

**Pathogenitätsrelevante Signalkaskaden in  
*Ustilago maydis*: Identifikation von Zielgenen**

**Dissertation**

**zur**

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

**dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von**

**Heiko Eichhorn  
aus Neustadt /Weinstr.**

**Marburg/Lahn 2004**



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann von Januar 2000 bis Ende April 2004 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

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

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

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

Teile dieser Arbeit wurden/werden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt G., Mewes, W. and R. Kahmann** (2003) Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. Mol Gen Genomics, **270**, 303-314.

**Eichhorn, H., Lessing, F., Kämper, J., Müller, P. and R. Kahmann** (2004) A High Affinity Iron Permease is Required for Virulence in *Ustilago maydis*. Plant Cell, resubmission encouraged.



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel “Pathogenitätsrelevante Signalkaskaden in *Ustilago maydis*: Identifikation von Zielgenen“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

---

(Ort, Datum)

---

Heiko Eichhorn



## Zusammenfassung

In *Ustilago maydis* sind drei Signalwege bekannt, die für die pathogene Entwicklung dieses Brandpilzes essentiell sind. Während die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade und der cAMP-Weg für den Paarungsprozess und die Ausbildung von frühen Infektionsstrukturen benötigt werden, ist die Kpp6-MAPK-Kaskade entscheidend für die Penetration der Blattoberfläche. Bisher waren nur wenige Zielgene dieser Signalwege bekannt.

In dieser Arbeit wurden isogene Stämme konstruiert, die eine regulierbare genetische Aktivierung der einzelnen Signalkaskaden ermöglichen. Durch genomweite Microarray-Analysen wurde das Transkriptom dieser Stämme untersucht und mit der Situation nach Pheromonstimulation verglichen. Unter den differentiell regulierten Genen konnten neben zahlreichen bekannten auch eine Vielzahl neuer Zielgene identifiziert werden. Vergleichende Analysen der Transkriptome zeigen, dass eine deutliche Überlappung der Signalwege vorliegt. An der Regulation dieses Netzwerks sind neben dem HMG-Domänen Transkriptionsfaktor Prf1 weitere Komponenten beteiligt, die vermutlich posttranskriptionell reguliert werden.

Nach Aktivierung des cAMP-Wegs wurden drei koregulierte Gencluster identifiziert, die eine potentielle Funktion bei der Eisenaufnahme haben. Unter den koregulierten Genen befinden sich Vertreter des reduktiven und des nicht-reduktiven Eisenaufnahmesystems, u.a. die bereits bekannten Gene *sid1* und *sid2*, die für eine Ornithin-5-Monooxygenase und eine Ferrichrom-Siderophoren-Peptidsynthetase kodieren. Für die Expression dieser Gene wird ein intakter cAMP-Weg benötigt, darüber hinaus werden die Gene durch Eisen reprimiert. Da bereits bekannt war, dass das nicht-reduktive Eisenaufnahmesystem keine Rolle bei der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* spielt, konzentrierte sich die Arbeit auf die hochaffine Eisenpermease die Teil des reduktiven Eisenaufnahmesystems ist. Durch Komplementation einer Hefemutante konnte gezeigt werden, dass *fer2* für eine funktionelle Eisenpermease kodiert.  $\Delta fer2$ -Mutanten zeigen einen Wachstumsdefekt auf Eisenmangelmedium. In der Pflanze ist die Proliferation solcher Mutanten stark reduziert und die Ausbildung von Pathogenitätssymptomen deutlich abgeschwächt. Dies zeigt, dass Komponenten des reduktiven Eisenaufnahmesystems Virulenzfaktoren in *U. maydis* sind.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

A	Adenin	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
aa	Aminosäure(n)	ORF	„open reading frame“
Amp	Ampicillin	PCR	„polymerase chain reaction“
Ara	Arabinose	PD	„potato dextrose“
bp	Basenpaar(e)	PEG	Polyethylenglycol
C	Cytosin oder „carbon“, Kohlenstoff	Phleo	Phleomycin
CC	„charcoal“, Aktivkohle	p.i.	„post infection“
C-terminal	carboxyterminal	PIPES	Piperazine N-N'-bis(2-Ethansulphonat)
Cbx	Carboxin	PKA	Proteinkinase A
CM	„complete medium“	PRE	„pheromon response element“
DIC	„differential interference contrast“	„probe set“	Gesamtheit von 33 verschiedenen Oligonukleotiden, die jeweils ein Gen auf dem <i>U. maydis</i> -Microarray repräsentieren (Affymetrix)
DMSO	Dimethylsulfoxid	R	Nukleotid A oder G, oder Arginin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	REMI	„restriction enzyme mediated integration“
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“	RT	reverse Transkription oder Raumtemperatur
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	T	Thymin
FC	„fold change“, faktorielle Expressionsänderung	TAE	Tris-Acetat + Na <sub>2</sub> -EDTA
G	Guanin	TBE	Tris-Borat + Na <sub>2</sub> -EDTA
GFP	„green fluorescent protein“	TE	Tris-Cl + Na <sub>2</sub> -EDTA
Gluk	Glukose	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	U	„Unit“, Enzymaktivitätseinheit
HMG	„high mobility group“	UARS	„ <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence“
HPLC	„high performance liquid chromatography“	Upm	Umdrehungen pro Minute
Hyg	Hygromycin	UTR	untranslatierte Region
kb	Kilobasenpaar(e)	UV	ultraviolettes Licht
MAPK	„mitogen activated protein kinase“	W	Nukleotid A oder T, oder Tryptophan
MAPKK	MAPK-Kinase	WT	Wildtyp
MAPKKK	MAPKK-Kinase	Y	Nukleotid C oder T, oder Tyrosin
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat		sowie Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code
mRNA	„messenger RNA“		
N-terminal	aminoterminal		
Nat	Nourseothricin		
NM	Nitrat-Minimalmedium		



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE .....</b>	<b>II</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Pathogene Pilze als Modellorganismen .....	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i> .....	2
1.3 Die Pheromonantwort.....	5
1.4 Essentielle Signalwege für die Pathogenität.....	7
1.5 Strategien zur Identifizierung von Zielgenen pathogenitätsrelevanter Signalkaskaden.....	11
1.6 Fragestellung dieser Arbeit.....	13
<b>2. ERGEBNISSE.....</b>	<b>14</b>
2.1 Weitergehende Analyse des <i>p</i> -Locus.....	14
2.1.1 Die Größe des <i>p</i> -Locus.....	14
2.1.2 Der <i>p</i> -Locus hat keinen Einfluss auf die pathogene Entwicklung.....	17
2.2 Untersuchung der Regulation von <i>pig4</i> .....	18
2.2.1 <i>In vivo</i> Expressionsanalyse von <i>pig4</i> während der biotrophen Phase von <i>U. maydis</i> .....	18
2.2.2 Isolierung eines negativen Regulators von <i>pig4</i> .....	20
2.2.3 Charakterisierung des Gens, das die KHP#42 Mutante komplementiert .....	23
2.3 Transkriptomanalyse pathogenitätsrelevanter Signalwege .....	25
2.3.1 Genomweite Expressionsanalyse nach Pheromonstimulierung .....	25
2.3.2 Identifizierung von bekannten und neuen Zielgenen der Pheromonantwort .....	28
2.4 Konstruktion von Stämmen mit aktivierbaren Signalkaskaden .....	33
2.5 Genomweite Expressionsanalyse Kpp2- und Kpp6-regulierter Gene.....	35
2.5.1 Charakterisierung der Stämme HE121, HE125, HE127 und HE131 .....	35
2.5.2 Die MAP-Kinase Kpp2 reguliert die Expression einer großen Anzahl von Genen.....	38
2.5.3 Identifizierung von Genen, die abhängig bzw. unabhängig von Prf1 reguliert werden .....	42
2.5.4 Weitergehende Analyse ausgewählter Kpp2- bzw. Pheromon-regulierter Gene .....	48
2.5.5 Kpp6-regulierte Gene.....	52
2.6 Genomweite Expressionsanalyse nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs.....	53

2.6.1	Charakterisierung des Stamms HE140 .....	53
2.6.2	Identifizierung Adr1-abhängig regulierter Gene .....	55
2.6.3	Identifizierung von drei koregulierten Genclustern mit vermutlicher Funktion bei der Eisenaufnahme .....	59
2.6.4	Die Expression der <i>fer</i> -Gene wird durch Eisen reprimiert .....	63
2.6.5	Zur Expression der <i>fer</i> -Gene wird ein intakter cAMP-Signalweg benötigt.....	64
2.7	Untersuchung des Gens für eine hochaffine Eisenpermease ( <i>fer2</i> ).....	65
2.7.1	Die Expression von <i>fer2</i> wird durch cAMP induziert .....	66
2.7.2	<i>fer2</i> kann den Phänotyp der <i>S. cerevisiae</i> <i>fir1</i> -Mutante komplementieren .....	67
2.7.3	Fer2 ist in der Zellmembran lokalisiert .....	68
2.7.4	<i>fer2</i> wird in der späten Infektionsphase exprimiert .....	69
2.7.5	Deletionsmutanten der hochaffinen Eisenpermease zeigen einen drastischen Pathogenitätsdefekt.....	70
2.7.6	<i>fer2</i> -Deletionsmutanten zeigen einen Wachstumsdefekt auf Eisenmangelmedium .....	73
2.7.7	<i>U. maydis</i> Siderophoren komplementieren den Wachstumsdefekt von <i>fer2</i> - Deletionsmutanten .....	74
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
3.1	Der <i>p</i> -Locus in <i>U. maydis</i> .....	75
3.2	Die genomweite Transkriptionsanalyse in <i>U. maydis</i> .....	78
3.2.1	Die Annotationsproblematik des <i>U. maydis</i> Genoms .....	78
3.2.2	In wie weit reflektieren die induzierbaren Stämme die natürliche Situation? .....	79
3.3	Regulation von Genen durch die Proteinkinase Adr1 .....	81
3.4	Identifizierung von Zielgenen der MAP-Kinase Kpp2 .....	84
3.4.1	Neben Prf1 regulieren weitere Transkriptionsfaktoren die Signalantwort von Kpp2.....	87
3.5	Die genomweite Expressionsanalyse der Pheromonantwort.....	94
3.5.1	Regulation des Zellzyklus während der Pheromonantwort .....	95
3.6	Werden zusätzliche Komponenten zur Aktivierung von Genen, die unterhalb von Kpp6 liegen, benötigt?.....	97
3.7	Die Eisengencluster in <i>U. maydis</i> .....	99
3.7.1	Die Regulation der Gene der Eisengencluster .....	102
3.7.2	Die Eisenpermease <i>fer2</i> ist ein Virulenzfaktor .....	104
3.7.3	Modellvorstellung zur Eisenaufnahme in <i>U. maydis</i> .....	105
3.8	Ausblick.....	106
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>108</b>
4.1.1	Material und Bezugsquellen .....	108
4.1.2	Oligonukleotide .....	111

---

4.1.3	Stämme.....	115
4.1.4	Herstellung und funktionelle Charakterisierung der Stämme HE114 und HE117, HE127 und HE131 .....	119
4.1.5	Plasmide und Plasmidkonstruktionen.....	119
4.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden .....	126
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	126
4.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	127
4.2.3	<i>Ustilago maydis</i> .....	127
4.3	Molekularbiologische Standardmethoden.....	130
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren und Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	131
4.3.2	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäure.....	132
4.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse .....	134
4.3.4	PCR-Techniken .....	135
4.4	Genomweite Expressionsanalyse von <i>U. maydis</i> .....	137
4.4.1	Herstellung der „Microarray-Targets“ .....	137
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>139</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>150</b>
6.1	Übersicht der Daten auf der beiliegenden CD .....	150
6.1.1	Sequenzdaten.....	150
6.1.2	Microarray-Daten (dChip Dateiformat) .....	150
6.1.3	Auswertung der Microarray-Experimente.....	150



# 1. Einleitung

## 1.1 Pathogene Pilze als Modellorganismen

Neben der Herausforderung die Biologie von Pilzen als vergleichsweise „einfache“ Organismen ganzheitlich zu verstehen, hat seit langer Zeit die Untersuchung und Bekämpfung von Pilzkrankheiten einen hohen sozialen, wirtschaftlichen und damit auch politischen Stellenwert. Bereits aus der frühen Geschichte sind Beispiele bekannt, in denen Pilzkrankheiten zu Ernteaussfällen und daraus folgend zu dramatischen Hungersnöten führten (Agrios, 1997). Auch in der heutigen, modernen Landnutzung dominieren pilzliche Erreger unter den Verursachern von Pflanzenkrankheiten (Agrios, 1997). In Mitteleuropa werden ca. 83 % der Infektionskrankheiten der wichtigsten Kulturpflanzen durch Pilze ausgelöst. Die übrigen werden durch Viren, Viroide, Bakterien und Nematoden verursacht (Müller und Loeffler, 1992). Weltweit wird der durch Pilze verursachte Ertragsausfall auf bis zu 25 % geschätzt (Müller und Loeffler, 1992; Weber, 1993; Agrios, 1997).

Im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte entwickelten sich der reispathogene Ascomycet *Magnaporthe grisea* und der maispathogene Basidiomycet *Ustilago maydis* zu wichtigen Modellorganismen zur Untersuchung phytopathogener Pilze. *U. maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrands. Zu den hervorragenden Eigenschaften von *U. maydis* zählt, dass sein Lebenszyklus unter kontrollierten Laborbedingungen innerhalb von zwei bis drei Wochen untersucht werden kann. Darüber hinaus können in diesem Modellorganismus eine Vielzahl von molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungsmethoden durchgeführt werden. Nicht zuletzt bildet die seit 2003 öffentlich vorliegende Genomsequenz eine Grundlage zur Untersuchung komplexer Regulationsmechanismen mittels neuer genomweiter Versuchstrategien.

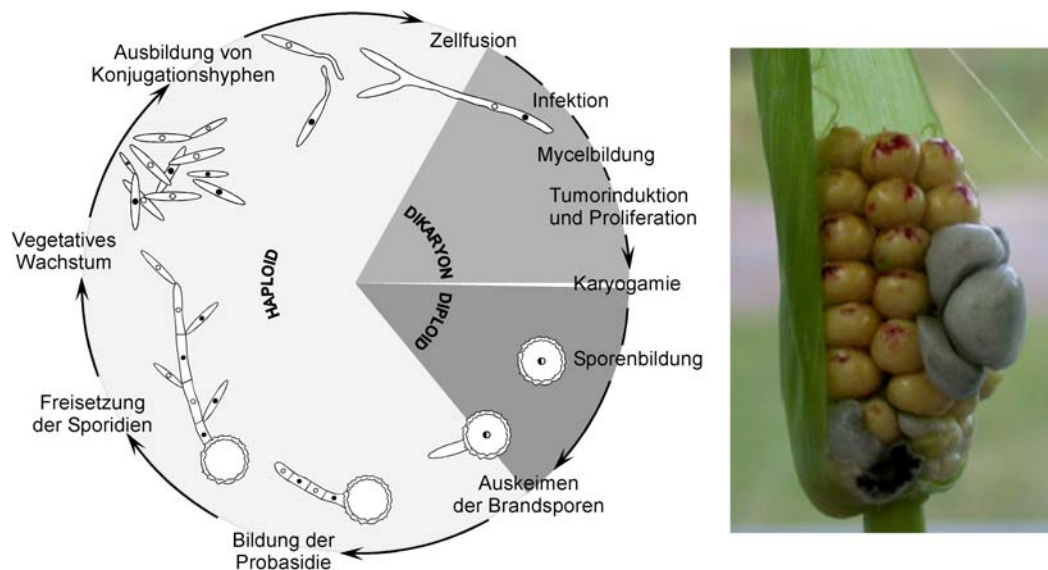
Neben Pflanzenkrankheiten, die durch pilzliche Erreger ausgelöst werden, haben in den letzten Jahren auch durch humanpathogene Pilze verursachte Erkrankungen des Menschen stark an Bedeutung gewonnen. Insbesondere immunsupprimierte Patienten, deren Abwehrsystem durch eine Primärerkrankung geschwächt ist, sind sehr

empfindlich für eine Pilzinfektion (Guarro *et al.*, 1999). Zu den häufigsten Erregern zählt der Basidiomycet *Cryptococcus neoformans* der auch als *Filobasidiella neoformans* bezeichnet wird (Hogan *et al.*, 1996; Guarro *et al.*, 1999). Daneben gehören die Ascomyceten *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* und *Histoplasma capsulatum* zu den wichtigen und am besten untersuchten pathogenen Pilzen des Menschen (Hogan *et al.*, 1996; Guarro *et al.*, 1999). Zur Bekämpfung stehen nur eine begrenzte Anzahl von Wirkstoffen zur Verfügung. Hauptsächlich kommen dabei Hemmstoffe der Sterol-Biosynthese, welche die pilzliche Zellwandsynthese stören, zum Einsatz (Vanden Bossche *et al.*, 1998). Im Bereich des Pflanzenschutzes dominieren ebenfalls die zuvor genannten Hemmstoffe der Sterol-Biosynthese, daneben werden in den letzten Jahren zunehmend spezifische Inhibitoren der Atmungskette eingesetzt, beispielsweise Komplex-II- und Komplex-III-Inhibitoren (Oerke und Steiner, 2003). In beiden Fällen handelt es sich zumeist um sogenannte „single site“ Inhibitoren, das heißt die fungizide Wirkung kommt durch die Störung einer spezifischen Stoffwechselreaktion zustande. Neben den meist günstigen Umwelteigenschaften solcher spezifischen Hemmstoffe wurde in den letzten Jahren verstärkt die Ausbildung von Resistenzen beobachtet. Teilweise handelt es sich hierbei um monogene Mechanismen (Oerke und Steiner, 2003). Nicht zuletzt aus diesem Grund wird verstärkt versucht, die molekularen Mechanismen der Interaktion pathogener Pilze mit ihrem Wirtsorganismus zu verstehen. Dieses Wissen kann langfristig genutzt werden um neue, selektive, antifungische Wirkstoffe zu entwickeln, die zugleich bessere Eigenschaften in Bezug auf ihre Wirkung und ihr Umweltverhalten haben (De Backer und Van Dijck, 2003; Leroux, 2003).

## 1.2 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Der Heterobasidiomycet *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrands. Die Symptome dieser Krankheit wurden bereits 1754 von Bonnet beschrieben, der Name *Ustilago maydis* wurde hingegen erst im Jahre 1944, nach den damaligen Regeln der botanischen Nomenklatur, eingeführt (Bonnet, 1754; Christensen, 1963). Verglichen mit anderen Pilzen, beispielsweise den Rostpilzen, besitzt *U. maydis* einen relativ einfachen Lebenszyklus (Kahmann *et al.*, 2000). Hierbei wechselt der Pilz zwischen drei verschiedenen Kernphasen: Sporidien sind haploid und wachsen saprophytisch. Für

die erfolgreiche Infektion von Maispflanzen ist die Fusion zweier kompatibler Sporidien Voraussetzung. Hierzu müssen die Fusionspartner unterschiedliche Paarungstyploci tragen (Rowell und DeVay, 1954; Rowell, 1955; Holliday, 1961; Puhalla, 1968). Wenn zwei kompatible Sporidien aufeinandertreffen, sind sie in der Lage sich gegenseitig durch ein Pheromon/Rezeptor-System wahrzunehmen (Kahmann *et al.*, 2000).



**Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** Schematische Darstellung des Lebenszyklus (links). Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Knospung. Nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien wird ein dikaryotisches Filament ausgebildet und damit die Voraussetzung zur Infektion und zur Proliferation in der Wirtspflanze. Auf der rechten Seite ist eine typische Tumorbildung an einem Maiskolben gezeigt (*Zea mays*, Varietät Gaspé Flint). Im unteren Bereich ist ein aufgeschnittener Tumor zu sehen, der mit reifen Brandsporen gefüllt ist. Einzelheiten sind im Text beschrieben. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von J. Schirawski zur Verfügung gestellt.

Die Zellen des jeweils anderen Paarungstyps antworten dabei mit der Ausbildung von Konjugationshyphen, die aufeinander zuwachsen, fusionieren und ein dikaryotisches Filament ausbilden (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996). Dieser morphologische Wechsel kann im Labor auf aktivkohlehaltigen Platten sichtbar gemacht werden (Day *et al.*, 1971). Die dikaryotischen Hyphen bilden unter diesen Bedingungen ein weißes Myzel aus und sind damit leicht von den haploiden Sporidien zu unterscheiden, die Kolonien mit einer glatten, grauen Oberfläche bilden. Auf der Pflanzenoberfläche bildet das Dikaryon eine Infektionsstruktur aus, die den Appressorien anderer phytopathogener Pilze, beispielsweise *M. grisea*, ähnlich ist

(Snetselaar und Mims, 1992, 1993). In der Pflanze wächst das Dikaryon überwiegend intrazellulär, dabei treten als erste Symptome Chlorosen und Anthocyanbildung auf (Banuett und Herskowitz, 1994b; Snetselaar und Mims, 1994). Nach der Fusion der Zellkerne beginnt die diploide Phase und die Ausbildung von sogenannten Tumoren (Gallen). Bei diesem Entwicklungsschritt werden zunächst sogenannte sporogene Hyphen ausgebildet, aus denen die Teliosporen hervorgehen (Banuett und Herskowitz, 1994b). Im reifen Stadium ist der Tumor mit einer enormen Menge an Sporen ( $2,5-6 \times 10^9/\text{cm}^3$ ) gefüllt (Christensen, 1963). Die Hülle dieser Sporen ist dunkelgrau pigmentiert was dem infizierten Gewebe ein „verbranntes“ Aussehen verleiht und zu dem Namen Maisbeulenbrand geführt hat (Christensen, 1963; Banuett und Herskowitz, 1994b). Durch das Aufbrechen der Tumore werden die Teliosporen freigesetzt und können durch Wind und Regen verbreitet werden. Der Lebenszyklus endet nach der Auskeimung mit einer Meiose, bei der erneut haploide Sporiden gebildet werden (Christensen, 1963). Der Lebenszyklus kann nun von neuem beginnen.

Von besonderem Interesse am *U. maydis*/Mais-Testsystem ist, dass die Interaktion mit der Wirtspflanze eine absolute Voraussetzung für die sexuelle Entwicklung darstellt. Die Proliferation des Dikaryons konnte außerhalb der Pflanze noch nicht beobachtet werden. In der Literatur wurde zwar ein *in vitro* Testsystem beschrieben, das die Vollendung des Lebenszyklus außerhalb der Pflanze ermöglichen soll (Ruiz-Herrera *et al.*, 1999), es war jedoch nicht möglich gewesen diese Ergebnisse zu reproduzieren (R. Kahmann, pers. Mitteilung). Darüber hinaus konnte auch die Ausbildung von Appressorien-artigen Infektionsstrukturen unter Laborbedingungen noch nicht nachgewiesen werden. Es wird daher angenommen, dass die Pflanze chemische Komponenten produziert, die für die Ausbildung von Infektionsstrukturen bzw. die Proliferation des Dikaryons essentiell sind. Hierbei scheint auch die physikalische Beschaffenheit der Blattoberfläche wichtig zu sein. Welche Faktoren diese Aufgabe übernehmen ist bislang nicht bekannt. Auch auf der pilzlichen Seite ist weitgehend ungeklärt, welche Zielgene an der Steuerung dieses pflanzenabhängigen Entwicklungsprogramms beteiligt sind.



### 1.3 Die Pheromonantwort

Erst die Fusion zweier kompatibler Sporidien führt zur Ausbildung des Dikaryons, welches die pathogene Form von *U. maydis* ist. Bei der hierzu erforderlichen Pheromonstimulierung werden eine Reihe von transkriptionellen und morphologischen Veränderungen ausgelöst (für eine Übersicht siehe Kahmann *et al.*, 2000). Die Gesamtheit dieser Vorgänge wird als Pheromonantwort bezeichnet und ist auf morphologischer Ebene durch die Ausbildung von Konjugationshyphen gekennzeichnet, die gerichtet auf die Pheromonquellen zuwachsen (Snetselaar *et al.*, 1996). Die Kompatibilität haploider *U. maydis* Sporidien wird dabei von den genetisch unabhängigen *a*- und *b*-Paarungstyploci vermittelt. Der *a*-Locus ist biallelisch und kodiert für die Komponenten eines Pheromon/Rezeptor-Systems, das für die Erkennung und Fusion zweier Zellen gebraucht wird. Beide Allele kodieren für einen Pheromonvorläufer (Mfa1 bzw. Mfa2) und für einen Rezeptor (Pra1 bzw. Pra2). Die Rezeptoren sind membranständig und binden das sekretierte Pheromon des anderen Partners (Bölker *et al.*, 1992). Dagegen ist der multiallelische *b*-Locus für das filamentöse Wachstum und die pathogene Entwicklung verantwortlich. Jedes *b*-Allel umfasst zwei divergent transkribierte Gene, *bE* und *bW*, die für Homeodomänenproteine kodieren. Nur wenn nach der Plasmogamie *bE*- und *bW*-Proteine vorliegen, die von unterschiedlichen Allelen abstammen, kann ein aktives *b*-Heterodimer ausgebildet werden (Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990; Banuett, 1991; Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995). Proteine die vom selben Allel kodiert werden, können kein funktionelles Heterodimer bilden und sind folglich nicht in der Lage ein stabiles Dikaryon aufrecht zu erhalten (Banuett, 1995). Die Pheromon-induzierte Expression der Gene des *a*- und *b*-Locus wird durch *cis*-aktive Sequenzmotive PREs („pheromone response elements“) vermittelt. An diese regulatorischen Sequenzen bindet der zentrale Transkriptionsfaktor der Pheromonantwort, Prf1 (Hartmann *et al.*, 1996). Dieser Transkriptionsfaktor gehört zur Familie der HMG-Box-Proteine und ist für die Pheromon-induzierte Expression der Gene der Paarungstyploci verantwortlich (Hartmann *et al.*, 1999). Untersuchungen mit *prf1*-Deletionsmutanten haben darüber hinaus gezeigt, dass Prf1 auch für die basale Expression der *a*- und *b*-Gene essentiell ist. *Aprf1*-Mutanten sind steril und reagieren weder auf Pheromon noch kann eine Fusion mit kompatiblen Wildtypzellen erfolgen. Die Regulation von Prf1 ist komplex. Auf

transkriptioneller Ebene wird *prf1* neben dem Pheromonsignal auch durch die Kohlenstoffquelle reguliert (Hartmann *et al.*, 1999). Auf posttranskriptioneller Ebene integriert Prf1 die Signale des cAMP-Wegs und einer MAPK-Kaskade (Kaffarnik *et al.*, 2003), die aus den Komponenten Kpp4 (MAPKKK), (Andrews *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2003b), Fuz7 (MAPKK), (Banuett und Herskowitz, 1994a) und der MAP-Kinase Kpp2 (Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999) besteht (Abbildung 2). Die Phosphorylierung mehrerer MAPK- sowie PKA-Phosphorylierungsstellen in Prf1 ist essentiell für die induzierte Expression der *a*- und *b*-Gene. Stämme bei denen diese Stellen mutiert wurden besitzen ein gestörtes Paarungsverhalten (Kaffarnik *et al.*, 2003). Während Prf1 für die Transkriptionsregulation der Gene des *a*- und *b*-Locus essentiell ist, wird die Konjugationshyphenbildung abhängig von dem Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Modul aber unabhängig von Prf1 reguliert (Müller *et al.*, 2003b). Ob ein weiterer Transkriptionsfaktor an der Regulation dieses morphologischen Wechsel beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt.

Neben der MAPK-Kaskade ist der cAMP-Signalweg an der Übertragung des Pheromonsignals in *U. maydis* beteiligt. Die Hauptkomponenten dieser Signalkaskade sind die Adenylatzyklase, Uac1, sowie die regulatorische und die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A, Ubc1 und Adr1 (Barrett *et al.*, 1993; Orth *et al.*, 1995; Gold *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998), (vergl. Abbildung 2). Unter Bedingungen in denen ein hoher cAMP-Spiegel vorliegt oder imitiert wird, ist die Expression der *a*-Gene erhöht, dagegen führt die Deletion von *uac1* oder *adr1* zu Defekten in der Paarungskompetenz (Dürrenberger *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 1998; Krüger, 1999). Wie das Pheromonsignal nach Bindung des Rezeptors auf die MAPK-Kaskade und den cAMP-Signalweg übertragen wird, ist unklar. Eine wichtige Funktion hierbei haben die G-Protein Untereinheiten, Gpa3 ( $\alpha$ -Untereinheit) und Bpp1 ( $\beta$ -Untereinheit). Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass es sich um Komponenten der cAMP-Signalkaskade handelt (Regenfelder *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2004). *gpa3*- bzw. *bpp1*-Deletionsmutanten wachsen filamentös. Dies spiegelt einen niedrigen intrazellulären cAMP-Level wieder. Die Paarungskompetenz ist in diesen Mutanten reduziert und kann durch Zugabe von cAMP ins Medium kompensiert werden (Regenfelder *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998; Krüger, 1999; Müller *et al.*, 2004). Darüber hinaus werden die Regulatoren Ras1 und Ras2 als mögliche Verbindungsglieder der Pheromon-

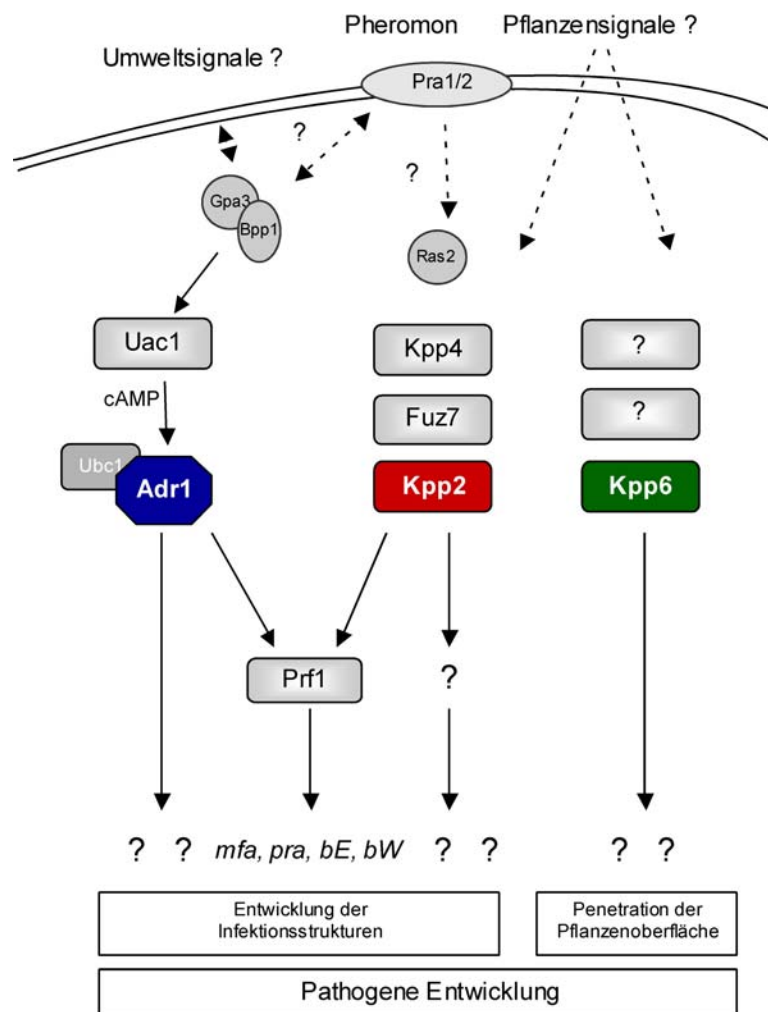
signalweiterleitung über den cAMP-Weg und die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade diskutiert (Lee und Kronstad, 2002; Müller *et al.*, 2003a).

## 1.4 Essentielle Signalwege für die Pathogenität

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen pilzlichen Organismen gezeigt, dass insbesondere zwei Signalweiterleitungssysteme an der Regulation pathogener Entwicklung beteiligt sind. Hierbei handelt es sich einerseits um die Signalweiterleitung durch MAPK-Kaskaden, andererseits spielt die Regulation durch cAMP-Signalwege eine wichtige Rolle (Xu und Hamer, 1996; Borges-Walmsley und Walmsley, 2000; Xu, 2000; D'Souza *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). In *U. maydis* sind drei Signalkaskaden bekannt, die eine entscheidende Funktion während der pathogenen Entwicklung haben: die Kpp2-MAPK-Kaskade, die Kpp6-MAPK-Kaskade und der cAMP-Signalweg (Barrett *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2003b), (Abbildung 2). Um Effekte der Signalwege auf die Zellfusion auszuschließen, wurden für diese Untersuchungen solopathogene Stämme herangezogen, die das pathogene Programm ohne vorherige Zellfusion imitieren können (Regenfelder *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998; Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003b).

In Bezug auf die MAP-Kinase-Signalweiterleitung konnte gezeigt werden, dass Stämme in denen *kpp4* oder *fuz7* deletiert wurden, einen vollständigen Verlust der Pathogenität aufweisen (Müller *et al.*, 2003b). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Pathogenitätsverlust solcher Mutanten auch nicht durch die konstitutive Expression eines aktiven b-Heterodimers, dem zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung, wieder hergestellt werden kann (Müller *et al.*, 2003b). Diese Beobachtung unterstreicht, dass Kpp4 und Fuz7 neben der Regulation der *b*-Gene noch weitere Funktionen während der pathogenen Entwicklung besitzen (Müller *et al.*, 2003b). Mutanten in denen entweder *kpp2* oder *kpp6* deletiert wurde, zeigen dagegen nur eine reduzierte Pathogenität (Müller *et al.*, 1999; Brachmann *et al.*, 2003). Interessanterweise sind jedoch Doppelmutanten, in denen beide Kinasen deletiert wurden, apathogen (Brachmann *et al.*, 2003). Stämme, in denen das Wildtyp *kpp2*-Allel durch ein nicht-phosphorylierbares *kpp2AEF*-Allel ersetzt wurde, waren ebenfalls apathogen. Der Pathogenitätsverlust konnte darauf zurückgeführt werden, dass solche Stämme keine Infektionsstrukturen ausbilden können und somit den gleichen Phänotyp wie  $\Delta kpp4$ -

und *Δfuz7*-Stämme aufwiesen (Müller *et al.*, 2003b). Durch die Konstruktion von Stämmen, die das nicht-aktivierbare *kpp6AEF*-Allel tragen, konnte demonstriert werden, dass die Ausbildung von Appressorien in solchen Mutanten normal verläuft, allerdings waren diese Stämme nicht in der Lage die Blattoberfläche zu penetrieren (Brachmann *et al.*, 2003). Somit konnte gezeigt werden, dass *kpp2* und *kpp6* während der pathogenen Entwicklung redundante und spezifische Funktionen haben. Auf Grund



**Abbildung 2: Die Signalweiterleitung während der Pheromonantwort und der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*.** In *U. maydis* sind drei Hauptsignalwege bekannt: die Kpp2-MAPK-Kaskade, die Kpp6-MAPK-Kaskade und die cAMP-Kaskade. Alle drei Signalwege sind essentiell für die pathogene Entwicklung. Gestrichelte Linien kennzeichnen mögliche Interaktionen. Fragezeichen stehen für bislang unbekannte Komponenten und Zielgene. Einzelheiten siehe Text (modifiziert nach Müller, 2003).

dieser Beobachtungen wurde auch postuliert, dass sowohl Kpp2 als auch Kpp6 von Fuz7 aktiviert werden können (Brachmann *et al.*, 2003). Diese Hypothese konnte durch Hefe-Zweihybrid-Analysen unterstützt werden, in denen eine direkte Interaktion zwischen Kpp4, Kpp6 und Kpp2 nachgewiesen wurde (Müller, 2003). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Kpp4 daran beteiligt sein könnte beide MAP-Kinasen zu rekrutieren. Während die Aktivierung von Kpp2 durch Fuz7 auch durch biochemische Experimente bestätigt wurde, wurde ein solcher Nachweis für Kpp6 noch nicht erbracht (Müller *et al.*, 2003b).

Für die MAP-Kinase Kpp2 sind bereits einige direkte und indirekte Zielgene bekannt. Das bisher am besten untersuchte Target von Kpp2 ist der zentrale Transkriptionsfaktor Prf1. Kpp2 hat sowohl auf die basale, als auch auf die induzierte Expression von *prf1* einen Einfluss (Müller *et al.*, 1999). Wie bereits zuvor beschrieben wurde ist Prf1 sowohl an der basalen, als auch an der induzierten Expression der *a*- und *b*-Gene beteiligt. Mehrere der potentiellen MAPK-Phosphorylierungsstellen in Prf1 sind für die induzierte Expression der *b*-Gene wichtig (Kaffarnik *et al.*, 2003). Dagegen wird die Kpp2-abhängige Induktion der *a*-Gene in erster Linie über eine Transkriptionsaktivierung von *prf1* vermittelt (Kaffarnik *et al.*, 2003). Über welche Faktoren Kpp2 die transkriptionelle Regulation von *prf1* vermittelt ist unklar. Vor kurzem konnte ein weiterer HMG-Box Transkriptionsfaktor, *rop1*, als weiteres potentielles Zielgen von Kpp2 identifiziert werden (T. Brefort, nicht publiziert). Für Rop1 konnte gezeigt werden, dass es sich um einen Regulator der *prf1* Expression handelt. Das Protein weist drei potentielle MAP-Kinase Phosphorylierungsmotive auf (T. Brefort, nicht publiziert). Analog zu Analysen von MAPK-Signalwegen in anderen Pilzen, beispielsweise *S. cerevisiae*, kann davon ausgegangen werden, dass eine große Anzahl von Zielgenen von Kpp2 noch nicht bekannt ist (vergl. Roberts *et al.*, 2000). Von besonderem Interesse sind hierbei Gene, die für die pathogene Entwicklung essentiell sind.

Für die MAP-Kinase Kpp6 konnten bisher noch keine Zielgene identifiziert werden. *kpp6AEF*-Mutanten können Appressorien-artige Infektionsstrukturen ausbilden, sind jedoch nicht in der Lage, die Blattoberfläche zu durchdringen (Brachmann *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich unter den Zielgenen von Kpp6 beispielsweise lytische Enzyme befinden, welche die Penetration der Blattoberfläche ermöglichen.

