S300 bzw. MoBiTek-Säulen (nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers) oder mit Elutip-D-Säulen. Dabei wurde die markierte DNA nach dem Entfernen der freien Nukleotide mit 0,5 ml Hochsalz-Puffer (1,0 M NaCl; 20 mM Tris-Cl, pH 7,4) eluiert.

4.8.3. PCR

4.8.3.1. Standard-PCR

Standard-PCR-Ansätze enthielten 1,0 ng Template, je 30 pmol Primer, 0,1 mM dNTPs und 1,0 U Taq-Polymerase (Laborpräparat) in PCR-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl). In der Regel erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen (1 min 94°C; 1 min 50°C – 60°C; 1,5 min 72°C).

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken erfolgte mit Hilfe der Pfu-Polymerase (Stratagene), da diese auf Grund ihres Korrekturlese-Mechanismus eine geringe Fehlerrate aufweist. Die PCR-Ansätze bestanden aus 1,0 ng Template, je 30 pmol Primer, 0,1 mM dNTPs, 10% DMSO, 2,0% Glycerin und 1,0 U Pfu-Polymerase in 1 x Pfu-Puffer (Stratagene).

Die Amplifikation erfolgte, je nach Primern mit folgenden Programmen.

5 min / 94°C	1 Zyklus
1 min / 94°C	
1 min / 50°C, 55°C oder 60°C	33 Zyklen
1 min / 74°C	
5 min / 74°C	1 Zyklus

4.8.3.2. Ganz-Zell-PCR

Zur Überprüfung von *U.maydis* Transformanden als Vorselektion für Southern-Analysen wurde die Ganz-Zell-PCR eingesetzt. Dabei wurden intakte Zellen über eine Hitzebehandlung aufgeschlossen und die freigesetzte DNA als Matrize in den PCR-Ansätzen verwendet. Die Ansätze enthielten Zellmaterial von Agarplatten, je 30 pmol Primer, 0,1 mM dNTPs und 1,0 U Taq-Polymerase (Laborpräparat) in 100 μ l PCR-Puffer (s.o.). Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm.

5 min / 95°C	1 Zyklus
1 min / 95°C	
1 min / 60°C	30 Zyklen
2 min / 72°C	
5 min / 72°C	1 Zyklus

4.8.3.3. Quantitative PCR

Zur Ermittlung der Menge an coimmunpräzipitierter DNA aus vernetzten Gesamt-Protein Extrakten von *U.maydis* wurde ein ursprünglich für *S.cerevisiae* entworfenes PCR-Protokoll verwendet (Gotta and Cockell, 1997). Es wurden jeweils die Amplifikationsprodukte von verschiedenen Primerpaaren mit gleicher Amplifikationseffizienz verglichen: Für den *egl1*-Promoter waren dies mic26, 27, 28 und mic29, für die internen Kontrollen, Amplifikate aus dem kodierenden Bereich des *rum1*-Gens oder *hdal*-Gens, waren es entsprechend mic19, 21, 22 und mic23. Die Linearität der jeweiligen Reaktionen wurde durch den Einsatz seriell verdünnter DNA als Matrize untersucht.

Für alle Reaktionen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

1,0 µl	DNA aus der Immunpräzipitation oder verdünnter Extrakt
1,4 µl	50 pmol Primer 1
1,4 µl	50 pmol Primer 2
5,0 µl	10 x PCR-Puffer (s.o.)
0,5 µl	10mM dNTPs
39,7 µl	H ₂ O _{bid.}

Der Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C inkubiert, dann wurde 1,0 U Taq-Polymerase hinzugegeben ("hot start") und folgendes PCR-Programm durchgeführt:

30 sek / 94°C	
30 sek / 60°C	30 Zyklen
30 sek / 72°C	
5 min / 72°C	1 Zyklus

Die resultierenden Produkte wurden entsprechend ihrer Größe auf einem 2,0% -3,0% Agarosegel analysiert. Alternativ wurden beide Reaktionen in einem Ansatz durchgeführt. Es wurden dann vier Primer (je 1,4 µl 50 pM) eingesetzt und 37 µl H₂O_{bid.} zugegeben. Die Dokumentation und quantitative Auswertung erfolgte im Gel Doc 2000 und dem Programm Quantity One (Bio-Rad). Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

4.8.4. cDNA-Synthese

Über die reverse Transkription der RNA von Wildtypstämmen oder Δ *hdal*-Stämmen wurde einzelsträngige cDNA hergestellt, die zur Ermittlung eines Expressionsprofils der jeweiligen Stämme eingesetzt wurde. Etwa 300 µg Gesamt-RNA wurden zur vollständigen Entfernung eventuell kontaminierender DNA mit 40 U RNase-freier DNaseI (Boehringer) für 30 min bei 37°C behandelt. Der Ansatz wurde mit Phenol und Chloroform versetzt und daraufhin zur Konzentration der Nukleinsäuren einer Ethanol-Fällung unterzogen. Die präzipitierte RNA wurde in 20 µl H₂O_{bid.} aufgenommen und die exakte Konzentration in einem Photometer ermittelt. Daraufhin wurden jeweils 15 µg RNA mit 500 pmol oligo (dT) Starternukleotiden (Gibco) mit einer durchschnittlichen Länge von 12 bis 18 bp versetzt und zur Hybridisierung 10 min bei 70°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von Puffer, dNTPs und DTT nach Angaben des Herstellers, 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend 2 min Inkubation bei 37°C. Zur Transkription der RNA wurden 800 U Superscript Reverse Transkriptase (Gibco) zugegeben und 50 min bei 37°C inkubiert. Die Transkriptase wurde daraufhin bei 75°C für 15 min inaktiviert. Schließlich wurde durch Zugabe von 25 µg RNaseH und einer Inkubation von 30 min bei 37°C die ursprünglich eingesetzte RNA degradiert. Die auf diese Weise erzeugte, einzelsträngige cDNA wurde über QiaQuick-Säulen (Qiagen) laut Angaben

des Herstellers aufgereinigt und in 30 µl H₂O_{bid} aufgenommen. Ein Aliquot (28 µl) wurde direkt zur radioaktiven Markierung eingesetzt.

4.8.5. Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der Reaktion wurde die DNA aufgereinigt (JetQuick, Genomed). Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angaben des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977). In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein statistischer Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen ddBasen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt, in 4,0 µl Formamid mit 25 mM EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf ein 6,0% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach Auftrennung im elektrischen Feld und Anregung durch einen Laser mit Hilfe einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems ausgewertet. Die Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SequenceNavigator (ABI) importiert und dort als Elektropherogramm editiert werden. Überprüfte Sequenzen wurden mit DNA Strider 1.3 (Douglas, 1995; Marck, 1988)) Blast2 (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997), ClustalW (Eddy, 1995) bzw. ClustalX (Heringa, 1999) und SeqVu 1.0.1 (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) weiter analysiert und nachbearbeitet.

4.9. Nachweis von Cellulase-Aktivität auf Festmedien (CMC-Test)

Als Substrat zum Nachweis der Enzymaktivität von Endoglukanasen diente wasserlösliche Carboxymethyl-Cellulose (CMC, low viscosity grade, Sigma). Zum Nachweis der Cellulase-Aktivität wurden CMC-Medien mit *U.maydis* beimpft (Schauwecker et al., 1995). Dies geschah entweder durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungstufen von Flüssigkulturen, durch Ausstriche von Platte oder durch Auftropfen von 5,0-20 µl Flüssigkultur auf die CMC-Platten. Die CMC-Platten wurden 24 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgewaschen, die Platten 20 min mit 1,0% (w/v) Kongo-Rot gefärbt und mit 1,0 M NaCl, unter mehrmaligem Wechsel der Lösung, entfärbt. Cellulase-Aktivität wurde durch Bildung heller Höfe angezeigt. Diese Höfe bilden sich, wenn die mit Kongo-Rot anfärbbare Carboxymethyl-Cellulose von Endoglukanasen durch deren hydrolytische Aktivität gegenüber β-1,4 glykosidischen Bindungen abgebaut wurde. Der Nachweis von Cellulase-Aktivität auf CMC-Platten ist ein verlässlicher und schneller Test, mit dem die Aktivität von Endoglukanasen nachgewiesen werden kann.

CMC-Platten: 0,5% Yeast Extract (Difco); 0,4% Bacto Peptone (Difco); 0,4% Sucrose; 2,0% CMC; 1,5% Agar (Bitek)

4.10. Isolierung des *hda1*-Gens

4.10.1. UV-Mutagenese

Das *hda1*-Gen wurde in einer UV-Mutagenese identifiziert. Vorversuche mit *U.maydis* Zellen aus der exponentiellen und stationären Phase zeigten, 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 der UV-Bestrahlung Mutationen tragen, wurden die UV-Energiemenge so gewählt, dass die Überlebensraten bei 8,0% und darunter lagen. Für die UV-Mutagenese wurde der *U.maydis* Stamm FB1 über

Nacht in 200 ml YEPS bei 28°C inkubiert. Die optische Dichte der jeweiligen Kulturen wurde daraufhin auf OD₆₀₀ 0,9 eingestellt. Die Gesamtzellzahl der Kulturen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und lag durchschnittlich bei $3,0 \times 10^7$ Zellen ml⁻¹. Jeweils $5,0 \times 10^5$ Zellen wurden auf eine PD-Platte ausgestrichen und in einem Stratalinker[®] mit einer Energiemenge von 27-40 mJ cm⁻² bestrahlt. Um Lichtreparaturprozesse zu verhindern, wurden die Mutageneseansätze bei 28°C für zwei Tage im Dunklen inkubiert.

4.10.2. Screen nach Mutanten mit Cellulase-Aktivität

Um Mutanten mit Cellulase-Aktivität zu identifizieren, wurden die Kolonien der UV-Mutanten von den PD-Platten auf CMC-Medien replikaplatziert. Die bestückten CMC-Platten wurden 24 h bei 28°C inkubiert. Nachdem die Zellen mit Wasser abgewaschen worden waren, wurden die Platten mit Kongo-Rot für 20 min gefärbt und anschließend mehrfach mit 1,0 M NaCl-Lösung gewaschen (siehe 4.9.). Zeigte sich ein heller Hof auf den gefärbten Platten, so war dies ein eindeutiger Hinweis auf eine Mutante mit Cellulase-Aktivität. Diese konnte auf den Replikaplatzen anhand des Koloniemusters direkt identifiziert werden.

4.10.3. Komplementation mit einer frei replizierenden pCM54 Bank, die genomische DNA-Fragmente trägt

Die pCM54 Bank ist eine genomische *U.maydis* Bank; ungefähr 8,0 kb große *Sau3A*-Fragmente wurden in den in *U.maydis* frei replizierenden Vektor pCM54 kloniert, der eine Hygromycin B-Resistenzkassette trägt (Bauchwitz and Holloman, 1990). Zur Komplementation funktionsgestörter Gene wurde die pCM54 Bank in Protoplasten der Mutanten übertragen. Es wurde auf Hygromycin B Resistenz selektioniert. Kann der ursprüngliche Phänotyp nach erfolgter Transformation wiederhergestellt werden, so werden die Plasmide aus *U.maydis* reisoliert. Hierfür wurde Gesamt-DNA aus diesen Transformanten präpariert und dann mittels Elektroporation in *E.coli* DH5α Zellen übertragen. Da die pCM54 Vektoren einen bakteriellen Ursprung zur Replikation und ein Ampicillin-Resistenzgen besitzen, können solche Zellen, die ein pCM54-Derivat tragen, auf Ampicillin-haltigen Medien wachsen. Die Plasmide wurden aus *E.coli* isoliert und ein zweites Mal in die entsprechenden MRn-1 Stämme eingebracht. Kann der ursprüngliche Phänotyp erneut hergestellt werden, so ist mit hoher Wahrscheinlichkeit für dieses Ereignis das isolierte Plasmid verantwortlich. Dieses Plasmid kann nun subkloniert und weiter charakterisiert werden. Die pCM54 Bank wurde zur Komplementation der Mutanten MR1-1 (*roe1*), MR8-1 (*dial*) und MR9-1 (*hda1*) verwendet (diese Arbeit und Stahl, pers. Mitteilung).

4.10.4. Isolierung von *hda1* cDNA-Klonen

Die Isolierung von sechs *hda1* cDNA-Klonen erfolgte aus einer λgt10 cDNA-Bibliothek (Schauwecker et al., 1995), die mit einem 1086 bp *Bgl*III-Fragment aus p9-1#14 hybridisiert wurde. Die isolierten λgt10 Phagen wurden in einer Restriktion mit *Eco*RI analysiert, wobei nur der das längste cDNA *hda1*-Fragment tragenden Phage die am 5'-Ende des *hda1*-Gens liegende *Eco*RI-Schnittstelle aufwies. Die *Eco*RI-Fragmente wurden subkloniert (pCHda1-1 und pCHda1-6) und sequenziert. Der Vergleich mit genomischen *hda1*-Sequenzen ergab, dass *hda1* ohne Introns vorliegt.

4.10.5. Sequenzierung des *hda1*-Locus

Die DNA-Sequenzierung des *hda1*-Gens und der flankierenden Bereiche erfolgte mit Hilfe eines automatischen Sequenzers. Dabei wurden *Bss*HIII-Subklone des ursprünglich aus p9-1#14 stammenden komplementierenden Fragments angefertigt. *hda1*-Fragmente der Plasmide pΣ1, pΣ2, pΣ3, pΣ4, pΣ5 und pΣ6 wurden zunächst mit Hilfe der Primer Universal und M13-

Reverse sequenziert. Anschließend wurde das komplementierende Fragment aus p9-1#14 mit Hilfe spezifischer Primer (mic1-mic21) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden in den Programmen SequenceNavigator (ABI) und DNA-Strider 1.3 (Marck, 1988; Douglas, 1995) verarbeitet.

4.11. Mikroskopie

Die Lichtmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop mittels Normarski-Optik durchgeführt. 8,0 µl einer entsprechenden Kultur oder in 1,0% Formaldehyd fixierte Präparate wurden zur Analyse auf Objektträger übertragen. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm Image pro plus (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen Photoshop 4.0 (Adobe) und Canvas 6.0 (Deneba) exportiert.

4.12. MNaseI-Analyse der Chromatinstruktur

Chromatinanalysen mit Hilfe von MNaseI sind einfache Verfahren, die eine Lokalisierung von Nukleosomen entlang der DNA nachweisen können (Wu, 1980). Wenn permeabilisierte Zellen in Anwesenheit von divalenten Kationen mit MNaseI behandelt werden, verursacht das Enzym im Zellkern zwischen nukleosomalen Partikeln Doppelstrangsnitte der DNA. Behandlung von Chromatin mit hohen Konzentrationen von MNaseI ergaben DNA-Fragmente von mononukleosomaler Länge, während niedrige Enzymkonzentrationen zu Doppelstrangsnitten im Abstand von 10 bis 50 Nukleosomen führen können. Nach Auftrennung der Produkte in Agarosegelen wurde ein typisches Muster, die sog. Nukleosomenleiter, beobachtet.

Da bei der Präparation von Zellkernen oftmals Chromatinkomponenten verloren werden, ist zur Darstellung von intaktem Chromatin die Permeabilisierung von Zellen generell vorzuziehen (Pfeifer and Riggs, 1991). Deshalb bot sich zur Bestimmung der Chromatinstruktur regulatorischer Regionen von *U.maydis* die Verwendung von Protoplasten an. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode orientierte sich an bestehenden Protokollen (Zaret, 1999).