Neben den zuvor beschriebenen MAPK-Kaskaden ist der cAMP-Signalweg in *U. maydis* entscheidend für die Signalweiterleitung während der pathogenen Entwicklung. Die Hauptkomponenten des cAMP-Wegs sind die Adenylatzyklase, Uac1, die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A, Ubc1, sowie die katalytische Untereinheit der PKA, Adr1 (Barrett *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998). An der Aktivierung dieser Kaskade sind die G-Protein Untereinheiten Gpa3 und Bbp1 beteiligt (Regenfelder *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2004). Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass eine regulierte PKA-Aktivität für die pathogene Entwicklung wichtig ist. Stämme bei denen *uac1* oder *adr1* deletiert wurden, sind apathogen (Barrett *et al.*, 1993; Dürrenberger *et al.*, 1998). *gpa3*- und *ubc1*-Deletionsmutanten können zwar die Maispflanze infizieren, sind aber nicht mehr in der Lage, die sexuelle Entwicklung abzuschließen (Gold *et al.*, 1997; Regenfelder *et al.*, 1997). Signalweiterleitung durch den „second messenger“ cAMP spielt in verschiedenen pflanzen- und humanpathogenen Pilzen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der pathogenen und morphologischen Entwicklung (Alspaugh *et al.*, 1997; Borges-Walmsley und Walmsley, 2000; D'Souza *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). *U. maydis* ist eines der wenigen pilzlichen Pathogene in denen bereits einige Zielgene des cAMP-Signalwegs identifiziert wurden. Zu diesen gehört der zuvor beschriebene Transkriptionsfaktor *prf1* (Kaffarnik *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde die putative Serin/Threonin-Proteinkinase Ubk1 als potentielles Target-Gen der PKA vorgeschlagen (Abramovitch *et al.*, 2002). Ubk1 weist 30 putative PKA-Phosphorylierungsstellen auf und besitzt eine Funktion während der lateralen Knospung und dem filamentösen Wachstum (Abramovitch *et al.*, 2002). Vergleichbar mit *ubc1*-Deletionsmutanten können *ubk1*-Nullmutanten Maispflanzen infizieren, es werden jedoch keine Tumore ausgebildet und die sexuelle Entwicklung kann nicht abgeschlossen werden (Abramovitch *et al.*, 2002). Ein weiteres Zielgen der PKA ist *hgl1* (Dürrenberger *et al.*, 2001). Hierbei handelt es sich vermutlich um einen Regulator, der den morphologischen Wechsel zwischen Knospung und filamentösem Wachstum kontrolliert (Dürrenberger *et al.*, 2001).

## 1.5 Strategien zur Identifizierung von Zielgenen pathogenitätsrelevanter Signalkaskaden

Eine Vielzahl von Analysemethoden zur Identifizierung von Zielgenen von Signalkaskaden in Pilzen wurde in den letzten Jahren angewendet. Beispielsweise wurden Techniken wie die subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH) oder SAGE („serial analysis of gene expression“) zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in *Blumeria graminis*, *Cryptococcus neoformans* und *Magnaporthe grisea* eingesetzt (Steen *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2002; Irie *et al.*, 2003). Eine besondere Herausforderung stellt die Identifizierung von Genen dar, die eine Funktion während der pathogenen Entwicklung haben. Die Tatsache, dass solche Gene häufig entwicklungspezifisch exprimiert bzw. reguliert werden, erschwert den Zugang zur Analyse, da häufig nicht genügend Pilzmaterial für eine Untersuchung zur Verfügung steht. In den letzten Jahren wurden verschiedene Techniken entwickelt, mit denen erfolgreich pathogenitätsrelevante bzw. pflanzenspezifisch regulierte Gene isoliert werden konnten. Zum Beispiel wurde die Methode des „Differential Displays“ zur Isolierung einer Vielzahl von Genen verwendet, die während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* reguliert werden (Basse *et al.*, 2000). Zugleich wurden hierbei auch Maisgene identifiziert die bei der Pilz/Pflanze-Interaktion ein differentielles Expressionsmuster aufwiesen (Basse *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnten durch den Einsatz von REMI-Mutagenesen („restriction enzyme mediated integration“) in einer Reihe an phytopathogenen Pilzen pathogenitätsrelevante Gene identifiziert werden (Schiestl und Gietz, 1989; Bölker *et al.*, 1995; DeZwaan *et al.*, 1999; Kahmann und Basse, 1999). In *U. maydis* wurde diese Methode in Kombination mit dem Reportergen GFP („green fluorescent protein“), zur Isolation entwicklungspezifisch exprimierter Gene eingesetzt (Aichinger *et al.*, 2003). Ausgehend von einer sogenannten REMI-„enhancer-trap“-Mutagenese sind eine Reihe an Genen isoliert worden, die eine differentielle Regulation während der biotrophen Phase von *U. maydis* zeigten (Aichinger *et al.*, 2003). Bei diesem Ansatz wurde auch der als *p*-Locus bezeichnete Genomabschnitt identifiziert. Hierbei handelt es sich um eine Region, welche die pflanzenregulierten Gene *pig3*, *pig4*, *pig5* und *pig6* umfasst (Aichinger *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurden die Gene *npi1*, *npi2* und *npi3* als den *pig*-Genen

benachbarte, konstitutiv exprimierte Gene, identifiziert. Die Gene *pig4* und *pig6* kodieren für Permeasen der „major-facilitator“-Proteinfamilie während die anderen Gene im *p*-Locus keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen aufweisen (Aichinger *et al.*, 2003). Durch Analysen von Deletionsmutanten der Gene *pig3*, *pig4*, *pig6* sowie *npi3* konnte gezeigt werden, dass die pathogene Entwicklung sowie das Kreuzungsverhalten in solchen Mutanten nicht beeinflusst ist (Aichinger, 2000 und K. Hansson, pers. Mitteilung). Auf Grund dieser Beobachtung war postuliert worden, dass eventuell die Funktion aller bzw. das Zusammenspiel mehrerer *pig*-Gene eine entscheidende Funktion während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* haben könnten. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird diese Frage näher untersucht.

Neben den zuvor beschriebenen Methoden liegt in der Verwendung von genomischen Microarrays eine interessante Alternative zur Identifikation von differentiell exprimierten Genen und damit auch von Pathogenitätsdeterminanten. In einer Vielzahl von Experimenten konnten in den letzten Jahren zunehmend Einblicke in die Regulation des *S. cerevisiae* Genoms erhalten werden (DeRisi *et al.*, 1997; Gasch *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2000; Giaever *et al.*, 2002; Breitkreutz *et al.*, 2003; Serikawa *et al.*, 2003). Durch genomweite Expressionsanalysen können Zielgene von Signalwegen identifiziert bzw. Signalantworten charakterisiert werden. Insbesondere können so regulatorische Netzwerke erkannt werden. Durch die Identifizierung von koregulierten Genen, können funktionell verwandte Gene identifiziert werden und unbekannt Genen kann eine potentielle Funktion zugeordnet werden.

Basierend auf der von der Bayer CropScience AG zur Verfügung gestellten *U. maydis* Genomsequenz, wurde ein Oligonukleotid-Microarray von der Firma Affymetrix angefertigt (J. Kämper und R. Kahmann, unveröffentl.). Hierzu wurden zunächst potentielle Gene in der *U. maydis* Genomsequenz durch spezifisch trainierte Genvorhersageprogramme identifiziert, darüber hinaus wurden beim Design des Chips die cDNA-Sequenzdaten von ca. 150 EST-Clustern berücksichtigt (J. Kämper, pers. Mitteilung). Zusätzlich enthält der Microarray interne Kontrollen aus *Zea mays* und *U. maydis* (J. Kämper, pers. Mitteilung). Insgesamt umfasst der *U. maydis* Microarray ca. 6300 Gene, dies entspricht schätzungsweise 90 % aller Gene des *U. maydis* Genoms (J. Kämper und R. Kahmann, unveröffentl.).



## 1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, neue Komponenten zu identifizieren, die eine Funktion während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* haben. Hierzu sollten zunächst Arbeiten zur Ausdehnung und Regulation der Gene im *p*-Locus fortgesetzt werden. Nachdem die für *U. maydis* neue Technik der Microarray gestützten Transkriptomanalyse verfügbar war, sollten mit Hilfe dieser Technik Zielgene des cAMP-Signalwegs wie auch der bekannten MAPK-Kaskaden identifiziert werden. Hierzu sollten Stämme hergestellt werden, die eine regulierbare genetische Aktivierung der einzelnen Kaskaden erlauben und dadurch eine zeitliche Erfassung der Transkriptmuster ermöglichen. Über den Vergleich der Transkriptomdaten sollten funktionell verwandte Gengruppen identifiziert werden. Unter diesen Gengruppen sollten sich auch potentielle Pathogenitätsdeterminanten befinden, deren Funktion in weiteren Untersuchungen näher charakterisiert werden sollte.

## 2. Ergebnisse

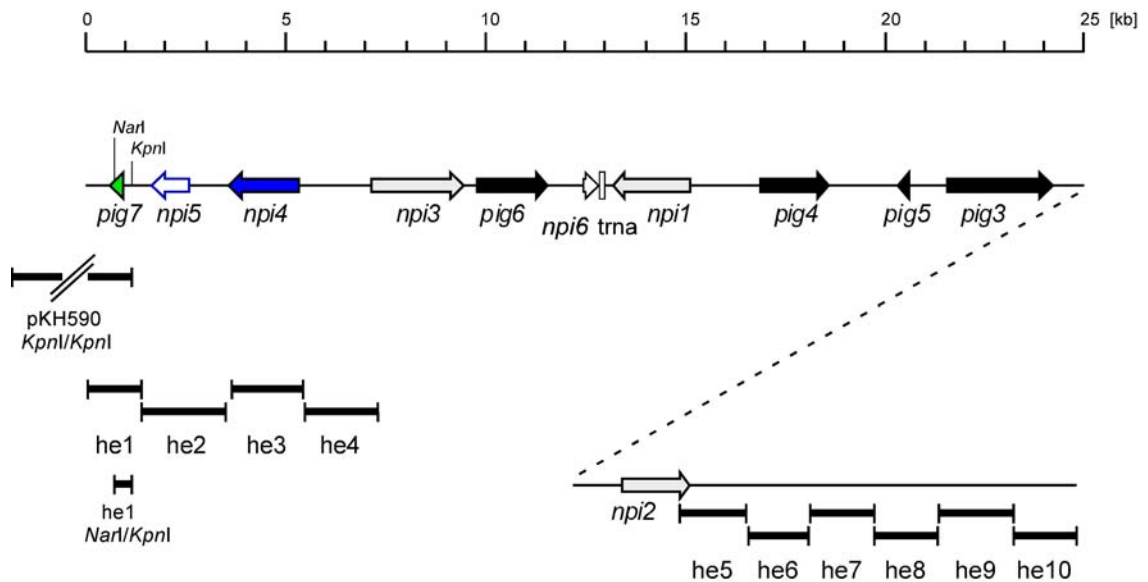
### 2.1 Weitergehende Analyse des *p*-Locus

In vorangegangenen Arbeiten konnten Untersuchungen zur Ausdehnung des als *p*-Locus bezeichneten Genomabschnitts nicht abgeschlossen werden. Zudem war es noch nicht gelungen, den gesamten *p*-Locus zu deletieren und die Charakterisierung von Mutanten, in denen die Regulation von *pig4* verändert ist, abzuschließen. Dies bildete den ersten Teil der vorliegenden Arbeit.

#### 2.1.1 Die Größe des *p*-Locus

Mit Hilfe von Northernanalysen wurde nach weiteren, pflanzenspezifisch regulierten Genen in der Nähe der bekannten Gene *npi3*, *pig6*, *npi6*, *npi1*, *pig4*, *pig5*, *pig3* und *npi2* des *p*-Locus gesucht. Hierzu wurden, basierend auf der von der Bayer CropScience AG zur Verfügung gestellten *U. maydis* Genomsequenz, Oligonukleotide aus den Flankenbereichen von *npi3* und *pig3* abgeleitet und diese zur Herstellung von Hybridisierungssonden verwendet. Beim Ableiten der Oligonukleotide wurden die Positionen weiterer, möglicher offener Leserahmen (ORF) berücksichtigt (Abbildung 3 und nicht gezeigt). Um die Expression möglicher Gene im 5'-Bereich von *npi3* zu untersuchen wurden die PCR-Fragmente he1, he2, he3 und he4 hergestellt, darüber hinaus wurde ein 9 kb großes *KpnI*-Fragment aus pKH590 als Sonde eingesetzt (siehe Abbildung 3). In den Northernanalysen wurde RNA aus Kreuzungen von FB1 und FB2 von aktivkohlehaltigen CM-Gluk-Platten mit RNA aus jungen und alten *U. maydis* Tumoren verglichen. Als Kontrolle diente pflanzliche Gesamt-RNA aus Mais. Außerdem wurde ein aus polyA<sup>+</sup>-RNA hergestellter Northernblot (Aichinger, 2000) verwendet, der auch den Vergleich der Expressionsstärke mit den bereits charakterisierten *pig*-Genen erlaubte (Abbildung 4). Bei der Beprobung mit dem he3-Fragment konnte ein weiteres, konstitutiv exprimiertes Gen, *npi4*, detektiert werden (Abbildung 4 und nicht gezeigt). Unter Verwendung des PEDANT-Algorithmus wurde für *npi4* ein 1755 bp großer offener Leserahmen vorhergesagt, der divergent zu *npi3* transkribiert wird (Abbildung 3). *npi4* kodiert damit für ein vermutliches Protein von

585 aa (G. Mannhaupt, pers. Mitteilung; PEDANT, Frishman *et al.*, 2003). Das Protein zeigte in Datenbankanalysen mit dem BLASTP-Programm keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen (Altschul *et al.*, 1990; 1997).

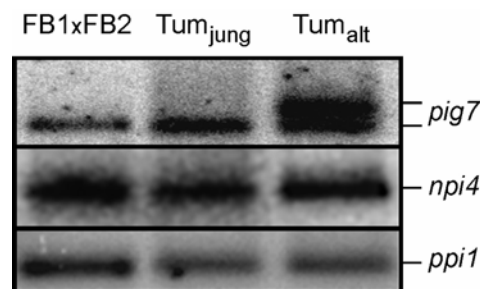


**Abbildung 3: Physikalische Karte des *p*-Locus.** Darstellung des vollständigen 24 kb *p*-Locus auf Chromosom 19 (oberer Teil der Abbildung) sowie schematische Darstellung des *pig3*-3'-Flankenbereichs (unten, links). Bereits bekannte, pflanzenregulierte Gene (siehe Text) sind in schwarz dargestellt, konstitutiv exprimierte Gene in grau, sowie ein vorhergesagte tRNA-Gen (siehe Aichinger *et al.*, 2003) als vertikaler Balken. Das neu identifizierte, konstitutiv exprimierte *npi4*-Gen ist in blau eingezeichnet, in grün das neu identifizierte, pflanzeninduzierte Gen *pig7*. Das hypothetische Gen *npi5* ist als ungefüllter blauer Pfeil eingezeichnet. Pfeilspitzen kennzeichnen die Richtung der Transkription. Hybridisierungssonden sind als schwarze Balken dargestellt (siehe Text). Sonden wurden entweder als PCR-Fragmente hergestellt (aus gleichnamigen Oligonukleotiden, siehe Material und Methoden) oder mit den angegebenen Restriktionsenzymen aus Plasmiden bzw. PCR-Fragmenten ausgeschnitten.

Interessanterweise konnte darüber hinaus ein weiteres Gen gefunden werden, das ein pflanzenspezifisches Expressionsmuster aufweist. Das mit *pig7* („plant-induced gene 7“) bezeichnete Gen wurde durch die Hybridisierung von Northernblots mit dem PCR-Produkt *he1* sowie dem *he1* *NarI/KpnI*-Fragment detektiert und zeigte ein starkes, differentielles Transkript in RNA-Proben, die aus spätem Tumormaterial isoliert wurden (Abbildung 4 und nicht gezeigt). Außerdem konnte mit den gleichen Sonden ein konstitutives Transkript unter allen untersuchten Bedingungen nachgewiesen werden, das ca. 200-300 bp kleiner als das differentielle Transkript ist (Abbildung 4). *pig7* kodiert für ein potentielles Protein von 107 aa (G. Mannhaupt, pers. Mitteilung), das mit einer Wahrscheinlichkeit von 48 % mitochondrial lokalisiert ist (PSORTII; Nakai und

Horton, 1999). Auch für *Pig7* konnte keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen in Datenbankeinträgen gefunden werden (BLASTP, Altschul *et al.*, 1990; 1997).

Um zu überprüfen, ob eventuell noch weitere, pflanzenregulierte Gene im 3'-Bereich von *pig7* liegen, wurde ein *pig7* und angrenzende Bereiche enthaltendes 9 kb Fragment aus pKH590 zur Hybridisierung von Northernblots verwendet. Hierbei konnten keine zusätzlichen Transkripte detektiert werden (nicht gezeigt). Zwischen den Genen *npi4* und *pig7* wurde ein weiterer, putativer ORF (*npi5*) durch den PEDANT-Algorithmus vorhergesagt, der eine Kodierungskapazität von 212 aa hat (Abbildung 3; G. Mannhaupt, pers. Mitteilung; Frishman *et al.*, 2003). Unter den getesteten Bedingungen konnte jedoch keine Expression dieses hypothetischen Gens nachgewiesen werden.



**Abbildung 4: Expressionsprofile der Gene *npi3* und *pig7*.** Dargestellt ist die Beprobung eines polyA<sup>+</sup>-Northernblots mit den Genen *npi3* und *pig7*. Der Northernblot wurde von C. Aichinger hergestellt und erlaubt den direkten Vergleich der Genexpression mit den bereits zuvor isolierten *p*-Locus Genen (Aichinger, 2000). RNA wurde aus Tumorgewebe von Maispflanzen isoliert, die zuvor mit einer Mischung FB1 und FB2 infiziert wurden. RNA-Extraktionen der Kreuzung FB1 x FB2 wurden zuvor für 48 h auf aktivkohlehaltigen CM-Platten inkubiert. Pro Spur wurden jeweils 0,07 µg polyA<sup>+</sup>-RNA aus axenischer Kultur und jeweils 1 µg polyA<sup>+</sup>-RNA aus Tumorgewebe aufgetragen (Aichinger, 2000). Als Sonde zur Analyse der Genexpression wurde für *npi4* das PCR-Fragment he3 und für *pig7* ein 400 bp *NarI/KpnI*-Fragment aus dem PCR-Fragment he1 verwendet. Als Ladekontrolle wurde mit einem 150 bp *Sall/PstI*-Fragment aus dem *ppi1*-Gen hybridisiert (siehe Material und Methoden; Aichinger, 2000).

Um den 3'-Flankenbereich von *pig3* auf weitere pflanzenregulierte Gene hin zu durchmustern, wurden die PCR-Fragmente he5-he10 in Northernanalysen eingesetzt (vergl. Abbildung 3). Außer dem bereits bekannten *npi2*-Gen (Aichinger, 2000) konnten unter den untersuchten Bedingungen keine weiteren Transkripte detektiert werden. Auf Grund der Beobachtung, dass über einen jeweils ca. 10 kb großen Flankenbereich in 3'-Orientierung zu *pig7* sowie in 5'-Orientierung zu *pig3* keine weiteren Gene mit pflanzenspezifischen Expressionsmuster gefunden wurden, wurde der Genomabschnitt, der den Bereich von *pig7* bis *pig3* umfasst, als *p*-Locus bezeichnet.