Die Darstellung von Protoplasten erfolgte nach dem zur Transformation von *U.maydis* eingesetzten Protoplastierungsverfahrens mit der Ausnahme, dass Protoplasten nicht in STC sondern in ST-Puffer aufgenommen und zur Reduzierung endogener Nukleaseaktivität sofort auf Eis inkubiert wurden. Für die jeweiligen Reaktionsansätze wurden bei Raumtemperatur 40 µl 10 x V-Puffer, 260 µl H₂O_{bid}/Complete[®] und 1,0 µl MNaseI (Pharmazia) vorgelegt. Die Menge der eingesetzten MNaseI musste für die jeweiligen Protoplastenpräparation in Vorexperimenten empirisch eingestellt werden und lag zwischen 0,25 U und 10 U. Ziel war es einen partiellen Verdau der genomischen DNA zu erzeugen. Es wurden jeweils 100 µl Protoplastensuspension zugegeben und sofort gründlich gemischt. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Reaktionen für 13 min. bei 37°C unter ständigem Mischen auf einem Thermomixer (Eppendorf). Um die Reaktionen zu stoppen, wurden 400 µl Phenol und Chloroform zugegeben. Die Ansätze wurden zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrigen Überstände wurden durch Fällung mit Ethanol konzentriert und in 50 µl TE mit RNaseA aufgenommen. Zum enzymatischen Abbau der RNA wurden die Ansätze für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Qualität der mit MNaseI partiell restringierten genomischen DNA wurde auf einem 1,1% Agarosegel überprüft. Zur Darstellung partiell restringierter, "nackter" genomischer DNA als Referenz wurden jeweils 10 µg DNA mit entsprechenden Mengen MNaseI behandelt. "Nackte" DNA ist erheblich leichter zugänglich für MNaseI, so dass hier sowohl die Enzymmengen als auch die Einwirkzeiten in Vorversuchen eingestellt werden mussten und je nach DNA-Präparation erheblich variierten (nicht gezeigt).

ST-Puffer:	10 mM Tris-Cl, pH 7,5; 1,0 M Sorbitol
10 x V-Puffer:	100 mM Tris-Cl pH 8,0; 10 mM CaCl ₂ ; Complete [®] nach Angaben des Herstellers (Boehringer)
H ₂ O _{bid.} /Complete [®] :	7,5 ml H ₂ O _{bid.} ; 1 Tablette Complete [®] (Boehringer)

Um das Verfahren der indirekten Endmarkierung nach Wu (1980) anwenden zu können, wurden jeweils 17 µl geeigneter Ansätze mit 5 U *SphI* behandelt. Dadurch wurde am 3'-Ende der zu untersuchen MNaseI-Fragmente der regulatorischen *eglI*-Region ein Bezugspunkt definiert. Die Restriktionsansätze wurden 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem 1,1% Agarosegel separiert. Es erfolgte die Immobilisierung der DNA auf Filtern, die zur Analyse der Chromatinstruktur mit einem 253 bp *eglI*-Fragment hybridisiert wurden. Das weiter Vorgehen entspricht dem für Southern-Experimente beschriebenen Verfahren (4.8.2.1).

4.13. Biochemische Methoden

4.13.1. Isolierung von Gesamtprotein aus *U.maydis*

Es wurden Zellen von einer frischen Platte in 25 ml YEPS, das gegebenenfalls die entsprechenden Mengen an Antibiotika enthielt, angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ 1,0 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Für die folgenden Schritte wurden die Zellen immer auf Eis gehalten, um endogene Proteinaseaktivitäten möglichst zu verhindern. Die Zellen wurden 10 min bei 3500 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml TBS gewaschen und in 1,5 ml TBS mit Proteinaseinhibitormix (Complete[®], Boehringer) aufgenommen. Die Zellen wurden in der "French-Press" durch dreimalige Behandlung bei 1100 psi aufgeschlossen. Es folgten zwei Zentrifugationen bei 3500 Upm, 10 min bei 4°C und 15 min bei 22000 Upm und ebenfalls 4°C. Der Überstand löslicher Proteine wurde abgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

Die Präzipitation der Proteine erfolgte durch Zugabe von 50% (v/v) Aceton, 10 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (20 min, 22.000 Upm, Beckman Avanti30 Zentrifuge) bei 4°C. Nach Lufttrocknung wurde das Pellet in 40 µl TBS aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Löslichkeit der untersuchten Epitop-markierten Proteinen wurden alternativ zu TBS ein Tris-Puffer, Niedrigsalz-Puffer, NP40-Puffer, Hochsalz-Puffer oder RIPA eingesetzt.

TBS:	50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 150 mM NaCl
Tris-Puffer:	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 5,0 mM EDTA; 1,0 mM Pefa-Block
Niedrigsalz-Puffer:	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 5,0 mM EDTA; 1,0% NP40; 1,0 mM Pefa-Block
NP40-Puffer:	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 5,0 mM EDTA; 1,0% NP40; 150 mM NaCl; 1,0 mM Pefa-Block
Hochsalz-Puffer:	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 5,0 mM EDTA; 1,0% NP40; 500 mM NaCl; 1,0 mM Pefa-Block
RIPA:	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 5,0 mM EDTA; 1,0% NP40; 150 mM NaCl; 0,5% DOC; 0,1% SDS; 1,0 mM Pefa-Block

4.13.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Proteinextrakte werden unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch nach ihrer Masse aufgetrennt (Laemmli, 1970). Angewendet wurde die Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese. Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der

Grenze der Gele verdichtet und dann nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in einer speziellen Apparatur (Mini Protean II, BioRad) bei 200 V für 45 min. Es wurden folgende Gellösungen für 8,0%, 10% oder 12% Gele verwendet:

Sammelgel:	125 mM Tris-Cl, pH6,8; 5,0% Acrylamid; 0,1% Bisacrylamid; 0,1% SDS
Trenngel:	375 mM Tris-Cl, pH 8,8; 8,0%, 10% bzw. 12% Acrylamid; 0,3% Bisacrylamid, 0,1% SDS

Zum Starten der Polymerisation wurde Ammoniumpersulfat und TEMED nach Angaben des Herstellers (BioRad) eingesetzt.

4.13.3. Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry-Elektro-Blots in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulosemembran (Immobilon-P) transferiert.

Durch die angelegte Spannung (Bedingungen: 0,8 mA cm⁻², 1 h) wurden die Proteine auf die Membran transferiert. Die Effizienz des Blots kann durch eine PonceauS-Färbung überprüft werden. Dazu wird die Membran eine Minute in PonceauS-Lösung inkubiert und dann einige min in H₂O_{bid} gewaschen, bis sich die Banden abzeichnen.

Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des Amersham ECL+[®] Western Blotting Kits (Amersham). Dazu wurde die Membran zunächst mit einer 1,0% Milchpulveremulsion (Hipp) über Nacht bei 4°C behandelt, um unspezifische Bindungsstellen für den ersten Antikörper zu maskieren. Anschließend wurde mit dem ersten Antikörper 1 h inkubiert. Es wurde zur Detektion von Myc-markierten Proteinen der Antikörper 9E10 (C. Koch, pers. Mitteilung), zur Detektion von FLAG-markierten Proteinen der Antikörper M#2 (Sigma) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST erfolgte die Detektion mit einem zweiten Antikörper (1:15.000 verdünnt; 1h appliziert), dem HRP-gekoppelten Anti-Maus IgG W402B, der den konstanten Teil des ersten Antikörpers erkennt. Das angekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol, das nach weiteren Waschschritten als Detektionreagenz auf die Membran gegeben wurde. Dabei wird Licht der Wellenlänge 420 nm emittiert, das mittels eines Röntgenfilms detektiert werden konnte. Die genaue Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers (Amersham).

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

4.13.4. Immunpräzipitation von Proteinen aus *U.maydis*

U.maydis-Zellen wurden in 100 ml YEPS mit den entsprechenden Antibiotika bis zu einer OD₆₀₀ 1,0 bei 28°C inkubiert. Die Ansätze wurden 10 min bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert. Pelletierte Zellen wurden in 10 ml Puffer A gewaschen. Das Pellet wurde in 2,0 ml Puffer A und einem Proteinaseinhibitormix (Complete[®], Boehringer) aufgenommen und in einer "French Press" bei 1100 psi quantitativ aufgeschlossen. Um unlösliche Proteine abzutrennen, wurde das Zellysate 30 min bei 22000 Upm und 4°C zentrifugiert. 1,0 ml des löslichen Proteinextrakts wurde mit 60 µl einer Protein G-Sepharose Suspension für 1 h bei 4°C unter stetigem Mischen behandelt. Dabei wurden unspezifisch mit Protein G assoziierte Proteine aus dem löslichen Gesamtzellextrakt entfernt. Jeweils ein 450 µl Aliquot wurde daraufhin mit 10 µg eines entsprechenden Antikörpers (9E10 bzw. M#2) für 1 h bei 4°C unter stetigem Mischen behandelt. Um Immunkomplexe aus der Lösung isolieren zu können, wurden 20 µl einer Protein G-Sepharose Suspension zugegeben und ebenfalls unter stetigem Mischen für 1 h bei 4°C inkubiert. Die immobilisierten Immunkomplexe wurden fünfmal für

jeweils 15 sek bei 14000 Upm und 4°C mit 200 µl Puffer A und 0,5% (v/v) Triton X-100 gewaschen und schließlich in 20 µl Puffer A mit Proteinaseinhibitormix aufgenommen. Bis zur Gelelektrophorese wurden die Immunpräzipitate bei -20°C gelagert.

Puffer A: 50 mM HEPES, pH7,4; 150 mM NaCl; 5,0 mM EDTA

4.13.5. *In vivo* Vernetzung und Analyse coimmunpräzipitierter DNA

Die *in vivo* Vernetzungsexperimente zur Coimmunpräzipitation wurden nach modifizierten Protokollen für Hefe durchgeführt (Strahl-Bolsinger et al., 1997). Es wurden 200 ml der untersuchten *U.maydis* Kulturen (FB1, MR11, FB1 Δ rum1) bis zur OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Nach Hinzufügen von Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 1,0% wurden die Kulturen bei Raumtemperatur 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Um das überschüssige Formaldehyd abzufangen, wurde nach dieser Zeit Glyzin bis zu einer Endkonzentration von 125 mM hinzugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Hierauf wurden Zellen durch 7 min Zentrifugation bei 3500 Upm geerntet und einmal in TBS gewaschen. Das Pellet wurde in 2,0 ml FA-Lysispuffer aufgenommen und durch viermaliges Behandeln in einer "Frech-Press" bei 1100 psi aufgeschlossen. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Größe der DNA Fragmente in dem gewonnenen Extrakt wurde ein 400 µl Aliquot über Nacht mit 10 µl ProteinaseK (20 mg ml⁻¹) bei 65°C behandelt, die Nukleinsäuren mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden in 100 µl TE und RNaseA (10 µg ml⁻¹) aufgenommen. 5,0 µl wurden auf eine 1,5% Agarosegel analysiert. Ein weiteres 400 µl Aliquot wurde für die Immunpräzipitation verwendet. Unspezifisch an Sepharose-A/G bindende Komplexe wurden durch eine 1,5 h Vorinkubation mit 30 µl Sepharose A (50 % Suspension in TBS) und 30 µl Sepharose G (50% Suspension in TBS) bei 4°C auf einem Rotator beseitigt. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit 5,0 µg gereinigtem Anti-Ach3 Antikörper für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach diesem Schritt wurde zur Präzipitation der Immunkomplexe 30 µl Sepharose A (50 % Suspension in TBS) und 30 µl Sepharose G (50 % Suspension in TBS) zugegeben und 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Die Komplexe wurden durch Zentrifugation vom Extrakt abgetrennt und folgendermaßen je 5 min bei 4°C gewaschen: zweimal in 1,0 ml FA-Lysis Puffer, zweimal in 1,0 ml FA-Lysis Puffer/500mM NaCl, einmal in 1,0 ml TLN und einmal in 1,0 ml TE. Zwischen den Waschschritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation und der Überstand wurde verworfen. Um den Hintergrund an unspezifisch präzipitierter DNA weiter zu reduzieren, wurde alternativ je viermal mit FA-Lysis-Puffer, FA-Lysis-Puffer/500mM NaCl und zweimal mit TLN gewaschen. Die Sepharose wurde in 95µl TE mit RNaseA (10 µg ml⁻¹) aufgenommen und die RNA bei 37°C für 30 min degradiert. Es folgte eine ProteinaseK Behandlung über Nacht bei 65°C. Dazu wurde SDS zu einer Endkonzentration von 1,0% zugegeben, sowie 1,5 µl ProteinaseK (20 µg ml⁻¹). Die copräzipitierten DNA-Fragmente wurden mit Phenol extrahiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Das resultierende Pellet wurde in 50 µl TE aufgenommen.

Die präzipitierten Fragmente wurden mittels quantitativer PCR analysiert (4.8.3.3).

FA-Lysepuffer/(500): 50 mM HEPES-K, pH 7,5; 140 mM NaCl / (500 mM NaCl); 1,0% Triton X-100; 0,1% DOC

TLN: 10 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1,0 mM EDTA; 0,25 mM LiCl; 0,5% NP-40; 0,5% DOC

4.13.6. Gelfiltration von Proteinen

Gelfiltrationsexperimente wurde mit Gesamtprotein-Extrakten von Stämmen, die Epitop-markierte Proteine exprimieren, durchgeführt und dienten der Bestimmung der molekularen Masse des Hda1-Komplexes. Die Menge der zum Auftrag gelösten Proteine wurde mit Hilfe eines BCA-Kits (Pierce) bestimmt. Pro Filtration wurden 4,0 mg Gesamt-Protein eingesetzt. Die verwendeten Säulen Superdex 12 und Superose 6 (Pharmazia) wurden nach den Angaben des Herstellers in einer FPLC-Apperatur (Pharmacia) mit Hilfe eines Proteinstandards (Pharmazia) äquilibriert. Es handelte sich dabei um Thyroglobin (670 kDa), γ -Globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa). Zur Abschätzung der molekularen Masse großer Proteinkomplexe wurde Blue-Dextran (entspricht etwa 2,0 MDa) verwendet. Proteine wurden nach ihrer molekularen Masse bei einer Flussrate des Separationspuffers von $0,2 \text{ ml min}^{-1}$ fraktioniert. Die jeweiligen Fraktionen wurden gesammelt und bis zur Western-Analyse bei -80°C gelagert. Unter allen gewählten Bedingungen wurde Hda1-Myc6° in den Fraktionen detektiert, die wenigstens 2,0 MDa große Proteinkomplexe enthielten.

Separationspuffer: 20 mM HEPES, pH 7,5; 100 mM NaCl; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,5 mM EGTA; 0,5 mM EDTA; 1,0 mM Pefablock; 0,5 mM DTT; 10% Glycerin

5. Literaturverzeichnis

Aasland, R., Gibson, T. J. and Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 56-59.

Affolter, M., Percival-Smith, A., Müller, M., Leupin, W. and Gehring, W. J. (1990). DNA binding properties of the purified *Antennapedia* homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 4093-4097.

Ahringer, J. (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet.* *16*, 351-356.

Allfrey, V., Faulkner, R. M. and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *51*, 786-794.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and 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. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* *25*, 3389-3402.

Andrews, D. L., Egan, J. D., Mayorga, M. E. and Gold, S. E. (2000). The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol. Plant Microbe Interact.* *13*, 781-786.

Asante-Owusu, R. N., Banham, A. H., Böhnert, H. U., Mellor, E. J. C. and Casselton, L. A. (1996). Heterodimerization between two classes of homeodomain proteins in the mushroom *Coprinus cinereus* brings together potential DNA binding and activation domains. *Gene* *172*, 25-31.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc., USA.

Ayer, D. E. (1999). Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol.* *9*, 193-198.

Ayer, D. E. and Eisenman, R. N. (1993). A switch from Myc:Max to Mad: Max heterocomplexes accompanies monocyte /macrophage differentiation. *Genes Dev.* *7*, 2110-2119.

Ayer, D. E., Kretzner, L. and Eisenman, R. N. (1993). Mad: A heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* *72*, 211-222.

Baidyaroy, D., Brosch, G., Ahn, J. H., Graessle, S., Wegener, S., Tonukari, N. J., Caballero, O., Loidl, P. and Walton, J. D. (2001). A gene related to yeast HOS2 histone deacetylase affects extracellular depolymerase expression and virulence in a plant pathogenic fungus. *Plant Cell* *13*, 1609-1624.