Der vollständige *p*-Locus umfasst somit ca. 24 kb (Abbildung 3). Durch eine Datenbanksuche (Altschul *et al.*, 1990) mit der *U. maydis* Genomsequenz (Bayer CropScience AG) wurde der *p*-Locus auf Chromosom 19 lokalisiert.

### 2.1.2 Der *p*-Locus hat keinen Einfluss auf die pathogene Entwicklung

Durch Analysen von C. Aichinger und K. Hansson konnte gezeigt werden, dass die Deletion einzelner *pig*-Gene keine Auswirkung auf die pathogene Entwicklung hat. Darüber hinaus war es nicht möglich, Deletionsmutanten des *npil*-Gen herzustellen. Daher wurde angenommen, dass es sich hierbei um ein essentielles Gen handelt (C. Aichinger und K. Hansson, pers. Mitteilung). Um untersuchen zu können, ob die *p*-Locus Gene möglicherweise in ihrer Gesamtheit einen Einfluss auf die Pathogenität haben, wurde versucht den gesamten Locus zu deletieren. Dazu wurden zunächst die Stämme HE109 (*a1b1 ip<sup>r</sup>[npil]ip<sup>s</sup>*) und HE110 (*a2b2 ip<sup>r</sup>[npil]ip<sup>s</sup>*) konstruiert. Bei diesen Stämmen wurde das essentielle *npil*-Gen unter der Kontrolle eines ca. 3,5 kb großen, natürlichen Promotorfragments durch homologe Rekombination in den *ip*-Locus integriert. Hierzu wurde das Plasmid pNPI1 in die Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) transformiert. Transformanten, bei denen eine einzelne Kopie in den *ip*-Locus integriert worden war, wurden durch PCR und Southernanalyse verifiziert (Material und Methoden und nicht gezeigt). Die so hergestellten Stämme zeigten im Vergleich zu den Ausgangsstämmen keine erkennbaren Unterschiede in der Zellmorphologie, dem Kreuzungsverhalten und der Pathogenität (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Pathogenität der *p*-Locus Deletionsmutanten.**

Inokulum	Anzahl der infizierten Pflanzen	Anzahl der infizierten Pflanzen, die Tumore ausbildeten (%) <sup>a)</sup>
FB1 x FB2	43	40 (93)
HE109 x HE110	47	44 (94)
HE122 x HE123	44	43 (98)

a) 14 Tage nach Infektion

Ausgehend von diesen Stämmen wurden *Apig7-Δpig3*-Deletionsmutanten HE122 und HE123 hergestellt, bei denen der gesamte *p*-Locus durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Für die Herstellung wurde das Plasmid p $\Delta$ *ig7-Δig3*

in HE109 und HE110 transformiert und 77 bzw. 128 Transformanten erhalten, darunter konnten ein HE109 $\Delta$ *pig7*- $\Delta$ *pig3*-Stamm (HE122, *alb1*) und zwei unabhängige HE109 $\Delta$ *pig7*- $\Delta$ *pig3*-Mutanten (HE123, *a2b2*) identifiziert werden. Homologe Integrationsereignisse wurden durch Southernblotanalysen bestätigt (nicht gezeigt). Infektionen mit Kreuzungen der Stämme HE122 (*alb1ip<sup>r</sup>[npi1]ip<sup>s</sup>* $\Delta$ *pig7*- $\Delta$ *pig3*) und HE123 (*a2b2ip<sup>r</sup>[npi1]ip<sup>s</sup>* $\Delta$ *pig7*- $\Delta$ *pig3*) führten zu normaler Tumorentwicklung (Tabelle 1). Sowohl die Anthocyanreaktion als auch die Anzahl und Größe der Tumore war vergleichbar zu Infektionen, die mit Kreuzungen der Ausgangsstämme und mit Wildtypstämmen durchgeführt wurden (Tabelle 1 und nicht gezeigt). Auch bei der Differenzierung von Teliosporen innerhalb der Tumore und bei der Sporulation zeigten sich keine Abweichungen zum Wildtyp (nicht gezeigt). Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass die *pig*-Gene keine essentielle Funktion während der pathogenen Entwicklung haben.

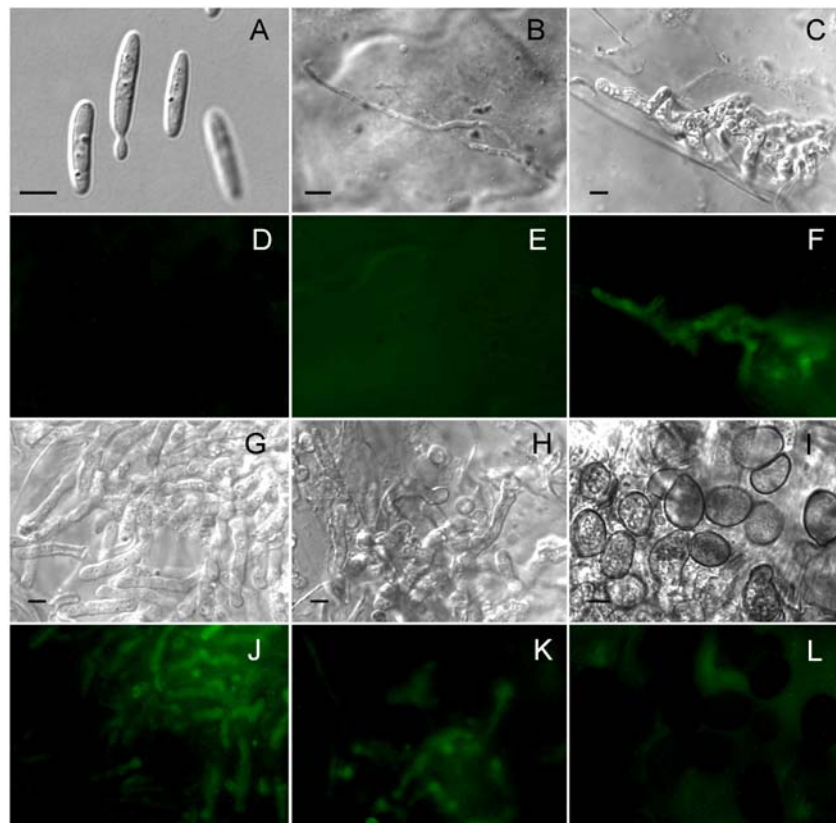
## 2.2 Untersuchung der Regulation von *pig4*

Es verblieb die interessante Frage, wie die pflanzenspezifische Expression der Gene des *p*-Locus gesteuert wird. Sollte es möglich sein mit Hilfe der *pig*-Gene regulatorische Komponenten zu isolieren, bestand die Chance, dass solche Regulatoren auch an der Kontrolle der Expression bislang unbekannter, pathogenitätsrelevanter Gene beteiligt sind.

### 2.2.1 *In vivo* Expressionsanalyse von *pig4* während der biotrophen Phase von *U. maydis*

Nachdem *pig4* während der Proliferation von *U. maydis* in der Pflanze und in diesen Stadien zudem relativ stark exprimiert wird, wurde dieses Gen als besonders geeignet angesehen, pflanzenspezifische Regulatoren zu isolieren (C. Aichinger und K. Hansson, pers. Mitteilung). Als Grundlage hierfür sollte zunächst die Genexpression von *pig4* während der verschiedenen Entwicklungsstadien von *U. maydis* in der Maispflanze näher charakterisiert werden. Hierzu wurden bereits von Dr. K. Hansson hergestellte Stämme verwendet, in denen der offene Leserahmen von *pig4* vollständig entfernt und durch das *eGFP*-Reportergen ersetzt wurde (K. Hansson, pers. Mitteilung). Die Stämme FB1 $\Delta$ *pig4*:*eGFP* und FB2 $\Delta$ *pig4*:*eGFP* wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und in junge

Maispflanzen injiziert. Nach 24 Stunden sowie anschließend im Abstand von ein bis zwei Tagen wurde infiziertes Material geerntet und der Infektionsverlauf lichtmikroskopisch verfolgt. Parallel konnte die *pig4*-Genexpression durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** *In vivo* Expressionsanalyse von *pig4* während der biotrophen Phase von *U. maydis*.

Gezeigt ist der Nachweis der *pig4*-Expression in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *U. maydis* durch eGFP-Reporterstämme. Hierzu wurde eine Mischung der Stämme FB1 $\Delta$ *pig4*:eGFP und FB2 $\Delta$ *pig4*:eGFP in fünf Tage alte Maispflanzen injiziert (siehe Material und Methoden). Nach 24 h sowie in anschließenden Abständen von ein bis zwei Tagen nach der Infektion wurden Proben lichtmikroskopisch auf Pilzstrukturen hin untersucht (DIC; Bild A-C, G-I). Hierbei wurde die Morphologie bestimmt und einzelnen Entwicklungsstadien zugeordnet. Parallel wurde die Expression von *pig4* durch Fluoreszenzmikroskopie (Bild D-F, J-L) untersucht. (A, D) Sporidien direkt nach der Herstellung der Infektionsmischung; (B, E) Pilzhyphe auf der Pflanzenoberfläche zwei Tage p.i.; (C, F) späte Hyphen nach sechs Tagen; sporogene Hyphen acht Tage (G, J) p.i.; (H, K) sporogene Hyphen neun Tage p.i.; (I, L) reife Teliosporen, zehn Tage p.i.. Der angegebene Größenstandard entspricht 5  $\mu$ m.

Wie in Abbildung 5A, D zu sehen ist, konnte in Sporidien nur eine basale eGFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Auch Sporidien und Konjugationshyphen, sowie Appressorien-artige Strukturen auf der Pflanzenoberfläche zeigten keine Fluoreszenz

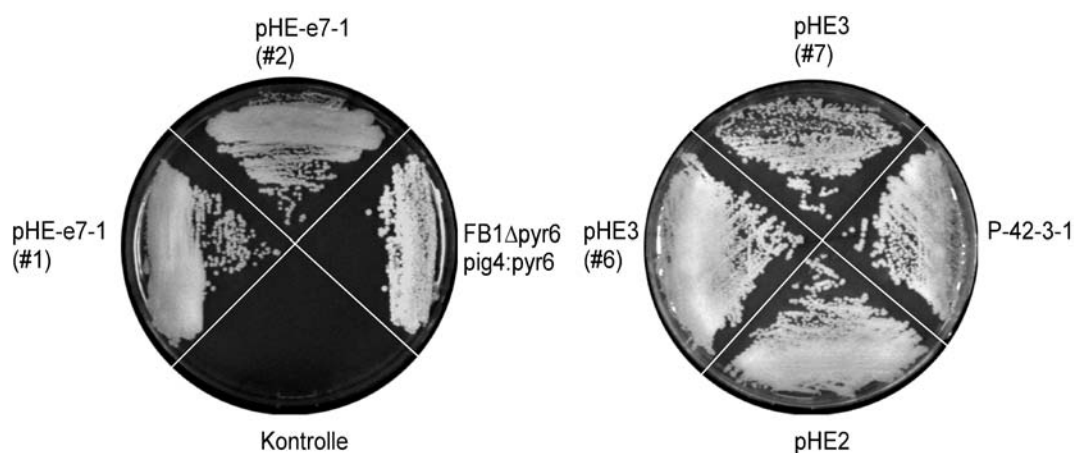
(Abbildung 5B, E). Die durch den *pig4*-Promotor regulierte *eGFP*-Expression war erst ab dem sechsten Tag in proliferierenden Pilzhypen zu beobachten. Die Fluoreszenz verstärkte sich mit fortschreitender Ausdifferenzierung zu sporogenen Hypen (Abbildung 5C, F; G, J). Während der Hypen-Fragmentierung nahm die Fluoreszenz ab (Abbildung 5H, K). Reife Brandsporen zeigten keine Reporterexpression (Abbildung 5I, L). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *pig4* während der Hypenproliferation in der Pflanze exprimiert wird. In früheren oder späteren Entwicklungsstadien war dagegen keine Expression nachweisbar.

## 2.2.2 Isolierung eines negativen Regulators von *pig4*

In vergangenen Arbeiten konnte durch Promotoranalysen gezeigt werden, dass sowohl *pig3* als auch *pig4* einer negativen Regulation unterliegen (Aichinger, 2000 und K. Hansson, pers. Mitteilung). Auf Grund dieser Beobachtung wurde im Rahmen eines EU-Projekts von Dr. K. Hansson eine UV-Mutagenese durchgeführt in der 15 Mutanten isoliert wurden, bei denen der *pig4*-Promotor konstitutiv aktiv ist. Hierzu wurde der Stamm FB1 $\Delta$ pyr6 $\Delta$ pig4:pyr6 verwendet, in dem der *pig4*-Promotor die Expression des Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase Gens steuert. *pyr6*-Deletionsmutanten sind in der Pyrimidin-Biosynthese defizient und daher nicht mehr in der Lage, auf PD-Medium zu wachsen, sofern es nicht mit Cytidin supplementiert wurde (Boeke *et al.*, 1984). Der zur Mutagenese eingesetzte Ausgangsstamm ist somit Cytidin auxotroph und zugleich 5-FOA resistent (nicht gezeigt und Abbildung 6). Die hergestellten UV-Mutanten zeigten dagegen Wachstum auf PD-Platten und waren sensitiv gegenüber 5-FOA. Darüber hinaus konnte in einigen Mutanten eine erhöhte Transkription des konstitutiven *pig3*-Transkripts nachgewiesen werden (K. Hansson, pers. Mitteilung). Von K. Hansson wurde eine der Mutanten komplementiert. Der komplementierende Klon trug ein Gen mit signifikanter Ähnlichkeit zu *KEMI* aus *S. cerevisiae*. *KEMI*-Nullmutanten der Bäckerhefe akkumulieren mRNA. Daher wurde davon ausgegangen, dass es auch in der *U. maydis* Mutante zur Stabilisierung des *pyr6* Trankskripts gekommen war, welche ausreichend war, um Sensitivität gegenüber 5-FOA zu vermitteln (Hsu und Stevens, 1993; Muhlrud *et al.*, 1994). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Komplementation mit weiteren Mutanten, KHP#7 und KHP#42, fortgesetzt. Hierbei wurden zwei unabhängige Strategien zur Komplementation verfolgt: Einerseits wurden



ausgehend von einem bereits isolierten komplementierenden Cosmid P42-3-1 (K. Hansson, pers. Mitteilung), Subklone hergestellt, um das KHP#42 komplementierende Gen einzugrenzen (Abbildung 7). Außerdem wurde eine freireplizierende cDNA-Genbank (Weinzierl, 2001) in die beiden Mutanten transformiert. Nach Transformation der Plasmide in KHP#42 wurden Transformanten auf cytidinhaltigem NM-Regenerationsagar selektioniert. Anschließend wurde das Wachstum auf Cytidin- und 5-FOA-haltigem NM-Medium untersucht. Mit den Subklonen pHE2 und pHE3 konnte die Mutante KHP#42 komplementiert werden (Abbildung 6 und Abbildung 7). Aus der freireplizierenden cDNA-Genbank gelang es ebenfalls ein komplementierendes Plasmid, pHE-e7-1, zu isolieren, das bei Retransformation seine Komplementationsfähigkeit beibehält (Abbildung 6 und 7).



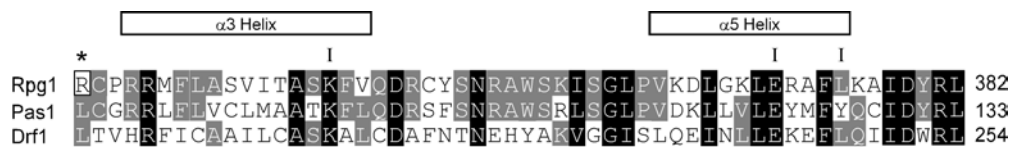
**Abbildung 6: Komplementation der Mutante KHP#42.** Gezeigt ist das Wachstumsverhalten des zur UV-Mutagenese eingesetzten Ausgangsstamms  $FB1\Delta pyr6 pig4:pyr6$ , der Mutante KHP#42 („Kontrolle“) sowie der komplementierten Mutante auf NM-5-FOA-Medium (siehe Text). Gezeigt sind Transformanten der Mutante KHP#42, die (1.) das cDNA-Überexpressionsplasmid pHE-e7-1 tragen (#1, #2); (2.) Expressionsplasmide mit Fragmenten aus dem Cosmid P-42-3-1 (pHE2 und pHE3, #6, #7) oder das gesamte Cosmid P-42-3-1 tragen. „#“ bezeichnet unabhängige Transformanten, (siehe Text).

Die anschließende Sequenzierung von pHE-e7-1 und teilweise Sequenzierung von pHE2 und pHE3 zeigte, dass die entsprechende cDNA-Sequenz auch in den genomischen Plasmiden enthalten ist (Abbildung 7). Das cDNA-Fragment kodiert für einen offenen Leserahmen von 1479 bp. Darüber hinaus umfasst das Fragment einen 191 bp großen 5'- und einen 253 bp 3'-UTR-Bereich dem sich eine polyA-Sequenz anschließt (Abbildung 7). Das Gen wurde *rpg1* („repressor of plant-regulated gene“) genannt. Der Vergleich der cDNA-Sequenz mit der genomischen Sequenz zeigte, dass *rpg1* ein 151 bp großes Intron besitzt (Abbildung 7). Eine Datenbanksuche mit



### 2.2.3 Charakterisierung des Gens, das die KHP#42 Mutante komplementiert

Um sicher zu stellen, dass *rpg1* den Defekt von KHP#42 komplementiert und nicht einen Suppressor darstellt, wurde das *rpg1*-Allel aus der Mutante KHP#42 sequenziert und mit dem Wildtyp-Allel verglichen. Hierzu wurde ein 2,3 kb großes Fragment PCR-amplifiziert, in pCR2.1-TOPO kloniert und drei unabhängige Klone sequenziert (Abbildung 7 und nicht gezeigt). Das PCR-Fragment umfasste den gesamten ORF von *rpg1*, einen 550 bp großen 5'-UTR-Bereichs (Abbildung 7). Ein Vergleich mit der Sequenz des Wildtyp-Allels zeigte, dass in KHP#42 eine Stoppmutation an der Aminosäureposition 329 des offenen Leserahmens vorliegt. Die Mutation liegt somit direkt vor dem Cyclin-Box Motiv (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Aminosäurevergleich der konservierten Cyclin-Box von Rpg1 mit Pas1 und Drf1.** Gezeigt ist ein Aminosäurevergleich der Cyclin-Box von Pas1 aus *S. pombe* sowie Drf1 und Rpg1 aus *U. maydis*. Identische Aminosäuren zwischen zwei Proteinen sind in grau hinterlegt; in schwarz hinterlegt sind Aminosäuren, die bei allen drei Proteinen identisch sind. Mit einem Stern bzw. schwarz eingerahmt ist die Aminosäureposition von Rpg1 gekennzeichnet, bei der in der Mutante KHP#42 ein Stoppkodon nachgewiesen wurde (siehe Text). Zahlen geben die Aminosäurepositionen in Bezug auf den jeweiligen Translations-Startpunkt an. (I) bezeichnet Aminosäuren, die analog zur Ko-Kristallstruktur von CyclinA-Cdk2, mit einer Cyclin-abhängigen Kinase interagieren könnten. Mögliche alpha-helicale Bereiche, die ebenfalls aus der CyclinA-Kristallstruktur abgeleitet sind, sind als offene Boxen angegeben (Jeffrey *et al.*, 1995).

Um direkt untersuchen zu können, ob *rpg1* einen Einfluss auf die Regulation von *pig4* bzw. *pig3* hat, wurden *rpg1*-Deletionsmutanten hergestellt. In diesen Stämmen wurde der gesamte *rpg1* ORF durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Hierzu wurde das Plasmid pΔ*rpg1* in FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) transformiert und homologe Rekombinationen durch Southernanalysen bestätigt (nicht gezeigt). Die resultierenden Stämme HE105 (*a1b1*Δ*rpg1*) und HE103 (*a2b2*Δ*rpg1*) differierten weder im Wachstum, noch konnten Unterschiede im Kreuzungsverhalten im Vergleich zu Wildtypstämmen beobachtet werden (nicht gezeigt). Bei Wachstum auf PD-Festmedium zeigten HE105 und HE103 eine gelb-bräunliche Pigmentbildung. Dieser

Phänotyp wurde auch in der Mutante KHP#42 beobachtet. Pflanzeninfektionen mit kompatiblen *Arpg1*-Stämmen zeigten im Vergleich zu Infektionen, die mit Wildtypstämmen durchgeführt wurden, eine um ca. 20 % reduzierte Tumorentwicklung (jeweils 118 Pflanzen wurden getestet). Die ausgebildeten Tumore waren vergleichbar groß wie an Pflanzen, die mit einer Mischung von FB1 und FB2 infiziert wurden (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob in den *Arpg1*-Stämmen die Expression von *pig3* und *pig4* dereguliert ist, wurden Northernanalysen durchgeführt. Hierbei wurde RNA der Stämme HE105 und HE103 mit Wildtypstämmen und der Mutante KHP#42 verglichen. Bei der Beprobung mit *pig3*- und *pig4*-spezifischen Sonden konnte weder in HE105 noch in HE103 die Expression dieser Gene nachgewiesen werden. Nur in KHP#42 wurde eine geringe Menge an *pig3*-Transkript detektiert (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass *Rpg1* kein negativer Regulator von *pig4* und *pig3* sein kann. Möglicherweise kommt es bei Abwesenheit von *rpg1* zu einem, das *pyr6*-Transkript stabilisierenden Effekt, der somit Wachstum auf 5-FOA-Medium erlaubt, ähnlich wie dies für die *kem1*-Mutante (vergl. 2.2.2) postuliert wurde. In weiteren Experimenten wurde nun untersucht, ob sich auch andere UV-Mutanten durch *rpg1* komplementieren lassen. Hierzu wurde das Plasmid pHE-e7-1 in die Mutanten KHP#2, KHP#5, KHP#7, KHP#15 sowie KHP#19 transformiert. Während die Transformanten von KHP#19 weiterhin sensitiv waren, zeigten Transformanten der übrigen Mutanten Wachstum auf 5-FOA-Medium. Dieses Wachstum war jedoch schlechter als das zuvor mit KHP#42 beobachtete. Eine Sequenzanalyse des *rpg1*-Allels, die den kodierenden Bereich sowie 550 bp des 5'-UTR-Bereichs umfasste, zeigte, dass keiner dieser Stämme im Vergleich zum Wildtyp-Allel eine Mutation aufwies (nicht gezeigt, Abbildung 7, „he-rpg1“). Dieses Ergebnis schließt weitgehend aus, dass die Funktion von *Rpg1* in diesen Mutanten beeinträchtigt ist. Auch die Beobachtung, dass die *kem1*-Mutante mit *Rpg1* zumindest teilweise komplementiert werden konnte, deutete darauf hin, dass die Expression von *rpg1* einen unspezifischen Effekt in den Mutanten hervorruft.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es mit diesem Versuchsansatz nicht möglich war, einen pflanzenspezifischen Regulator zu isolieren. Daher wurde ein neuer Weg gewählt, um Gene und regulatorische Komponenten zu identifizieren, die unter anderem eine Rolle bei der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* haben. Hierzu wurde die für

*U. maydis* neue Technik der genomweiten Expressionsanalysen mit Hilfe von Microarrays angewendet.

## 2.3 Transkriptomanalyse pathogenitätsrelevanter Signalwege

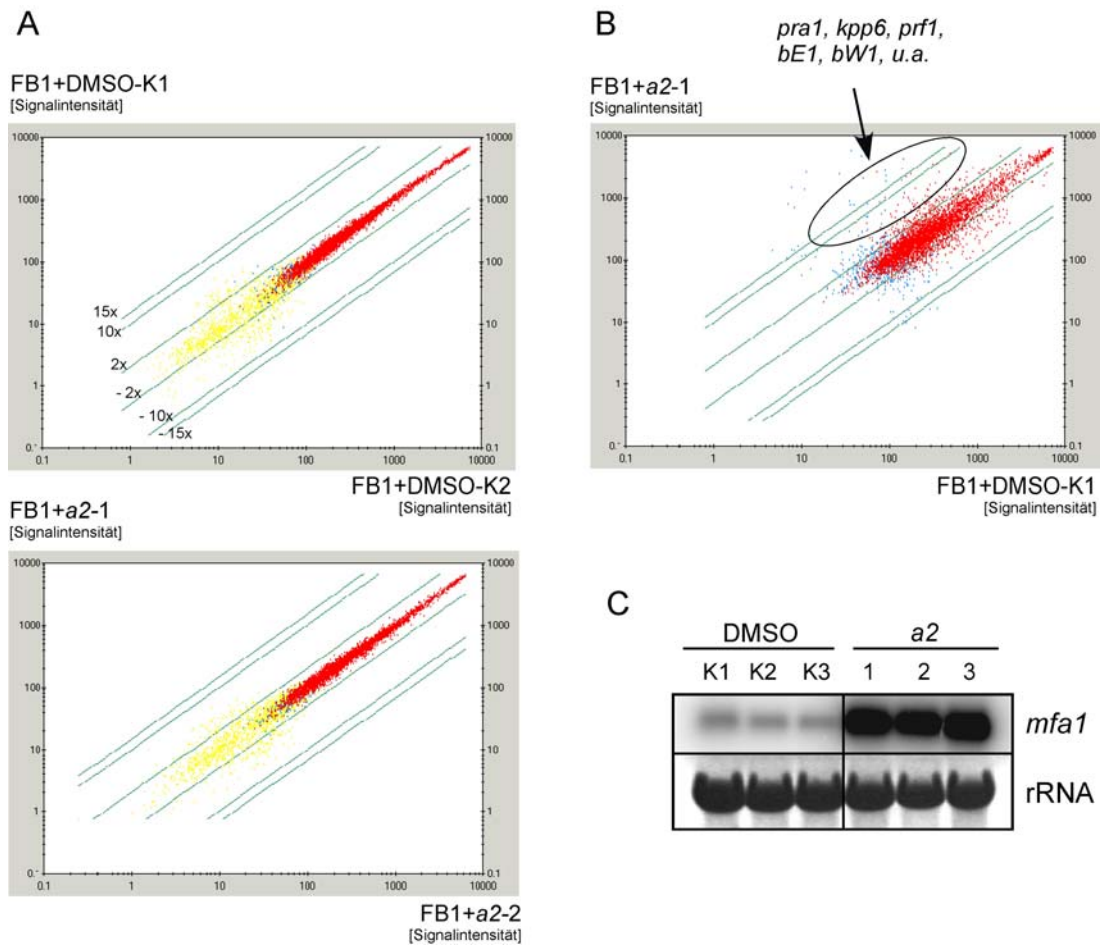
Wie einleitend beschrieben wurde, sind in *U. maydis* drei Signalwege bekannt, die eine entscheidende Funktion bei der pathogenen Entwicklung besitzen. Dabei sind die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade und der cAMP-Signalweg sowohl an der Pheromonsignalweiterleitung wie auch vermutlich an der Entwicklung früher Infektionsstrukturen beteiligt. Die Kpp6-MAPK-Kaskade besitzt dagegen eine essentielle Funktion bei der Penetration der Blattoberfläche. Um neue Zielgene dieser Signalwege zu identifizieren, wurden in den folgenden Experimenten Stämme konstruiert, die eine regulierbare Aktivierung der Signalwege ermöglichten. Das genomische Expressionsprofil dieser Stämme sollte untersucht und mit dem Transkriptom von mit Pheromon stimulierten Wildtypzellen verglichen werden. Ziel dieses Ansatzes war Informationen über die regulatorische Vernetzung der Signalkaskaden zu erhalten und vor allem neue Zielgene dieser Signalwege identifiziert werden.

### 2.3.1 Genomweite Expressionsanalyse nach Pheromonstimulierung

Die ersten Versuche, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit den genomischen *U. maydis* Microarrays (Affymetrix) durchgeführt wurden, sollten unter anderem auch zur Qualitätsprüfung dieses für *U. maydis* neuen Systems beitragen. Hierzu wurden FB1 Wildtypzellen (*alb1*) mit synthetischem *a2*-Pheromon stimuliert (Szabo *et al.*, 2002). Mit diesen Experimenten wurde begonnen, da das Expressionsverhalten für eine ganze Reihe von Genen nach Pheromonzugabe aus früheren Experimenten bekannt ist.

Ausgehend von frisch ausgestrichenen Einzelkolonien des Wildtypstamms FB1 wurden Vorkulturen in CM-Glukose-Medium angezogen und nach Erreichen einer Dichte von  $OD_{600} = 0,1$  in frisches CM-Glukose-Medium überführt. Die Kulturen wurden ca. 4 h bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,4$  inkubiert und durch Zugabe von synthetischem *a2*-Pheromon (2,5 µg/ml) stimuliert. Für die Durchführung des Experiments wurde CM-Medium verwendet, da dieses Medium den Vergleich zu zahlreichen, in der

Vergangenheit durchgeführten Expressionsanalysen erlaubt. Kontrollansätze wurden mit dem entsprechenden Volumen an Lösungsmittel (DMSO) versetzt. Die Versuche wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt, das heißt die RNA wurde aus unabhängig gewachsenen Kulturen isoliert und analysiert (siehe Material und Methoden). Das Expressionsprofil wurde 75 min nach Pheromonzugabe bestimmt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da auf Grund von Vorexperimenten gezeigt werden konnte, dass in diesem Stadium die Expression des Pheromogens *mfa2* induziert ist (Daten nicht gezeigt). Um die Pheromon-Induktion zu überprüfen, wurden zunächst RNA-Proben der Replikate im Northernblot analysiert und verglichen (Abbildung 9C). Alle Pheromon behandelten Ansätze zeigten eine starke *mfa2* Expression im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen nur eine basale *mfa2* Expression detektiert wurde (Abbildung 9C). Darüber hinaus wurden Aliquots der Kulturen weiterinkubiert und in diesen Proben die morphologische Entwicklung der Zellen verfolgt: Bereits nach zwei Stunden konnte die Ausbildung von Konjugationshyphen in den Ansätzen beobachtet werden denen *a2* zugesetzt war, während die Zellen in den DMSO-Kontrollen unverändert waren (nicht gezeigt). Aus der isolierten Gesamt-RNA der Proben wurde eine Hybridisierungssonde (Target) für die Array-Analyse hergestellt (siehe Material und Methoden). Nach der Hybridisierung wurden die Arrays gewaschen, das hybridisierte Target fluoreszenzmarkiert und mit Hilfe eines Scanners eingelesen. Eine erste Analyse der Daten zeigte, dass für ca. 73 % aller auf dem Array befindlichen „probe sets“ ein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte, das über dem Hintergrundsignal lag. Die Höhe dieser „present calls“ lag damit in guter Übereinstimmung mit den Werten, die für *S. cerevisiae* Genom-Arrays (Affymetrix) gemessen wurden. Die Abweichung zwischen den einzelnen biologischen Replikaten betrug weniger als 2 % und zeigt die hohe Reproduzierbarkeit der Experimente (W. Keilholz, Affymetrix, pers. Mitteilung). Dies konnte auch durch Vergleich aller detektierten Fluoreszenz-Signale in Streudiagrammen bestätigt werden. In Abbildung 9A sind exemplarisch die Datensätze der Kontroll-Arrays K1 und K2 sowie zweier Experiment-Arrays gegeneinander aufgetragen. Wie die Diagramme zeigen, waren die Replikate von höchster Reproduzierbarkeit: Alle Datenpaare liegen annähernd auf einer gedachten Winkelhalbierenden des Koordinatensystems.



**Abbildung 9: Nach Pheromonstimulierung von FB1-Zellen zeigen biologische Replikate eine vergleichbare Genexpression.** **A)** cRNA-Microarray-Analysen der *U. maydis* Pheromonantwort zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit. Bei diesem Streudiagramm wurden die detektierten Fluoreszenzsignale aller sich auf dem *U. maydis* Microarray befindlichen „probe sets“ zweier biologischer Replikate gegeneinander aufgetragen (Kontroll-Arrays K1 und K2 oben; Experiment-Arrays #1 und #2 unten). In rot eingezeichnete Datenpunkte repräsentieren Signalintensitäten von Genen, bei denen in beiden Microarrays ein im Vergleich zum Hintergrund signifikantes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. In blau sind Signalintensitäten von Genen dargestellt, bei denen nur in einem der Experimente ein signifikantes Signal detektiert wurde. In gelb sind Signalintensitäten von „probe sets“ dargestellt, für die in beiden Experimenten ein Wert gemessen wurde, der sich nicht signifikant von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Weiterhin sind Grenzlinien eingezeichnet, an denen der faktorielle Unterschied der Datenpaare abgeschätzt werden kann (siehe Text). **B)** Beispiel einer Microarray-Analyse zur Expressionsänderung nach Pheromonstimulierung. Gezeigt ist ein Streudiagramm, bei dem die gemessenen Signalintensitäten eines Experiment-Arrays (FB1+a2-Pheromon) gegen die gemessenen Signalintensitäten eines Kontroll-Arrays (FB2+DMSO) aufgetragen wurden. Unter den Pheromon-induzierten Genen befanden sich zahlreiche bekannte Gene, Beispiele sind in der Abbildung eingezeichnet. Messwerte von „probe sets“, für die in keinem der Experimente eine signifikante Fluoreszenz detektiert wurde, sind nicht eingezeichnet. Die Analysen wurden mit dem Programm Microarray Suite 5.0 (Affymetrix) durchgeführt. **C)** Northernanalyse zur *mfa1*-Expression. Drei unabhängig gewachsene Kulturen des Wildtypstamms FB1 wurden mit 2,5 µg/ml synthetischem a2-Pheromon (1-3) oder mit DMSO (K1-K3) versetzt und für 75 min inkubiert. Pro Spur wurden 10 µg RNA geladen (Einzelheiten siehe Text und Material und Methoden).

Genauer betrachtet unterscheiden sich die detektierten Expressionswerte in beiden Replikaten deutlich weniger als zweifach. Das System ist folglich so robust, dass im nachfolgenden Vergleich des Experiment-Arrays mit dem Kontroll-Array auch Aussagen über geringfügige Unterschiede im Expressionslevel getroffen werden können. Um zu veranschaulichen, wie sich das Transkriptom nach Pheromonbehandlung im Vergleich zur Kontrolle verhält, wurden zunächst einzelne Replikate der Kontroll-Arrays mit einzelnen Experiment-Arrays verglichen (Abbildung 9B). Das Diagramm zeigt exemplarisch, dass die Expression zahlreicher Gene nach Pheromonbehandlung zweifach und stärker induziert oder reprimiert war. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle waren nach 75 min 256 Gene nach Zugabe von  $a_2$ -Pheromon differentiell reguliert. Die Gruppe umfasst 141 induzierte Gene und 115 Gene deren Expression reprimiert wurde. Unter den hochregulierten Genen wurden alle bereits als Pheromon-induziert beschriebenen Gene wiedergefunden (Abbildung 9B). Hierunter befanden sich die Gene des  $a$ - und  $b$ -Locus, *prf1* sowie *kpp6* (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1999; Brachmann *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch bei einer statistisch abgesicherten Auswertung, die im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.

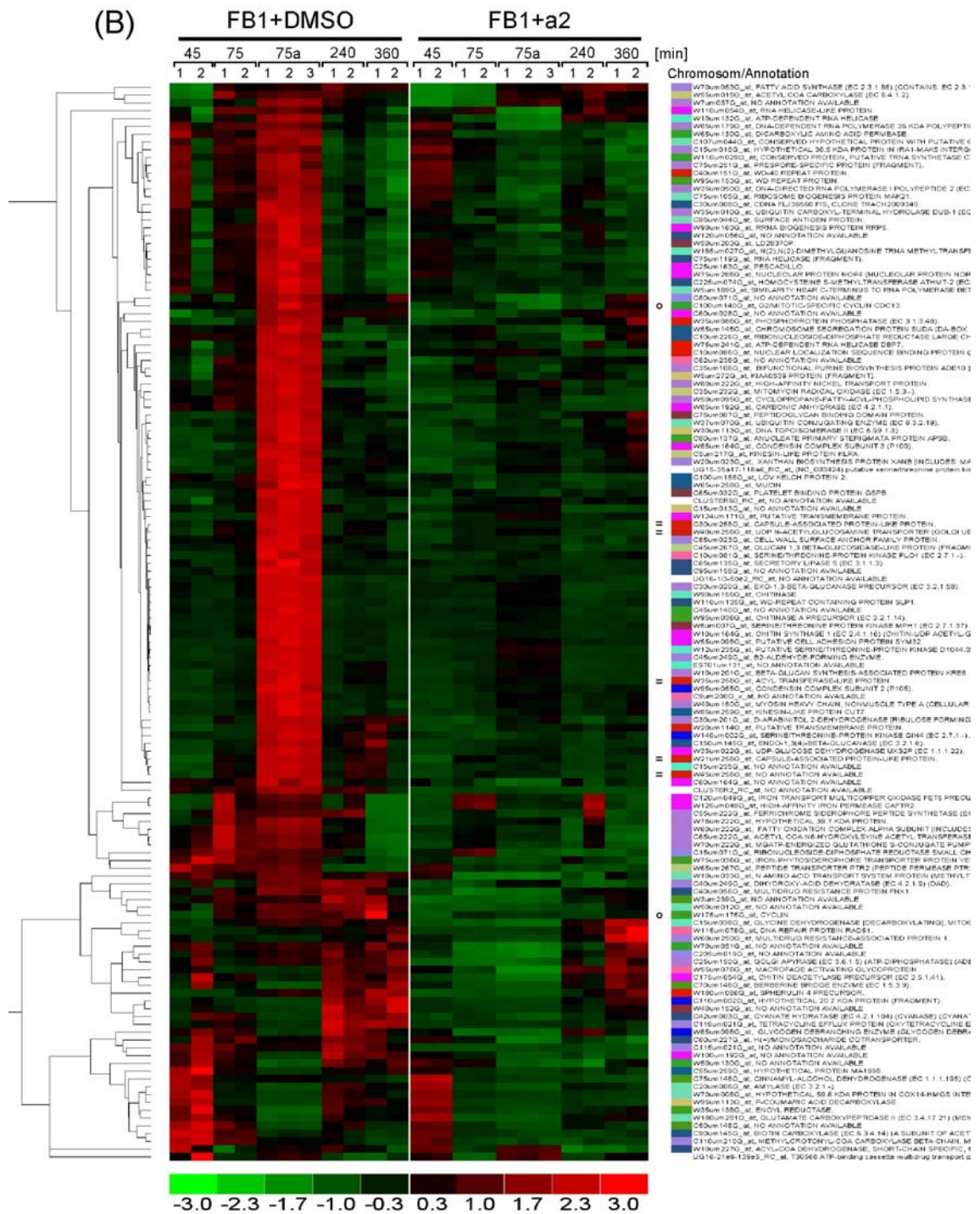
### **2.3.2 Identifizierung von bekannten und neuen Zielgenen der Pheromonantwort**