- Bakkeren, G. and Kronstad, J. W. (1993). Conservation of the *b* mating-type gene complex among bipolar and tetrapolar smut fungi. *Plant Cell* 5, 123-136.
- Ballestar, E. and Wolffe, A. P. (2001). Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur. J. Biochem.* 268, 1-6.
- 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. and Herskowitz, I. (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5878-5882.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122, 2965-2976.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994a). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev.* 8, 1367-1378.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994b). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp. Mycol.* 18, 247-266.
- Barkan, A. and Martienssen, R. A. (1991). Inactivation of maize transposon *Mu* suppresses a mutant phenotype by activating an outward-reading promoter near the end of *Mu1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3502-3506.
- Barrett, K. J., Gold, S. E. and Kronstad, J. W. (1993). Identification and complementation of a mutation to constitutive filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6, 274-283.
- Bartl, S., Taplick, J., Lager, G., Khier, H., Kuchler, K. and Seiser, C. (1997). Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor- inducible gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5033-5043.
- Basse, C. W., Kerschbaumer, C., Brustmann, M., Altmann, T. and Kahmann, R. (2002a). Evidence for a *Ustilago maydis* steroid 5 α -reductase by functional expression in *Arabidopsis* det2-1 mutants. *Plant. Physiol.* 129, 717-732.
- Basse, C. W., Kolb, S. and Kahmann, R. (2002b). A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 43, 75-93.
- Basse, C. W., Stumpferl, S. and 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.
- Bauchwitz, R. and Holloman, W. K. (1990). Isolation of the *REC2* gene controlling recombination in *Ustilago maydis*. *Gene* 96, 285-288.

- Bencina, M., Panneman, H., Ruijter, G. J., Legisa, M. and Visser, J. (1997). Characterization and overexpression of the *Aspergillus niger* gene encoding the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit. *Microbiology* 143, 1211-1220.
- Bergemann, J. (1993). Molekularbiologische Untersuchungen der Transkripte und Produkte des *b*-Locus von *Ustilago maydis* (Dissertation an der Freien Universität Berlin, Berlin).
- Berger, S. L. (2001). Molecular biology. The histone modification circus. *Science* 292, 64-65.
- Bernstein, B. E., Tong, J. K. and Schreiber, S. L. (2000). Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13708-13713.
- Björklund, S., Almouzni, G., Davidson, I., Nightingale, K. P. and Weiss, K. (1999). Global transcription regulators of eukaryotes. *Cell* 96, 759-767.
- Boehmelt, G., Antonio, L. and Iscove, N. N. (1998). Cloning of the murine transcriptional corepressor component SAP18 and differential expression of its mRNA in the hematopoietic hierarchy. *Gene* 207, 267-275.
- Bohlmann, R. (1996). Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis* (Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, München).
- Bohlmann, R., Schauwecker, F., Basse, C. and Kahmann, R. (1994). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. In Daniels, M.J. (ed.) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht 3, 239-245.
- Bölker, M., Böhnert, H. U., Braun, K. H., Görl, J. and 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. and Kahmann, R. (1995b). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Botany* 73, 320-325.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68, 441-450.
- Bottin, A., Kämper, J. and Kahmann, R. (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 253, 342-352.
- Bowdish, K. S. and Mitchell, A. P. (1993). Bipartite structure of an early meiotic upstream activation sequence from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2172-2181.
- Brachmann, A. (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer (Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, München).
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J. and Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 42, 1047-1063.
- Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D. and Broach, J. R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* 7, 592-604.

- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.
- Brosch, G., Dangl, M., Graessle, S., Loidl, A., Trojer, P., Brandtner, E. M., Mair, K., Walton, J. D., Baidyaroy, D. and Loidl, P. (2001). An inhibitor-resistant histone deacetylase in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Biochemistry* 40, 12855-12863.
- Bürglin, T. R. (1994). A comprehensive classification of homeobox genes. In: Duboule (ed) Guidebook to the homeobox genes. Oxford University Press *Oxford*, 27-71.
- Cano-Canchola, C., Acevedo, L., Ponce-Noyola, P., Flores-Martinez, A., Flores-Carreón, A. and Leal-Morales, C. A. (2000). Induction of lytic enzymes by the interaction of *Ustilago maydis* with *Zea mays* tissues. *Fungal Genet. Biol.* 29, 145-151.
- Carmen, A. A., Rundlett, S. E. and Grunstein, M. (1996). HDA1 and HDA3 are components of a yeast histone deacetylase (HDA) complex. *J. Biol. Chem.* 271, 15837-15844.
- Casselton, L. A. and Kües, U. (1994). Mating type genes in homobasidiomycetes. In *The Mycota: growth, differentiation and sexuality*, J. G. H. Wessels and F. Meinhardt, eds. (Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag), 307-321.
- Chan, S., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J. and Mann, R. S. (1994). The DNA-binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with Extradenticle, another homeoprotein. *Cell* 78, 603-615.
- Chen, P., Lee, K. S. and Levin, D. E. (1993). A pair of putative protein kinase genes (*YPK1* and *YPK2*) is required for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 236, 443-447.
- Chen, Z. J. and Pikaard, C. S. (1997). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: A role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Dev.* 11, 2124-2136.
- Christensen, J. J. (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Published by the American Phytopathological Society, Monograph no. 2, 1-40.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O. and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282, 699-705.
- Clancy, M. J. (1998). Meiosis: step-by-step through sporulation. *Curr. Biol.* 8, 461-463.
- Cohen, S., Chang, A. C. Y. and Hse, C. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114.
- De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K. and Spierer, P. (1996). The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* 384, 589-591.

- Defeo-Jones, D., Huang, P. S., Jones, R. E., Haskell, K. M., Vuocolo, G. A., Hanobik, M. G., Huber, H. E. and Oliff, A. (1991). Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 352, 251-254.
- Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J. and Hartman, P. E. (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54, 61-67.
- Desplan, C., Theis, J. and O'Farrel, P. H. (1988). The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* 54, 1081-1090.
- Dora, E. G., Rudin, N., Martell, J. R., Esposito, M. S. and Ramirez, R. M. k. (1999). RPD3 (*REC3*) mutations affect mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 35, 68-76.
- Douglas, S. E. (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol. Biotechnol.* 3, 37-45.
- Dranginis, A. M. (1990). Binding of yeast a1 and a2 as a heterodimer to the operator DNA of a haploid specific gene. *Nature* 347, 682-685.
- Dürrenberger, F. and Kronstad, J. (1999). The *ukc1* gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 261, 281-289.
- Dürrenberger, F., Wong, K. and Kronstad, J. W. (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5684-5689.
- Eddy, S. R. (1995). Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 3, 114-120.
- Ekker, S. C., Jackson, D. G., von Kessler, D. P., Sun, B. I., Young, K. E. and Beachy, P. A. (1994). The degree of variation of DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *EMBO J.* 13, 3551-3560.
- Ellison, M. J. and Hochstrasser, M. (1991). Epitop-tagged ubiquitin. A new probe for analyzing ubiquitin function. *J. Biol. Chem.* 266, 21150-21155.
- Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y. and Verdin, E. (1998). Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2795-2800.
- Estojak, J., Brent, R. and Golemis, E. A. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell Biol.* 15, 5820-5829.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984). Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137, 266-267.
- Felsenfeld, G. (1978). Chromatin. *Nature* 271, 115-122.

- Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R. and Pavletich, N. P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* *401*, 188-193.
- Fischer, J. A., McCann, M. P. and Snetselaar, K. M. (2001). Methylation is involved in the *Ustilago maydis* mating response. *Fungal Genet. Biol.* *34*, 21-35.
- Froeliger, E. H. and Leong, S. A. (1991). The *a* mating-type alleles of *Ustilago maydis* are idiomorphs. *Gene* *100*, 113-122.
- Gehring, W. J., Affolter, M. and Bürglin, T. (1994). Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *63*, 487-526.
- Gierl, A. (1990). How maize transposable elements escape negative selection. *Trends Genet.* *6*, 155-158.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. and Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* *68*, 647-657.
- Gold, S. E., Brogdon, S. M., Mayorga, M. E. and Kronstad, J. W. (1997). The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* *9*, 1585-1594.
- Golemnis, E. A., Serebriiskii, I., Finley, R. L., Kolonin, M. G., Gyuris, J. and Brent, R. (1999). Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. *Curr. Prot. Mol. Biol. Supplement 46 CPMP*, 20.1.1-20.1.40.
- Gotta, M. and Cockell, M. (1997). Telomeres, not the end of the story. *Bioessays* *19*, 367-370.
- Goutte, C. and Johnson, A. D. (1994). Recognition of a DNA operator by a dimer composed of two different homeodomain proteins. *EMBO J.* *13*, 1434-1442.
- Graessle, S., Loidl, P. and Brosch, G. (2001). Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 704-720.
- Grosschedl, R., Giese, K. and Pagel, J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* *10*, 94-100.
- Grozinger, C. M., Hassig, C. A. and Schreiber, S. L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 4868-4873.
- Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 7835-7840.
- Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* *9*, 3-16.

- Grundy, F. J., Waters, D. A., Takova, T. Y. and Henkin, T. M. (1993). Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *10*, 259-271.
- Guan, L. S., Li, G. C., Chen, C. C., Liu, L. Q. and Wang, Z. Y. (2001). Rb-associated protein 46 (RbAp46) suppresses the tumorigenicity of adenovirus-transformed human embryonic kidney 293 cells. *Int. J. Cancer* *93*, 333-338.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* *75*, 792-803.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E.coli*. In DNA cloning, a practical approach, D. Rickwood and B. D. Hames, eds.: IRL Press), 109-135.
- Hartmann, H. A., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* *15*, 1632-1641.
- Hartmann, H. A., Krüger, J., Lottspeich, F. and 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.
- Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L. and Ayer, D. E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* *89*, 341-347.
- Hassig, C. A., Tong, J. K., Fleischer, T. C., Owa, T., Grable, P. G., Ayer, D. E. and Schreiber, S. L. (1998). A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 3519-3524.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S. and Grunstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* *383*, 92-96.
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. A. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* *387*, 43-48.
- Hepworth, S. R., Friesen, H. and Segall, J. (1998). *NDT80* and the meiotic recombination checkpoint regulate expression of middle sporulation-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 5750-5761.
- Heringa, J. (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput. Chem.* *23*, 341-364.
- Ho, C. Y., Adamson, J. G., Hodges, R. S. and Smith, M. (1994). Heterodimerization of the yeast MATa1 and Mata2 proteins is mediated by two leucine zipper-like coiled-coil motifs. *EMBO J.* *13*, 1403-1413.
- Hoey, T. and Levine, M. (1988). Divergent homeobox proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* *332*, 858-861.

- Hoffmann, C. S. and Winston, F. (1987). A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation in *E.coli*. *Gene* 57, 267-272.
- Holliday, R. (1961). The genetics of *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), 575-595.
- Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P. and Bradbury, E. M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus: Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem.* 268, 305-314.
- Huber, S., Lottspeich, F. and Kämper, J. (2002). A gene with similarity to dioxygenases is highly induced in teliospores of *Ustilago maydis*. eingereicht.
- Hunter, T. and Plowman, G. D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* 22, 18-22.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD- dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.
- Johnson, A. (1992). A combinatorial regulatory circuit in budding yeast. In Transcriptional regulation, S. L. M. a. K. R. Yamamoto, ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 975-1006.
- Johnston, M., Flick, J. S. and Pexton, T. (1994). Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of *GAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3834-3841.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187-191.
- Kadosh, D. and Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 89, 365-371.
- Kadosh, D. and Struhl, K. (1998). Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5121-5127.
- Kahmann, R., Basse, C. and Feldbrugge M. (1999). Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 647-650.
- Kahmann, R. and Bölker, M. (1996). Self/nonsel self recognition in fungi: Old mysteries and simple solutions. *Cell* 85, 145-148.
- Kahmann, R., Romeis, T., Bölker, M. and Kämper, J. (1995). Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 559-564.

- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* *81*, 73-83.
- Kasten, M. M., Dorland, S. and Stillman, D. J. (1997). A large protein complex containing the yeast Sin3p and Rpd3p transcriptional regulators. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 4852-4858.
- Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J. A., Bienz, M. and Müller, J. (1998). dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* *282*, 1897-900.
- Keleher, C. A., Goutte, C. and Johnson, A. D. (1988). The yeast cell-type-specific repressor a2 acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein. *Cell* *53*, 627-936.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. and Georgopoulos, K. (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* *10*, 345-355.
- Kim, Y. B., Honda, A., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (1998). *phd1+*, a histone deacetylase gene of *Schizosaccharomyces pombe*, is required for the meiotic cell cycle and resistance to trichostatin A. *FEBS Lett.* *436*, 193-196.
- Kim, Y. B., Lee, K. H., Sugita, K., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (1999). Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene* *18*, 2461-2470.
- Kissinger, C. R., Liu, B., Martin-Blanco, E., Kronberg, T. B. and Pabo, C. O. (1990). Crystal structure of an Engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* *63*, 579-590.
- Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* *98*, 285-294.
- Kronstad, J., De Maria, A. D., Funnell, D., Laidlaw, R. D., Lee, N., de Sa, M. M. and Ramesh, M. (1998). Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch. Microbiol.* *170*, 395-404.
- Kronstad, J. W. (1997). Virulence and cAMP in smuts, blasts and blights. *Trends Plant Sci.* *2*, 193-199.
- Kronstad, J. W. and Leong, S. A. (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev.* *4*, 1384-1395.
- Krüger, J. (1999). Der cAMP-Weg und sein Einfluß auf Pheromonsignaltransduktion und Pathogenität in *Ustilago maydis* (Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, München).
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A. and Kahmann, R. (1998). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* *260*, 193-198.

- Krüger, J., Loubradou, G., Wanner, G., Regenfelder, E., Feldbrugge, M. and 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.
- Kües, U. and Casselton, L. A. (1992). Homeodomains and regulation of sexual development in basidiomycetes. *Trends Genet.* *8*, 154-155.
- Kües, U. and Casselton, L. A. (1993). The origin of multiple mating types in mushrooms. *J. Cell Sci.* *104*, 227-230.
- Kurdistani, S. K., Robyr, D., Tavazoie, S. and Grunstein, M. (2002). Genome-wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast. *Nat. Genet.* *31*, 248-254.
- Kuspa, A. and Loomis, W. F. (1992). Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 8803-8807.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lamb, T. M. and Mitchell, A. P. (2001). Coupling of *Saccharomyces cerevisiae* early meiotic gene expression to DNA replication depends upon *RPD3* and *SIN3*. *Genetics* *157*, 545-556.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L. and Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 5807-5811.
- Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D. and Wolffe, A. P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* *72*, 73-84.
- Lefebvre, L. and Smith, M. (1993). Mutational and functional analysis of dominant *SPT2* (*SIN1*) suppressor alleles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 5393-5407.
- Li, T., Stark, M. R., Johnson, A. D. and Wolberger, C. (1995). Crystal structure of the MATa1/MATa2 homeodomain heterodimer bound to DNA. *Science* *270*, 262-269.
- Liang, Z. and 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. and Kahmann, R. (2001). A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* *40*, 719-730.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.
- Luger, K. and Richmond, T. J. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 140-146.

- Luo, R. X., Postigo, A. A. and Dean, D. C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92, 463-473.
- Luo, Y., Ullrich, R. C. and Novotny, C. P. (1994). Only one of the paired *Schizophyllum commune* *Aa* mating-type, putative homeobox genes encodes a homeodomain essential for *Aa*-regulated development. *Mol. Gen. Genet.* 244, 318-324.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le-Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D. and Harel Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 391, 601-605.
- Mann, R. S. and Chan, S.-K. (1996). Extra specificity for *extradenticle*: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet.* 12, 258-262.
- 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.
- Martinez-Espinoza, A. D., Garcia-Pedrajas, M. D. and Gold, S. E. (2002). The *Ustilaginales* as plant pests and model systems. *Fungal Genet. Biol.* 35, 1-20.
- Mayorga, M. E. and Gold, S. E. (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol. Microbiol.* 34, 485-497.
- Mayorga, M. E. and Gold, S. E. (2001). The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol. Microbiol.* 41, 1365-1379.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. and Olson, E. N. (2000a). Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106-111.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L. and Olson, E. N. (2000b). Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14400-14405.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics* (New York: Cold Spring Harbor).
- Mitchell, A. P. (1994). Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 58, 56-70.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. and Kahmann, R. (1999). The MAP Kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 34, 1007-1017.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-380.
- Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P. and Bradbury, E. M. (1989). Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* 57, 449-457.