Nachdem im zuvor beschriebenen Experiment gezeigt wurde, dass die Expression zahlreicher Gene bereits 75 min nach Pheromonzugabe dereguliert ist, wurde nun ein Zeitkinetikexperiment durchgeführt. Auf Grund der guten Reproduzierbarkeit wurden die Versuche in biologisch unabhängigen Duplikaten durchgeführt. Von besonderem Interesse waren früh regulierte Gene, da in dieser Gruppe Regulatoren der späteren Gene vermutet wurden. Der Stamm FB1 wurde, wie zuvor beschrieben, bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,4$  kultiviert und für 45 min, 75 min, 180 min und 360 min mit synthetischem  $a_2$ -Pheromon bzw. DMSO inkubiert. Nach der Durchführung der Microarray-Analysen wurden die detektierten Signale mit dem Programm dChip ausgewertet (Li und Wong, 2001). Hierzu wurden zunächst die absoluten Fluoreszenzwerte der einzelnen Arrays normalisiert („invariant set normalization“) und anschließend die Expressionswerte berechnet („model based expression“, Li and Wong,



2001). Danach wurden Gene herausgefiltert, die beim Vergleich der Experiment-Arrays (Pheromon) mit den Kontroll-Arrays (DMSO) mindestens zu einem der untersuchten Zeitpunkte zweifach oder stärker dereguliert waren. Insgesamt waren 295 Gene differentiell reguliert. Die Expression von 157 Genen wurde durch Zugabe von synthetischem  $\alpha 2$ -Pheromon induziert und 138 Gene wurden reprimiert. Bei der Berechnung der faktoriellen Expressionsunterschiede wurden die Expressionswerte der Replikate gemittelt. Hierbei wurde ein Vertrauensintervall vorgegeben, das unter anderem die Standardabweichung der Mittelwerte berücksichtigte und eine konservative Gewichtung der berechneten Expressionsunterschiede zwischen den Kontroll- und Experiment-Arrays beinhaltete („lower confidence bound of fold change“); (Li und Hung Wong, 2001; Li und Wong, 2001). Die vollständigen Daten finden sich als Liste auf der CD im Anhang (Tabellen 7 und 8). Basierend auf dieser Berechnung wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt (Abbildung 10). Bei dieser Darstellung werden die Gene basierend auf der Korrelation ihres Expressionsmusters gruppiert (Eisen *et al.*, 1998; Li und Wong, 2001). In Abbildung 10 sind alle gefilterten Gene gezeigt, wobei in (A) alle Pheromon-induzierten Gene und in (B) alle Pheromon-reprimierten Gene dargestellt sind. Wie im zuvor beschriebenen Vorexperiment, wurden auch in diesem Experiment die Gene gefunden, von denen bekannt war, dass sie durch Pheromon reguliert sind. Unter anderem befanden sich beispielsweise die Gene *pral*, *kpp6*, *prf1*, *bE1*, *bW1* unter den am stärksten hochregulierten Genen (vergl. Abbildung 10A, die entsprechenden Gene sind mit „\*“ gekennzeichnet), (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2003). Von besonderem Interesse war jedoch eine Vielzahl von neuen Genen, deren Pheromon-abhängige Regulation erstmals hier gezeigt werden konnte. Zahlreiche der hochregulierten Gene kodieren für Produkte, die eine vermutliche Funktion während der posttranslationalen Pheromon-Modifikation, der Pheromon-Signalweiterleitung und einem möglichen Pheromon-Rezeptor-Recyclingprozess haben (siehe Diskussion).





**Abbildung 10: Expressionsprofile Pheromon-regulierter Gene.** Gezeigt ist eine hierarchische Clusteranalyse der Expressionsprofile nach Pheromonstimulierung. Das Transkriptom wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von synthetischem *a2*-Pheromon zu FB1 Wildtypzellen untersucht (siehe Text). Die Clusteranalyse wurde mit dem Programm dChip durchgeführt (Li und Wong, 2001). Hierzu wurden zunächst 295 Gene aus den insgesamt 22 Einzelexperimenten herausgefiltert, deren Expression nach Pheromonzugabe bei einem der untersuchten Zeitpunkte größer oder gleich zweifach induziert oder reprimiert war (Li und Wong, 2001). **(A)** Pheromon-induzierte Gene und **(B)** Pheromon-reprimierte Gene. In horizontaler Orientierung sind die Einzelexperimente in zeitlicher Reihenfolge nach Pheromonzugabe dargestellt. Arabische Ziffern kennzeichnen biologische Replikate. Die mit „a“ bezeichneten Arrays stellen ein von der Zeitkinetik unabhängiges Experiment dar (s. Text). Gene sind in vertikaler

Orientierung angeordnet. Auf der rechten Seite ist jeweils die Bezeichnung des „probe sets“ sowie die vorläufige Annotation des dazugehörigen Gens aufgelistet (J. Kämper, pers. Mitteilung). Der Farbcode kennzeichnet Gene, die auf dem selben Chromosom liegen, teilweise sind die Farben doppelt vergeben. Die relative Expressionsstärke der detektierten Signale ist durch den im Bild unten dargestellten Farbcode gezeigt. Bei dieser Darstellung werden durch rote Farbe Expressionswerte gekennzeichnet, die über der durchschnittlichen Expression des Gens über alle Einzelexperimente liegen. In grün sind Expressionswerte angegeben, die niedriger als der durchschnittliche Expressionswert sind (Eisen *et al.*, 1998). Auf der linken Seite ist der Cluster-Stammbaum der Gene abgebildet. Einzelne Gene sind gekennzeichnet und werden im Text näher beschrieben. Das mit einem Pfeil markierte Cluster enthält bekannte („\*“) und neue Gene die für Proteine mit putativen Funktionen bei der Pheromon-Reifung, -Transport bzw. -Recycling-Prozessen, kodieren (siehe Text bzw. Diskussion).

Interessanterweise wurde auch die Transkription der MAPKK *fuz7* und der MAPK *kpp2* durch Pheromon induziert (vergl. Abbildung 10A, die entsprechenden Gene sind mit „#“ gekennzeichnet). Darüber hinaus wurden auch das bekannte Cyclin *clb1* (Garcia-Muse *et al.*, 2004), sowie drei weitere Gene, die für potentielle Cycline kodieren, differentiell reguliert (vergl. Abbildung 10A, die entsprechenden Gene sind mit „o“ gekennzeichnet). Unter den reprimierten Genen konnte außerdem das bereits bekannte *cab*-Gencluster wiedergefunden werden (Brachmann, 2001), (vergl. Abbildung 10A, die entsprechenden Gene sind mit „=“ gekennzeichnet). Bei einem großen Teil der Gene ist die Funktion allerdings unbekannt (diese „probe sets“ sind mit „no annotation“ bezeichnet, vergl. Abbildung 10). Hierunter fallen auch einige der am stärksten regulierten Gene (Tabellen 7 und 8, Anhang).

Bei der Betrachtung der Clusteranalyse wird deutlich, dass bereits 75 min nach Pheromonzugabe die Expression der meisten Gene maximal induziert bzw. reprimiert wurde. Nach 240 min ist diese Expressionsänderung bei vielen Genen wieder rückläufig. Sechs Stunden nach Pheromonzugabe wurde für die meisten Gene ein mRNA-Level detektiert, der vergleichbar zu dem nach 45 min detektierten Expressionsniveau war. Für einige Gene, beispielsweise die *b*-Gene, konnte allerdings auch zu diesem Zeitpunkt eine deutlich erhöhte Transkriptmenge detektiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der Micoarray-Experimente nahezu alle Gene wiedergefunden wurden, deren Pheromon-abhängige Regulation bekannt war. Die Regulation dieser gut charakterisierten Gene bestätigte das verwendete Microarray-System. Eine Ausnahme bildete das Gen des Pheromonvorläufers, *mfal*, dessen Expression ebenfalls durch Pheromon induziert wird (Urban *et al.*, 1996). In den durchgeführten Experimenten konnte zwar eine Expressionserhöhung nach Pheromonstimulation detektiert werden, allerdings führte



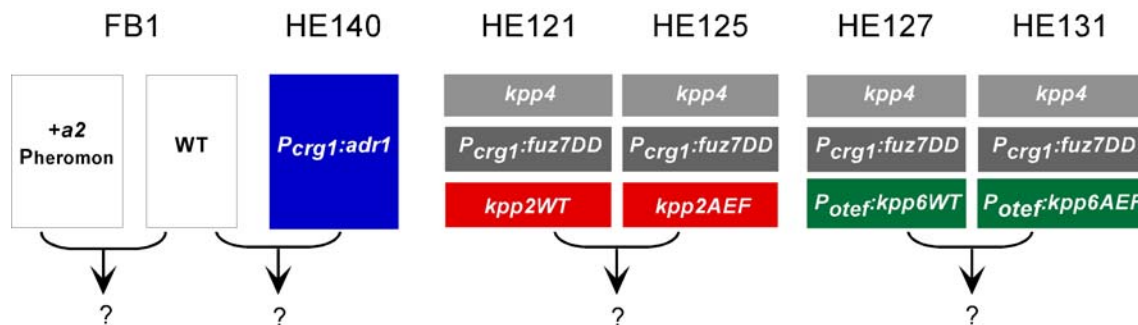
hier bereits das basale Expressionsniveau in den Kontroll-Arrays zu einem Fluoreszenzsignal, das im Sättigungsbereich des Microarrays lag. Folglich war es nicht möglich, eine statistisch abgesicherte Aussage über den Induktionsfaktor zu machen. Da es sich bei *mfa1* um ein sehr kurzes Transkript handelt kann spekuliert werden, dass die Herstellung des Hybridisierungs-Targets besonders effizient verläuft und daher bereits ein vergleichsweise hohes, basales Fluoreszenzsignal detektiert wird. Darüber hinaus war aus zahlreichen zuvor durchgeführten Northern-Experimenten bekannt, dass die Zugabe des Pheromon-Lösungsmittels DMSO zur Induktion von *mfa1* führen kann.

Um die Regulation der neu identifizierten Gene näher zu untersuchen, wurden Stämme konstruiert, die es ermöglichten sowohl die Kpp2-MAPK-Kaskade als auch den cAMP-Signalweg zu aktivieren.

## 2.4 Konstruktion von Stämmen mit aktivierbaren Signalkaskaden

Wie in der Einleitung beschrieben sind zwei MAP-Kinase-Kaskaden sowie der cAMP-Signalweg für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* essentiell. Um Zielgene dieser Signalwege zu identifizieren und beispielsweise mit Pheromonstimulation zu vergleichen, wurden Stämme konstruiert, die eine gezielte Aktivierung der einzelnen Kaskaden ermöglichen (Abbildung 11). Zur Identifikation von Genen, deren Expression durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) reguliert oder beeinflusst wird, wurde der Stamm HE140 konstruiert. In diesem Stamm wurde die katalytische Untereinheit der PKA, *adr1*, unter die Kontrolle des arabinoseregulierten *crg1*-Promotors (Bottin *et al.*, 1996) gebracht und in den *ip*-Locus integriert. In diesem Stamm kann durch Induktion des *crg1*-Promotors ein aktiver cAMP-Weg simuliert werden. Das Transkriptom des Stamms HE140 kann anschließend mit dem Transkriptom des Wildtypstamms, FB1 (*alb1*), verglichen werden (Abbildung 11), der ebenfalls in Induktionsmedium inkubiert wird. Das native *adr1*-Allel wurde in HE140 nicht deletiert, da  $\Delta$ *adr1*-Stämme einen schweren morphologischen Defekt aufweisen und genetisch instabil sind (Dürrenberger *et al.*, 1998; Dürrenberger *et al.*, 2001). Für die Herstellung wurde das Plasmid pHEcrg1:adr1 in FB1 transformiert. Homologe Integration einer einzelnen Kopie des Konstrukts in den *ip*-Locus wurden durch PCR und Southernanalyse bestätigt (siehe Material und Methoden; Daten nicht gezeigt).

Um Zielgene der MAP-Kinase Kpp2 identifizieren zu können, wurden die isogenen Stämme HE121 und HE125 hergestellt. In beiden Stämmen wurde das *fuz7DD*-Allel unter die Kontrolle des Arabinose regulierten *crg1*-Promotors (Bottin *et al.*, 1996) gestellt und homolog in den *fuz7*-Locus integriert (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Stämme mit aktivierbaren Signalkaskaden.** Die hergestellten Stämme enthalten entweder das Wildtyp-Allel der MAP-Kinasen *kpp2* (HE121) oder *kpp6* (HE127) oder die nicht mehr aktivierbaren Allele *kpp2<sup>AEF</sup>* (HE125) und *kpp6<sup>AEF</sup>* (HE131). Außerdem wurde in diesen Stämmen das konstitutiv aktive Allel der MAPK-Kinase, *fuz7DD*, unter der Kontrolle des regulierbaren *crg1*-Promotors homolog integriert. Für die Analyse des cAMP-Wegs wurde der Stamm HE140 hergestellt. Dieser Stamm trägt das Gen der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A, *adr1*, unter der Kontrolle des regulierbaren *crg1*-Promotors.

Das *fuz7DD* Allel kodiert für die konstitutiv aktive MAPK-Kinase Fuz7DD, die Teil des MAPK Moduls ist, das das Pheromonsignal weiterleitet und natürlicherweise durch Phosphorylierung durch die MAPKK-Kinase Kpp4 aktiviert wird (Müller, 2003). Für die Herstellung des Stamms HE121 wurde das Plasmid *pcrg1 fuz7DDhom* in den Stamm FB1*kpp2*<sup>WT</sup> transformiert, der das *kpp2* Wildtyp-Allel trägt. Der Stamm HE125 wurde durch Transformation des gleichen Plasmids in FB1*kpp2*<sup>AEF</sup> hergestellt. Transformanten, bei denen das Wildtyp *fuz7*-Allel durch *fuz7DD* ersetzt war, wurden durch Southernblotanalyse identifiziert (nicht gezeigt). HE125 trägt das *kpp2*<sup>AEF</sup>-Allel und ist dadurch nicht mehr über Phosphorylierung durch *fuz7* aktivierbar (Müller *et al.*, 2003b). Das Transkriptom dieses Stamms kann nach Induktion des *fuz7DD*-Allels mit dem Transkriptom des Stamms HE121 verglichen werden, um Gene zu identifizieren, die direkt oder indirekt durch Kpp2 reguliert werden. Das zuvor beschriebene Pheromon-Induktionsexperiment wurde in den späteren Vergleich mit einbezogen (Abbildung 11). Analog zu den *kpp2*-Stämmen wurden die Stämme HE127 und HE131 konstruiert (Abbildung 11). Hierbei wurde angenommen, dass Kpp6 ebenfalls durch Fuz7 aktiviert wird. In diesen Stämmen ist das natürliche *kpp6*-Allel deletiert und *kpp6*

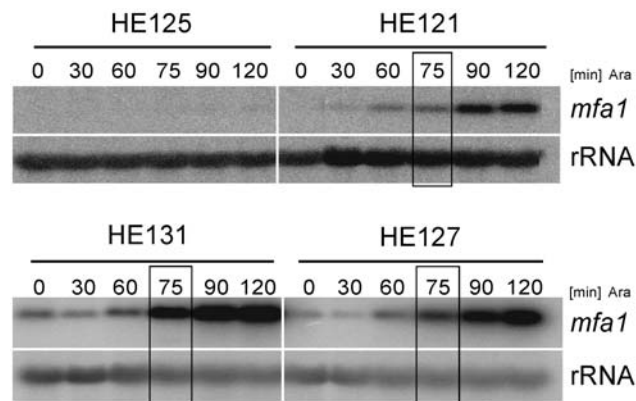
bzw. *kpp6AEF* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef*-Promotors in den *ip*-Locus inseriert (Bottin *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1996). Diese Stämme wurden gewählt, da *kpp6* normalerweise in haploiden Zellen nur basal exprimiert wird und einer komplexen Regulation durch den *a*- und *b*-Locus unterliegt (Brachmann *et al.*, 2003). Das Allel *kpp6AEF* trägt analog zu *kpp2AEF* Mutationen in der Aktivierungsdomäne, die es nicht mehr durch Phosphorylierung aktivierbar machen (Brachmann *et al.*, 2003). Die detaillierte Konstruktion der in Abbildung 11 aufgeführten Stämme sowie Funktionstests sind in Material und Methoden beschrieben.

## 2.5 Genomweite Expressionsanalyse Kpp2- und Kpp6-regulierter Gene

### 2.5.1 Charakterisierung der Stämme HE121, HE125, HE127 und HE131

Um die Funktion der in Kapitel 2.4 beschriebenen Stämme zu überprüfen und zugleich geeignete Zeitpunkte für die Untersuchung des Transkriptoms zu ermitteln, wurde das *fuz7DD*-Allel der Stämme HE121, HE125, HE127 und HE131 induziert und die Expression bekannter Gene zeitlich aufgelöst verfolgt. Hierzu wurden die Stämme HE121 und HE125 sowie HE127 und HE131 in CM-Glukose-Medium bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,4$  angezogen, gewaschen und in Induktionsmedium (CM-Arabinose) mit einer  $OD_{600} = 0,4$  aufgenommen. Zu den in Abbildung 12 angegebenen Zeitpunkten wurden Proben geerntet und Gesamt-RNA präpariert. Die RNA wurde in Northernanalysen bezüglich des *mfa1*-Expressionsmusters getestet. *mfa1* wird nach Expression von *fuz7DD* durch phosphoryliertes Kpp2 induziert (Müller *et al.*, 2003b). Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, zeigte der Stamm HE121 (*kpp2WT*) eine deutliche Erhöhung des *mfa1*-Transkripts nach der Aktivierung von *fuz7DD*. Dagegen zeigte der Stamm HE125 (*kpp2AEF*) nach der Induktion nur eine basale *mfa1*-Expression. Damit ist gezeigt, dass die Stämme funktionsfähig sind. Da bisher kein Kpp6-reguliertes Gen bekannt ist, wurde die Funktion des *fuz7DD*-Allels in den Stämmen HE127 und HE131 ebenfalls durch Beprobung mit einer *mfa1*-Sonde untersucht (beide Stämme tragen das native *kpp2*-Allel). Abbildung 12 zeigt, dass in diesen beiden Stämmen nach Induktion

die *mfa1*-Expression hochreguliert wird. Das Ergebnis unterstreicht, dass auch in diesen Stämmen funktionelles Fuz7DD-Protein nach Induktion des *crg1*-Promotors produziert wird.