- Orth, A. B., Rzhetskaya, M., Pell, E. J. and Tien, M. (1995). A serine (threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 2341-2345.
- Passmore, S., Elble, R. and Tye, B.-K. (1992). A protein involved in minichromosome maintenance binds to a transcriptional enhancer conserved in eukaryotes. *Genes Dev.* *3*, 921-935.
- Paull, T. T., Carey, M. and Johnson, R. C. (1996). Yeast HMG proteins NHP6A/B potentiate promoter-specific transcriptional activation *in vivo* and assembly of preinitiation complexes *in vitro*. *Genes Dev.* *10*, 2769-2781.
- Payne, G. S., Bishop, J. M. and Varmus, H. E. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* *295*, 209-214.
- Perez-Martin, J. and Johnson, A. D. (1998). Mutations in chromatin components suppress a defect of Gcn5 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 1049-1054.
- Peterson, C. L. (2002). HDAC's at work: everyone doing their part. *Mol. Cell* *9*, 921-922.
- Pfeifer, G. P. and Riggs, A. D. (1991). Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR. *Genes Dev.* *5*, 1102-1113.
- Pflum, M. K., Tong, J. K., Lane, W. S. and Schreiber, S. L. (2001). Histone Deacetylase 1 Phosphorylation Promotes Enzymatic Activity and Complex Formation. *J. Biol. Chem.* *276*, 47733-47741.
- Pomerantz, J. L., Kristie, T. M. and Sharp, P. A. (1992). Recognition of the surface of a homeo domain protein. *Genes Dev.* *6*, 2047-2057.
- Quadbeck-Seeger, C. (1998). Identifizierung eines Regulators für *b*-regulierte Gene in *Ustilago maydis* (Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, München).
- Quadbeck-Seeger, C., Wanner, G., Huber, S., Kahmann, R. and Kämper, J. (2000). A protein with similarity to the human retinoblastoma binding protein 2 acts specifically as a repressor for genes regulated by the *b* mating type locus in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* *38*, 1-14.
- Quian, Y. C., Billeter, M., Otting, G., Müller, M., Gehring, W. H. and Wüthrich, K. (1989). The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* *59*, 573-580.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M. and Kahmann, R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J.* *16*, 1934-1942.
- Reichmann, M., Jamnischek, A., Weinzierl, G., Ladendorf, O., Huber, S., Kahmann, R. and Kämper, J. (2002). The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for spore development, eingereicht.

- Reinke, H., Gregory, P. D. and Hörz W. (2001). A transient histone hyperacetylation signal marks nucleosomes for remodeling at the *PHO8* promoter in vivo. *Mol. Cell* 7, 529-538.
- Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P. A., Jones, P. L. and Wolffe, A. P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* 25, 338-342.
- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N. and Grunstein M. (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* 109, 437-446.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R. and Kämper, J. (2000). Identification of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 37, 54-66.
- Romeis, T., Kämper, J. and Kahmann, R. (1997). Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1230-1234.
- Rossi, V., Hartings, H. and Motto, M. (1998). Identification and characterisation of an *RPD3* homologue from maize (*Zea mays* L.) that is able to complement an *rpd3* null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 258, 288-296.
- Ruiz-Herrera, J., Leon-Ramirez, C., Cabrera-Ponce, J. L., Martinez-Espinoza, A. D. and Herrera-Estrella, L. (1999). Completion of the sexual cycle and demonstration of genetic recombination in *Ustilago maydis* in vitro. *Mol. Gen. Genet.* 262, 468-472.
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M. and Grunstein, M. (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14503-14508.
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Suka, N., Turner, B. M. and Grunstein, M. (1998). Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* 392, 831-835.
- Sakurada, K., Ohta, T., Fujishiro, K., Hasegawa, M. and Aisaka, K. (1996). Acetylpolyamine amidohydrolase from *Mycoplana ramosa*: gene cloning and characterization of the metal-substituted enzyme. *J. Bacteriol.* 178, 5781-5786.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press).
- Sandoval, M. and Corcuera, V. R. (1998). *Zea mays* inbreds resistant to different populations of *Ustilago maydis* (DC) Corda. *MNL* 72, 49-57.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulsen, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schauwecker, F., Wanner, G. and Kahmann, R. (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 617-625.

- Schier, A. F. and Gehring, W. J. (1993). Functional specificity of the homeodomain protein *fushi tarazu*: the role of DNA-binding specificity *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1450-1454.
- Schlake, T., Klehr-Wirth, D., Yoshida, M., Beppu, T. and Bode, J. (1994). Gene expression within a chromatin domain: the role of core histone hyperacetylation. Biochemistry 33, 4197-4206.
- Schlesinger, R., Kahmann, R. and 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.
- Schmelzle, T., Helliwell, S. B. and Hall, M. N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. Mol. Cell. Biol. 22, 1329-1339.
- Schmitt, M. E., Brown, T. A. and Trumppower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acid Res. 18, 3091-3102.
- Schneuwly, S., Klemenz, R. and Gehring, W. J. (1987). Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. Nature 325, 816-818.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and Kahmann, R. (1990). The *b* alleles of *U.maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. Cell 60, 295-306.
- Sealy, L. and Chalkley, R. (1978). DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNaseI. Nucleic Acid Res. 5, 1863-1876.
- Selker, E. U. (1998). Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 9430-9435.
- Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C. and Boeke, J. D. (2000). A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6658-6663.
- Snetselaar, K. M. (1993). Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. Exp. Mycol. 17, 345-355.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. Mycologia 84, 193-203.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. Mycol. Res. 98, 347-355.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W. and Kahmann, R. (1994a). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* *13*, 1620-1627.
- Spellig, T., Regenfelder, E., Reichmann, M., Schauwecker, F., Bohlmann, R., Urban, M., Bölker, M., Kämper, J. and Kahmann, R. (1994b). Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* *65*, 191-197.
- Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A. J., Soll, D. R. (2001). The histone deacetylase genes *HDA1* and *RPD3* play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J. Bacteriol* *183*, 4614-4625.
- Stankis, M. M., Specht, C. A., Yang, H., Giasson, L., Ullrich, R. C. and Novotny, C. P. (1992). The *Aa* mating locus of *Schizophyllum commune* encodes two dissimilar multiallelic homeoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 7169-7173.
- Stark, M. R., Escher, D. and Johnson, A. D. (1999). A *trans*-acting peptide activates the yeast *a1* repressor by raising its DNA-binding affinity. *EMBO J.* *18*, 1621-1629.
- Steinberg, G., Wedlich-Söldner, R., Brill, M. and Schulz, I. (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J. Cell. Sci.* *114*, 609-622.
- Sternberg, P. W., Stern, M. J., Clark, I. and Herskowitz, I. (1987). Activation of the yeast *HO* gene by release from multiple negative controls. *Cell* *48*, 567-577.
- Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K. and Grunstein, M. (1997). SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* *11*, 83-93.
- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Söldner, R., Kahmann, R. and Steinberg, G. (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO J.* *20*, 5091-5100.
- Struhl, G. (1981). A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* *292*, 635-638.
- Sun, J. M., Chen, H. Y., Moniwa, M., Samuel, S. and Davie, J. R. (1999). Purification and characterization of chicken erythrocyte Histone Deacetylase 1. *Biochemistry* *38*, 5939-5947.
- Sun, Y., Taniguchi, R., Tanoue, D., Yamaji, T., Takematsu, H., Mori, K., Fujita, T., Kawasaki, T. and Kozutsumi, Y. (2000). Sli2 (Ypk1), a homologue of mammalian protein kinase SGK, is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated signaling pathway of yeast. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4411-4419.
- Sun, Z. W. and Hampsey, M. (1999). A general requirement for the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex in regulating silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *152*, 921-932.
- Taunton, J., Hassig, C. A. and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulatory Rpd3p. *Science* *272*, 408-411.