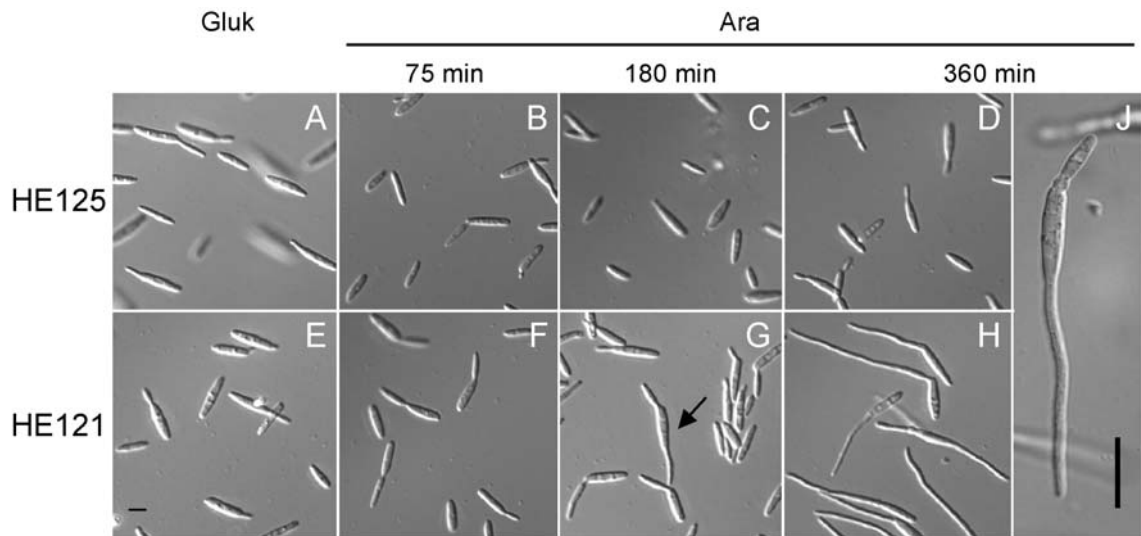


**Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der *mfa1*-Genexpression nach Induktion der *fuz7DD*-Expression.**

Für die gezeigte Northernanalyse wurden die angegebenen Stämme in CM-Glukose-Medium bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,4$  inkubiert und danach in CM-Arabinose-Medium für 30-120 min induziert. Pro Spur wurden 10  $\mu\text{g}$  RNA aufgetrennt. Die verwendeten Sonden sind rechts angegeben.

Die Northernanalyse zeigt auch, dass bis etwa 90 min nach Induktion der Stämme eine deutliche Zunahme an *mfa1* Transkript nachzuweisen ist. Danach wurde keine Zunahme mehr beobachtet. Zudem wurden die morphologischen Veränderungen nach der Induktion der Stämme untersucht. Hierbei entwickelten einzelne Zellen des Stamms HE121 bereits 180 min nach Transfer in arabinosehaltiges Medium irreguläre Filamente an einem oder beiden Polen (Abbildung 13G). Nach sechs Stunden waren nahezu alle Zellen morphologisch verändert (Abbildung 13H, J). Die ausgebildeten Filamente ähnelten Konjugationshyphen. Dieser Phänotyp wurde bereits zuvor in Stämmen beobachtet, die das *fuz7DD*-Allel in den *ip*-Locus integriert tragen (Müller *et al.*, 2003b). Dagegen wuchsen Zellen des Stamms HE125 in glukosehaltigem Medium, sowie nach Überführung in arabinosehaltiges Medium durch Knospung. Auch sechs Stunden nach Induktion des *fuz7DD*-Allels wurden in diesem Stamm keine morphologischen Veränderungen beobachtet (Abbildung 13D).





**Abbildung 13: Morphologische Antwort nach Induktion der *fuz7DD*-Expression.** Mikroskopische Aufnahmen (DIC) der Stämme HE121 (E-J) und HE125 (A-D), angezogen in CM-Glukose-Medium (Gluk) sowie 75 min, 180 min und 360 min nach Induktion des *fuz7DD*-Allels in arabinosehaltigem CM-Medium (Ara). Aufnahmen wurden entweder mit 40-facher (A-H) oder mit 100-facher Vergrößerung (J) gemacht. 180 min nach Induktion des Stamms HE121 beginnen die Sporidien filamentös an beiden Polen auszuwachsen (Pfeil). Der Größenstandard entspricht 10  $\mu$ m.

Die Stämme HE127 (*kpp6WT*) und HE131 (*kpp6AEF*) zeigten ebenfalls normales Wachstum durch Knospung in glukosehaltigem CM-Medium. Nach Überführung in Induktionsmedium zeigten beide Stämme nach 75 min morphologische Veränderungen, wie dies auch für den Stamm HE121 beobachtet wurde. Mit zunehmender Induktionszeit differenzierten auch hier nahezu alle Zellen zu Filamenten aus (nicht gezeigt). Interessanterweise zeigten bereits nach 75 min 2 % der Zellen des Stamms HE131 morphologische Veränderungen. Dagegen zeigten halb so viele Zellen des Stamms HE127 zu diesem Zeitpunkt eine Veränderung. Nach 180 min wurde dieser Unterschied noch deutlicher beobachtet: Während 14 % der Zellen in HE127 zu Filamenten ausdifferenziert waren, waren in Kulturen des Stamms HE131 bereits 21 % der Zellen morphologisch verändert. Somit ist die morphologische Veränderungen in Zellen, die das *kpp6AEF*-Allel tragen deutlich schneller zu beobachten als in Zellen, die das *kpp6* Wildtyp-Allel tragen.

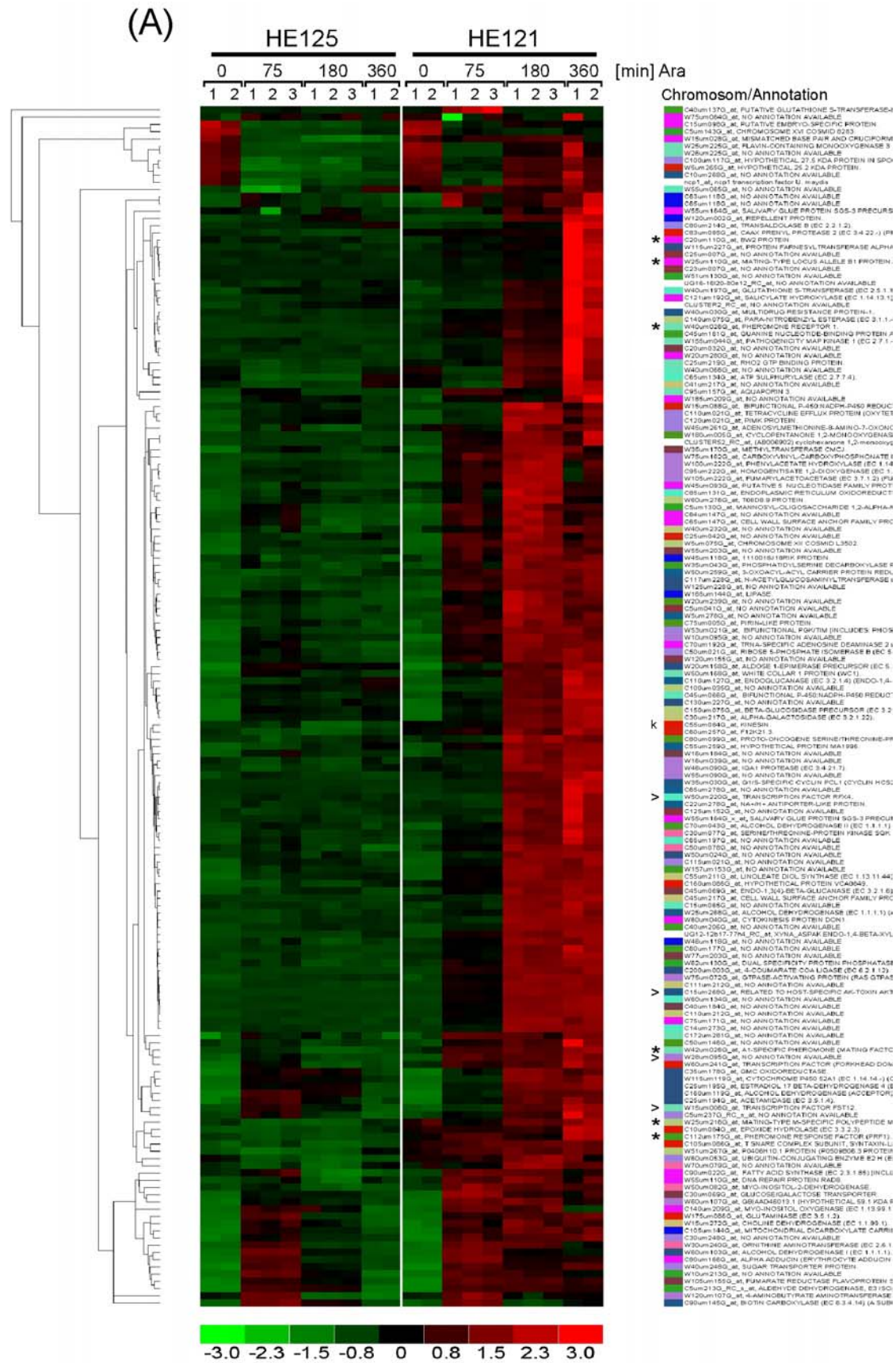
Mit diesen Experimenten wurde nachgewiesen, dass sich nach Induktion von *fuz7DD* in allen Stämmen, die das *kpp2* Wildtyp-Allel tragen, morphologische Veränderungen induzieren lassen. Diese unterbleiben, wenn Kpp2 nicht phosphorylierbar ist.

## 2.5.2 Die MAP-Kinase Kpp2 reguliert die Expression einer großen Anzahl von Genen

Um Zielgene der MAP-Kinase Kpp2 zu identifizieren, wurde das Transkriptom der Stämme HE121 (*alb1kpp2<sup>WT</sup>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DD*) und HE125 (*alb1kpp2<sup>T182AY184F</sup>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DD*) durch Microarray-Analysen untersucht. Hierzu wurden, ausgehend von Einzelkolonien, die Stämme HE121 und HE125 in CM-Glukose-Medium bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,4$  inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Kulturen in CM-Arabinose-Medium induziert. Vor, sowie 75 min, 180 min und 360 min nach Überführung in arabinosehaltiges Medium wurden Proben genommen und die RNA isoliert. Alle Experimente wurden in biologischen Replikaten durchgeführt (Abbildung 14). Nach der Durchführung der Chip-Analysen wurden die detektierten Signale mit dem Programm dChip ausgewertet (vergl. 2.3.2.; Li und Wong, 2001). Danach wurden Gene herausgefiltert, die beim Vergleich der Experiment-Arrays (HE121) mit den Kontroll-Arrays (HE125) mindestens zu einem der untersuchten Zeitpunkte zweifach oder stärker dereguliert waren. Vor der Überführung in Induktionsmedium zeigten lediglich drei Gene der zu vergleichenden Stämme eine geringfügige differentielle Expression. In allen drei Fällen handelte es sich hierbei um Gene, deren abgeleitete Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit zu Datenbankeinträgen zeigte. Insgesamt hatten 387 Gene ein verändertes Expressionsmuster über den untersuchten Zeitverlauf. Darunter waren 177 Gene Kpp2-abhängig induziert und 211 Gene reprimiert (vollständige Daten siehe Tabellen 9 und 10, CD im Anhang). Basierend auf dieser Berechnung wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt (Abbildung 14). Bei dieser Analyse wurden die Gene basierend auf der Korrelation ihrer Expressionsmuster gruppiert (Li und Wong, 2001). In Abbildung 14A sind alle Kpp2-induzierten Gene und in Abbildung 14B alle Kpp2-reprimierten Gene dargestellt. Wie in beiden Abbildungen deutlich zu erkennen ist, stieg bzw. fiel das Expressionsniveau bei der Mehrheit der Gene bereits 75 min nach der Induktion auf höhere bzw. niedrigere mRNA-Level im Vergleich zum Nullwert. Diese Regulation verstärkte sich über untersuchten Zeitraum hinweg. Die meisten Gene zeigten erst sechs Stunden nach der Induktion eine maximale Transkriptionsänderung (Abbildung 14). Das zuvor für die Stämme HE121 bzw. HE125 im Northernblot beobachtete Regulationsmuster von *mfal* konnte in diesem Experiment bestätigt werden (vergl. Abbildung 12 und 14A).

Unter den induzierten Genen wurden die Gene des *a*- und *b*-Locus sowie *prf1* und *rop1* wieder gefunden (Abbildung 14A), deren Kpp2-abhängige Regulation aus früheren Experimenten bekannt war (Müller *et al.*, 1999, 2003b; T. Brefort, pers. Mitteilung). Unter den reprimierten Genen fanden sich die Gene des *cab*-Locus. Dieses Resultat stimmt mit früheren Experimenten überein, in denen die Repression dieses Genclusters nach Aktivierung der Kpp2-MAPK-Kaskade beobachtet wurde (Brachmann, 2001). Eine genauere Analyse und Diskussion der differentiell regulierten Gene erfolgt in Kapitel 3. Es konnte davon ausgegangen werden, dass sich unter den Kpp2-regulierten Genen eine Reihe von Genen befinden, deren Expression über den Transkriptionsfaktor Prf1 reguliert wird (Müller *et al.*, 1999; 2003). Beispiele hierfür konnten mit *mfal*, *pral*, *bE1* und *bW1* in der Gruppe der hochregulierten Gene gefunden werden. In den folgenden Experimenten wurde nun untersucht, welche Zielgene durch den zentralen Transkriptionsfaktor Prf1 und welche Prf1-unabhängig durch Kpp2 reguliert werden.

**Abbildung 14: Hierarchische Clusteranalyse Kpp2-regulierter Gene.** Die Abbildung ist auf den folgenden zwei Seiten dargestellt. Gezeigt ist eine hierarchische Clusteranalyse der Expressionsprofile nach Induktion des konstitutiv aktiven MAPK-Kinase Allels *fuz7DD* in HE121 und HE125. Die Clusteranalyse wurde mit dem Programm dChip durchgeführt (Li und Wong, 2001). Hierzu wurden zunächst 387 Gene aus den insgesamt 20 Einzelexperimenten herausgefiltert, deren Expression in HE121 nach der Induktion bei einem der untersuchten Zeitpunkte größer oder gleich zweifach induziert oder reprimiert war im Vergleich zu HE125 (Li und Wong, 2001). **A)** Gene, die im Stamm HE121 induziert waren im Vergleich zu HE125. **B)** Gene, die im Stamm HE121 reprimiert waren im Vergleich zu HE125. In horizontaler Orientierung sind die Einzelexperimente in zeitlicher Reihenfolge dargestellt. Arabische Ziffern kennzeichnen biologische Replikate. Auf der rechten Seite ist jeweils die Bezeichnung des „probe sets“ sowie die vorläufige Annotation des dazugehörigen Gens aufgelistet (J. Kämper, pers. Mitteilung). Der Farbcode kennzeichnet Gene, die auf dem selben Chromosom liegen, teilweise sind die Farben doppelt vergeben. Die relative Expressionsstärke der detektierten Signale ist durch den im Bild unten dargestellten Farbcode gezeigt. Bei dieser Darstellung werden durch rote Farbe Expressionswerte gekennzeichnet, die über der durchschnittlichen Expression des Gens über alle Einzelexperimente liegen. In grün sind Expressionswerte angegeben, die niedriger als der durchschnittliche Expressionswert sind (Eisen *et al.*, 1998). Auf der linken Seite ist der Cluster-Stammbaum der Gene abgebildet. Einzelne Gengruppen sind gekennzeichnet: (\*) bekannte Zielgene von Kpp2 (siehe Text); (k) Gene, die für bekannte bzw. potentielle Kinesinmotorproteine kodieren (siehe Diskussion); (>) putative Regulatoren bzw. Gene deren Funktion näher untersucht wurde (vergl. Kapitel 2.5.4); (o) *cab*-Locus Gene (siehe Text).

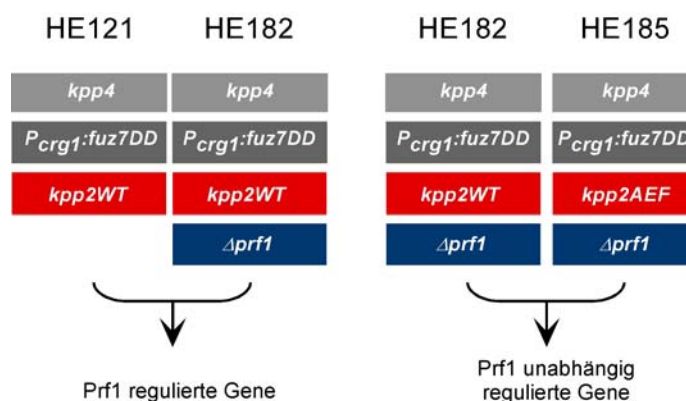






### 2.5.3 Identifizierung von Genen, die abhängig bzw. unabhängig von Prf1 reguliert werden

Um unter den Kpp2-regulierten Genen zwischen Genen zu unterscheiden, die Prf1 reguliert sind und solchen, die möglicherweise über andere Transkriptionsfaktoren reguliert werden, wurden ausgehend von HE121 und HE125 die isogenen Stämme HE182 (*a1b1kpp2<sup>WT</sup>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DDΔprf1*) und HE185 (*a1b1kpp2<sup>AEF</sup>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DDΔprf1*) hergestellt (Abbildung 15). In diesen Stämmen wurde ein die HMG-Bindedomäne umfassender Bereich des *prf1*-Gens durch die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Hierzu wurde das Plasmid pΔprf1-1 (Hartmann, 1997) in die Stämme HE121 und HE125 eingebracht. Homologe Integrationsereignisse in *prf1* wurden durch Southernblotanalysen nachgewiesen (nicht gezeigt).

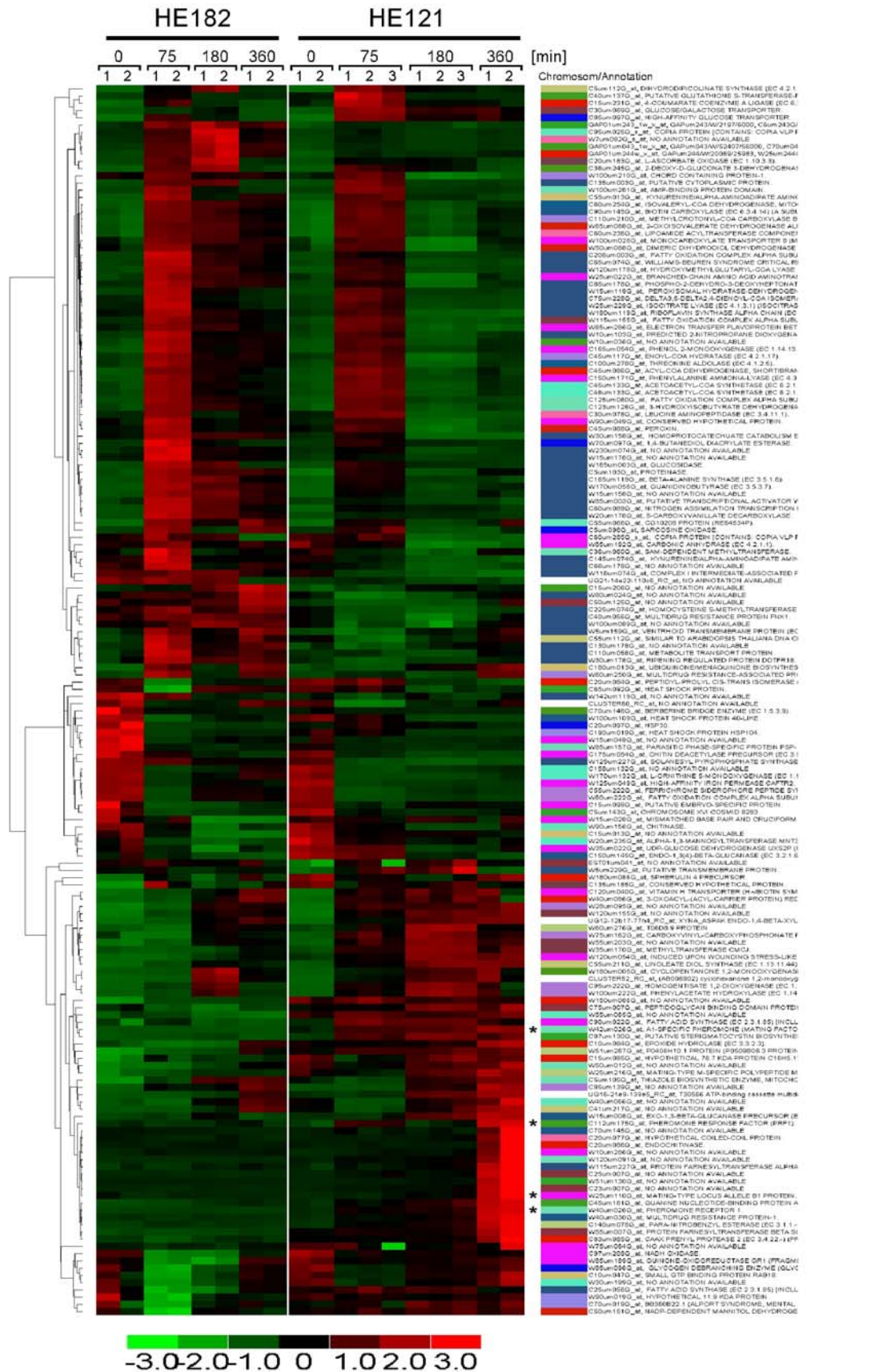


**Abbildung 15: Schematische Darstellung der Stämme HE182 und HE185.** Bei den Stämmen handelt es sich um *Δprf1*-Derivate der zuvor beschriebenen Stämme HE121 und HE125. Einzelheiten sind im Text beschrieben.