- Timberlake, W. E. (1986). Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, Volume *H1*, 343-357. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. and Schreiber, S. L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* *395*, 917-921.
- Topp, C. N., Ruiz-Herrera, J., Martinez-Espinoza, A. D. and Gold, S. E. (2002). Integration of the gene for carboxin resistance does not impact the *Ustilago maydis*-maize interaction. *Curr. Microbiol.* *44*, 67-70.
- Torreblanca, J., Stumpferl, S. and Basse, C. (2002). Histone deacetylase Hda1 acts as a repressor of the *Ustilago maydis* biotrophic marker gene *mig1*. eingereicht.
- Travers, A. (1999). An engine for nucleosome remodeling. *Cell* *96*, 311-314.
- Trueheart, J. and Herskowitz, I. (1992). The *a* locus governs cytoduction in *Ustilago maydis*. *J. Bacteriol.* *174*, 7831-7833.
- Tsukuda, T., Bauchwitz, R. and Holloman, W. K. (1989). Isolation of the REC1 gene controlling recombination in *Ustilago maydis*. *Gene* *85*, 335-341.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. and Holloman, W. K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 3703-3709.
- Urban, M., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996a). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* *251*, 31-37.
- Urban, M., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996b). 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.
- van Dijk, M. A. and Murre, C. (1994). *Extradenticle* raises the DNA-binding specificity of homeotic selector gene products. *Cell* *78*, 617-624.
- Verdone, L., Wu, J., van Riper, K., Kacherovsky, N., Vogelauer, M., Young, E. T., Grunstein, M., Di Mauro, E., Caserta, M. (2002). Hyperacetylation of chromatin at the *ADH2* promoter allows Adr1 to bind in repressed conditions. *EMBO J.* *21*, 1101-1111.
- Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* *87*, 95-104.
- Vidal, M. and Gaber, R. F. (1991). *RPD3* encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 6317-6327.
- Vidal, M., Strich, R., Esposito, R. E. and Gaber, R. F. (1991). *RPD1 (SIN3/UME4)* is required for maximal activation and repression of diverse yeast genes. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 6306-6316.

- Vidali, G., Boffa, L. C., Bradbury, E. M. and Allfrey, V. G. (1978). Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNaseI sensitivity of associated DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *75*, 2239-2243.
- Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N. and Grunstein, M. (2000). Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* *408*, 495-498.
- Wade, P. A. (2001). Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* *20*, 3166-3173.
- Wang, H., Clark, I., Nicholson, P. R., Herskowitz, I. and Stillman, D. J. (1990). The *Saccharomyces cerevisiae SIN3* gene, a negative regulator of *HO*, contains four paired amphipathic helix motifs. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 5927-5936.
- Wedlich-Söldner, R., Bölker, M., Kahmann, R. and Steinberg, G. (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.* *19*, 1974-1986.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M. W. and Steinberg, G. (2002). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.* *21*, 2946-2957.
- Weinzierl, G., Bohlmann, R., Brachmann, A., Steinberg, G., Aichinger, C., Kahmann, R. and Kämper, J. (2002). The membrane protein Dik6 is a novel virulence factor and a direct target of the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. eingereicht.
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G. and Bölker, M. (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* *45*, 219-231.
- Wessels, J. G. H. (1996). Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends Plant Sci.* *1*, 9-15.
- Wilson, K., Long, D., Swinburne, J. and Coupland, G. (1996). A Dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of *TINY*, an Arabidopsis gene related to *APETALA2*. *Plant Cell* *8*, 659-671.
- Wolberger, C., Vershon, A. K., Liu, B., Johnson, A. D. and Pabo, C. O. (1991). Crystal structure of a MATa2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* *67*, 517-528.
- Workman, J. L. and Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 545-579.
- Wösten, H. A. B., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bölker, M. and 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.

- Wösten, H. A. B., Schuren, F. H. and Wessels, J. G. (1994). Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* *13*, 5848-5854.
- Wong, G. J. and Wells, K. (1985). Modified bifactorial incompatibility in *Tremella mesenterica*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* *84*, 95-109.
- Wu, C. (1980). The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* *286*, 854-860.
- Xue, D., Tu, Y. and Chalfie, M. (1993). Cooperative interactions between the *Caenorhabditis elegans* homeoproteins UNC-86 and MEC-3. *Science* *261*, 1324-1328.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* *33*, 103-119.
- Zaret, K. (1999). Micrococcal nuclease analysis of chromatin structure. *Curr. Prot. Mol. Biol. Supplement* *45*, 21.1.1-21.1.3.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument, B. H., Tempst, P. and Reinberg, D. (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* *89*, 357-364.
- Zhang, Y., Leroy, G., Seelig, H. P., Lane, W. S. and Reinberg, D. (1998a). The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* *95*, 279-289.
- Zhang, Y., Sun, Z. W., Iratni, R., Erdjument, B. H., Tempst, P., Hampsey, M. and Reinberg, D. (1998b). SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol. Cell* *1*, 1021-1031.
- Zhou, Y. B., Gerchman, S. E., Ramakrishnan, V., Travers, A. and Muylldermans, S. (1998). Position and orientation of the globular domain linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* *395*, 402-405.

6. Anhang

6.1. Lebenslauf

1. Persönliche Daten

Name: Reichmann, Michael
 Geburtsort: Mainburg
 Geburtsdatum: 24. September 1967
 Adresse: Leonrodstr. 78/II, 80636 München

2. Ausbildung

1975-1987: Alfons Grundschule in München,
 Wittelsbacher Gymnasium in München
 1988-1994: Ludwig-Maximilians-Universität München
 Studium der Biologie, Hauptfach: Genetik
 Abschluss: Dipl. Biologe (Univ.)

3. Tätigkeiten während der Ausbildung

1987-1988: Zentrales Institut der Bundeswehr München
 Fachbereich: Veterinärmedizin und Lebensmittelchemie
 1992-1993: MPI für Biochemie in Martinsried
 Laborpraktikum bei Dr. J. Soppa/AG Prof. Dr. D. Oesterheldt
 Thema: "Etablierung eines Expressionssystems im Archaeobakterium
Haloferax volcanii"
 1993-1994: Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München
 Laborpraktikum bei Dr. J. Kämper/AG Prof. Dr. R. Kahmann
 Thema: "Genetische Analyse der Homeodomänen der b-Proteine aus
Ustilago maydis"
 Diplomarbeit bei Dr. J. Kämper/ AG Prof. Dr. R. Kahmann
 Thema: "Genetische Untersuchungen zur Interaktion von zwei
 Homeodomänenproteinen aus *Ustilago maydis*"

4. Beruf

1994-2000: Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Genetik und Mikrobiologie
 der Universität München mit dem Ziel der Dissertation (AG Prof. Dr. R.
 Kahmann)
 Thema: "Isolierung und Analyse haploider *Ustilago maydis* Stämme, die
 ein *b*-abhängiges Expressionsmuster zeigen"
 seit 2000: Wissenschaftlicher Angestellter an der Bayerischen Landesanstalt für
 Bodenkultur und Pflanzenbau, Abt. Pflanzenzüchtung, PZ3b
 Bearbeiter eines StMLF-geförderten Projekts
 Thema: "Markerfreie Transformation"
 Projektleiter eines BMBF-geförderten Teilprojekts
 Thema: "Erzeugung Markergen-freier Pflanzen durch Nutzung des $\gamma\delta$
 Resolvase/*res* Rekombinationssystems"

München, 29. Juli 2002

6.2. Danksagung

Frau Professor Dr. Regine Kahmann hat mir die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Genetik der Universität München ermöglicht. Hierfür und für ihre Geduld und Unterstützung während des gesamten Arbeitsfortschritts möchte ich ihr ausdrücklich danken.

Herrn PD Dr. Jörg Kämper danke ich insbesondere für die wissenschaftliche Betreuung und sein persönliches Engagement, das maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeiten beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt allen Mitgliedern des *a* und *b*-Labors, die mich so freundschaftlich begleitet und zu einem angenehmen Arbeitsklima am Institut für Genetik beigetragen haben.

6.3. Veröffentlichungsliste

Teile dieser Arbeit wurden Molecular Microbiology zur Veröffentlichung vorgelegt:

Reichmann, M., Jamnischek, A., Weinzierl, G., Ladendorf, O., Huber, S., Kahmann, R. and Kämper, J. (2002). The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for spore development, eingereicht.