Um das Transkriptom von HE182 und HE185 zu analysieren, wurden die beiden Stämme unter gleichen Bedingungen wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben inkubiert. Vor, sowie 75 min, 180 min und 360 min nach Induktion des *fuz7DD*-Allel wurden Proben genommen und mit dem *U. maydis* Array untersucht. Die Experimente wurden zweifach durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Anschließend wurde zunächst das Transkriptom des Stamms HE182 mit dem Transkriptom des Stamms HE121 (siehe Kapitel 2.5.2) verglichen, um Gene zu identifizieren, die Prf1-abhängig von Kpp2 reguliert werden. Die für den Stamm HE182(*Δprf1*) gemessenen Expressionsdaten dienten hierbei als Kontrollelexperiment

und wurden von dem für HE121 ermittelten Datensatz „abgezogen“ (vergl. Abbildung 15). Über den untersuchten Zeitraum von 360 min wurden insgesamt 173 Gene identifiziert, die nach Aktivierung von Kpp2 durch Fuz7DD Prf1-abhängig reguliert wurden (dChip; Li und Wong, 2001, Abbildung 16 und Tabelle 11). Darunter war die Expression von 100 Genen reprimiert und 73 Gene wurden induziert. Das Transkriptionsniveau der meisten Gene wurde über den untersuchten Zeitraum erhöht bzw. erniedrigt, einige Gene zeigten erst nach 360 min eine maximale Transkriptionsänderung. Für eine Reihe an Genen wurde 75 min nach der Induktion eine vorübergehende Expressionsänderung bemerkt (Abbildung 16). Diese wurde sowohl in (HE121) als auch in dem Vergleichsexperiment/Kontrolle (HE182) beobachtet und ist möglicherweise experimentell bedingt (vergl. Diskussion).

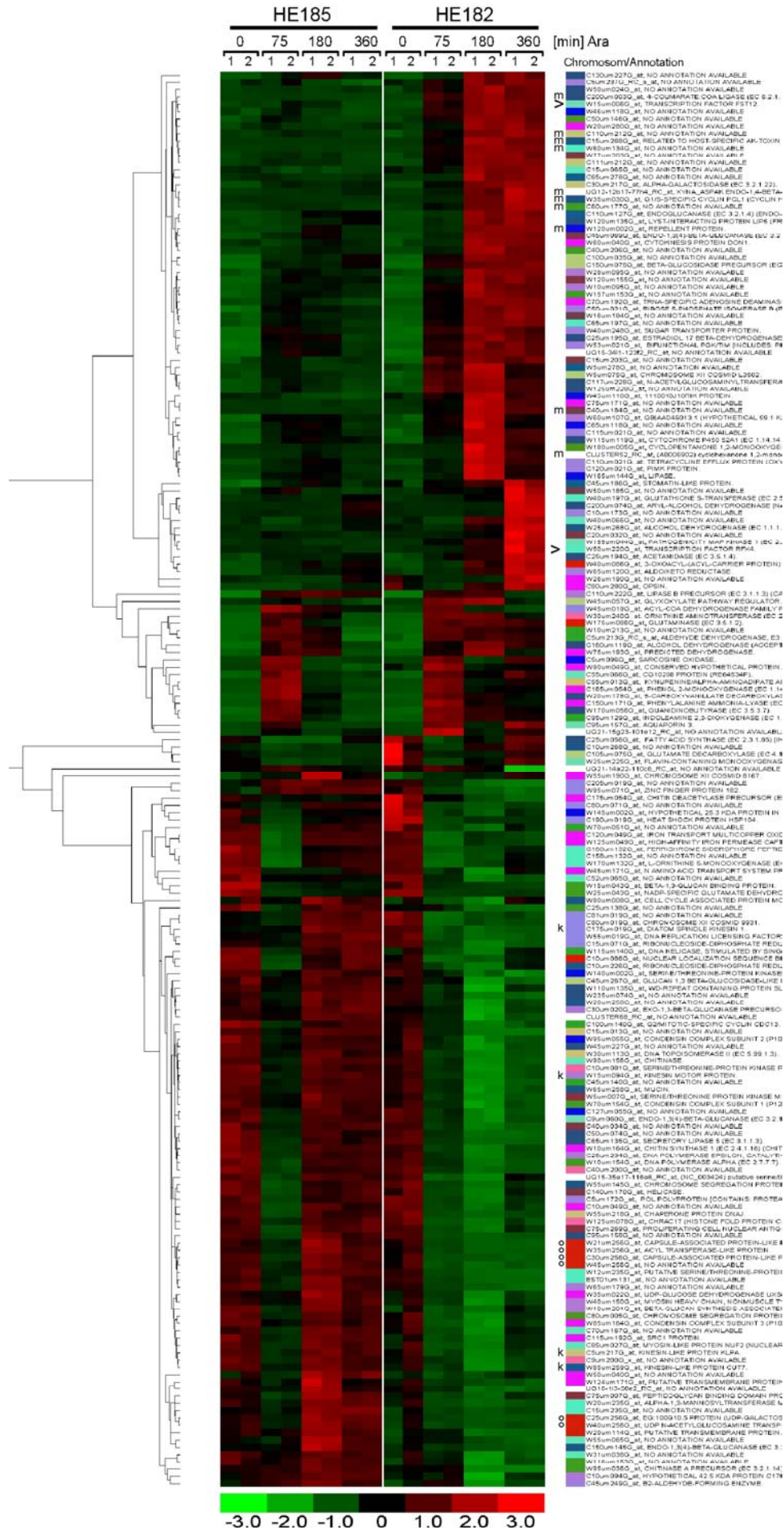
Unter den hochregulierten Genen wurden die Gene des *a*-Locus, *bE1* sowie *prf1* gefunden, deren Regulation durch Prf1 aus früheren Experimenten bekannt war (vergl. Abbildung 16, die Gene sind mit „\*“ gekennzeichnet; Hartmann *et al.*, 1996; 1997). Bei 16 der induzierten Gene konnten PREs („pheromone response elements“) in den putativen Promotorbereichen identifiziert werden und damit potentielle Bindesequenzen von Prf1 (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996). Unter diesen Genen befanden sich auch die zuvor beschriebenen neuen Gene, deren Produkte eine vermutliche Funktion bei der Biosynthese des Pheromonsignals haben. Darüber hinaus kodiert die Mehrheit der in diesem Experiment differentiell regulierten Gene für Proteine mit potentiellen Funktionen in primären und sekundären Stoffwechselprozessen. Darunter befanden sich sowohl hochregulierte, wie auch reprimierte Gene, die beispielsweise für Transportproteine, Dehydrogenasen und Oxigenasen kodieren. Außerdem wurden zahlreiche Gene dereguliert, deren Produkte eine potentielle Funktion im Fettstoffwechsel oder der Aminosäuresynthese haben, oder die Übertragung bestimmter Gruppen katalysieren (vergl. Abbildung 16).





**Abbildung 16: Hierarchische Clusteranalyse von Genen, die Prf1-abhängig von Kpp2 reguliert werden.** Gezeigt ist eine hierarchische Cluster-analyse der Expressionsprofile nach Induktion des konstitutiv aktiven MAPK-Kinase Allels *fuz7DD* in HE182 und HE121. Das Transkriptom wurde nach Anzucht der beiden Stämme in CM-Glukose-Medium (0 min) sowie 75 min, 180 min und 360 min nach Inkubation in Induktionsmedium (CM-Arabinose) untersucht (siehe Text). In horizontaler Orientierung sind die Einzelexperimente in zeitlicher Reihenfolge dargestellt. Arabische Ziffern kennzeichnen biologische Replikate. Auf der rechten Seite ist jeweils die Bezeichnung des „probe sets“ sowie die vorläufige Annotation des dazugehörigen Gens aufgelistet (J. Kämper, pers. Mitteilung). Der Farbcode kennzeichnet Gene, die auf dem selben Chromosom liegen, teilweise sind die Farben doppelt vergeben. Die relative Expressionsstärke der detektierten Signale ist durch den im Bild unten dargestellten Farbcode gezeigt. Bei dieser Darstellung werden durch rote Farbe Expressionswerte gekennzeichnet, die über der durchschnittlichen Expression des Gens über alle Einzelexperimente liegen. In grün sind Expressionswerte angegeben, die niedriger als der durchschnittliche Expressionswert sind (Eisen *et al.*, 1998). Auf der linken Seite ist der Cluster-Stammbaum der Gene abgebildet. Mit „\*“ sind Gene gekennzeichnet deren Prf1-abhängige Regulation aus früheren Experimenten bekannt war, siehe Text.

Das vorliegende Datenset wurde nun benutzt, um Gene zu identifizieren, die durch Kpp2 reguliert werden und zugleich ein Prf1-unabhängiges Expressionsmuster aufweisen. Hierzu wurden die Transkriptome der Stämme HE182 und HE185 mit dem Programm dChip (Li und Wong, 2001) miteinander verglichen (vergl. Abbildung 15, rechts). Es wurden 197 Gene herausgefiltert, deren Expression in HE182 nach der Induktion bei mindestens einem der untersuchten Zeitpunkte im Vergleich zu HE185 größer oder gleich zweifach induziert oder reprimiert war (vergl. Tabelle 12, Anhang). Die Expression von 95 Genen war induziert und 102 Gene wurden nach Aktivierung der Kaskade reprimiert. Basierend auf dem Expressionsprofil der isolierten Gene wurde eine Clusteranalyse durchgeführt (Abbildung 17; dChip; Li und Wong, 2001). Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, konnten sowohl unter den induzierten als auch unter den reprimierten Genen verschiedene Gene identifiziert werden, die eine potentielle Funktion bei der Zellzyklusregulation besitzen. Unter den reprimierten Genen konnten die *cab*-Gene (Brachmann, 2001) wiedergefunden werden. Darüber hinaus befanden sich unter den reprimierten Genen vier Gene, die für potentielle Kinesine kodieren (Abbildung 17 und Diskussion). Diese Gene wurden bereits unter den Kpp2-regulierten Genen gefunden. Von besonderem Interesse waren jedoch zwei der induzierten Gene, die für einen potentiellen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor bzw. einen putativen Transkriptionsfaktor mit Rfx-DNA-Bindemotiv kodieren (Abbildung 17). Die Funktion dieser Gene wurde in weiteren Experimenten näher untersucht.



**Abbildung 17: Hierarchische Clusteranalyse von Genen, die Prf1-unabhängig von Kpp2 reguliert werden.** Gezeigt ist eine hierarchische Clusteranalyse der Expressionsprofile nach Induktion des konstitutiv aktiven MAPK-Kinase Allels *fuz7DD* in HE182 und HE185. Das Transkriptom wurde nach Anzucht der beiden Stämme in CM-Glukose-Medium (0 min) sowie 75 min, 180 min und 360 min nach Inkubation in Induktionsmedium (CM-Arabinose) untersucht (siehe Text). Die Clusteranalyse wurde mit dem Programm dChip durchgeführt (Li und Wong, 2001). In horizontaler Orientierung sind die Einzelexperimente in zeitlicher Reihenfolge dargestellt. Arabische Ziffern kennzeichnen biologische Replikate. Auf der rechten Seite ist jeweils die Bezeichnung des „probe sets“ sowie die vorläufige Annotation des dazugehörigen Gens aufgelistet (J. Kämper, pers. Mitteilung). Der Farbcode kennzeichnet Gene, die auf dem selben Chromosom liegen, teilweise sind die Farben doppelt vergeben. Die relative Expressionsstärke der detektierten Signale ist durch den im Bild unten dargestellten Farbcode gezeigt. Bei dieser Darstellung werden durch rote Farbe Expressionswerte gekennzeichnet, die über der durchschnittlichen Expression des Gens über alle Einzelexperimente liegen. In grün sind Expressionswerte angegeben, die niedriger als der durchschnittliche Expressionswert sind (Eisen *et al.*, 1998). Auf der linken Seite ist der Cluster-Stammbaum der Gene abgebildet. Das mit einem Pfeil gekennzeichnete Cluster enthält die am stärksten induzierten Gene, die potentiellen Promotoren der markierten Gene wurden näher untersucht (vergl. Diskussion, Kapitel 3.4.1). Einzelne Gengruppen sind gekennzeichnet: (m) die Promotorbereiche dieser Gene wurden analysiert (siehe Diskussion, Kapitel 3.4.1); (k) Gene, die für bekannte bzw. potentielle Kinesinmotoren kodieren; (>) Gene putativer Transkriptionsfaktoren deren Funktion untersucht wurde (siehe Kapitel 2.5.4.3); (o) *cab*-Locus Gene (siehe Text).

## 2.5.4 Weitergehende Analyse ausgewählter Kpp2- bzw. Pheromon-regulierter Gene

### 2.5.4.1 Untersuchung des Gens *C15um268*

Bei *C15um268* handelt es sich um ein Prf1-unabhängig durch Kpp2 reguliertes Gen, das nach Aktivierung von *fuz7DD* sehr stark induziert wurde. Dieses Expressionsverhalten konnte mit Hilfe einer Northernanalyse bestätigt werden (nicht gezeigt). Interessanterweise zeigte die abgeleitete Aminosäuresequenz von *C15um268* Ähnlichkeit zu Akt2 aus *Alternaria alternata*, einem Birnenpathogen (G. Mannhaupt und J. Kämper, unveröffentl.; Tanaka *et al.*, 1999). *akt2* kodiert für ein Protein, das eine bislang unbekannte Funktion bei der wirtsspezifischen Toxinsynthese in *A. alternata* erfüllt. Deletionsmutanten produzieren kein Toxin mehr und sind apathogen (Tanaka *et al.*, 1999). Für *C15um268* ist ein offener Leserahmen von 1380 bp vorhergesagt, so dass das abgeleitete Protein 460 aa lang ist (G. Mannhaupt und J. Kämper unveröffentl.).



**Abbildung 18: Kreuzungsverhalten der *C5um12*- (HE170, HE175) und *C15um268*- (HE176, HE179) Deletionsmutanten.** Die oben links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen weiß wenn dikaryotische Filamente mit luftgefüllten Abschnitten ausgebildet werden.

Zur Untersuchung der Funktion von *C15um268* wurden Deletionsmutanten hergestellt, bei denen der offene Leserahmen fast vollständig entfernt und durch eine eGFP-Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Für die Herstellung der Deletionsmutanten HE176 (*a1b1ΔC15um268:eGFP*) und HE179 (*a2b2ΔC15um268:eGFP*) wurde das Plasmid pΔ*C15um268:eGFP* in FB1 und FB2 transformiert. Homologe Integration in den *C15um268* Locus wurde durch Southernblotanalysen bestätigt (nicht gezeigt). Die Stämme HE176 und HE179 zeigten keine erkennbaren Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Zellmorphologie

(nicht gezeigt). Auch in Bezug auf das Kreuzungsverhalten auf PD-CC-Medium (Abbildung 18) und auf Pathogenität bei der Infektion von Maispflanzen zeigten sich keine Unterschiede zu den Ausgangsstämmen (Tabelle 2). Auf Grund dieser Ergebnisse kann *C15um268* derzeit keine Funktion zugeordnet werden.

#### 2.5.4.2 Untersuchung des Gens *C5um12*

Bei *C5um12* handelt es sich um ein Pheromon-induziertes Gen, welches auch unter den Prf1-unabhängig durch Kpp2 regulierten Genen identifiziert wurde. Für *C5um12* wird ein offener Leserahmen von 2211 bp vorausgesagt (G. Mannhaupt und J. Kämper, unveröffentl.). Das abgeleitete Protein ist damit 737 aa groß und zeigt in Datenbankanalysen mit dem BLAST-Programm (Altschul *et al.*, 1997) Ähnlichkeit zu *thn1* aus *Schizophyllum commune*. Die Homologie beschränkt sich auf den Bereich zwischen Aminosäureposition 413 und 648, in dem mit Hilfe des Programms PFAM (Bateman *et al.*, 2002) eine putative RGS-Proteindomäne („regulator of G protein signalling“) gefunden wurde. Mitglieder der RGS-Proteinfamilie sind negative Regulatoren der GTPase-Aktivität von G-Proteinen (De Vries *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 1996; Dohlman, 2002). Zur Funktionsanalyse des Gens *C5um12* wurden die Deletionsmutanten HE170 (*a1b1ΔC5um12:eGFP*) und HE175 (*a2b2ΔC5um12:eGFP*) hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid pΔC5um12:eGFP in FB1 und FB2 transformiert. Der Genaustausch wurde über Southernblotanalysen bestätigt (nicht gezeigt). Die Stämme zeigten keine erkennbaren Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Zellmorphologie im Vergleich zu den Wildtypstämmen (nicht gezeigt). Auch in Bezug auf das Kreuzungsverhalten auf PD-CC-Medium (Abbildung 18) sowie bezüglich Pathogenität zeigten sich keine Unterschiede zu den Ausgangsstämmen (Tabelle 2). Da es sich bei *C5um12* um ein durch Pheromon induziertes Gen handelt war es naheliegend, dass die Deletion einen Einfluss auf das Paarungsverhalten hat. Für Mutanten des RGS-Proteins Sst2p aus *S. cerevisiae* konnte beispielsweise eine erhöhte Sensitivität gegenüber Pheromon gezeigt werden (Dohlman *et al.*, 1995; Dohlman, 2002). Allerdings konnte für die Stämmen HE170 bzw. HE175 ein vergleichbarer Phänotyp nicht beobachtet werden. Bei der Zugabe von synthetischem Pheromon zu Δ*C5um12*-Stämmen bildeten diese genauso schnell und viele Konjugationshyphen aus

wie die Wildtypkontrolle (Daten nicht gezeigt). An Hand der durchgeführten Versuche kann *C5um12* zur Zeit keine Funktion zugeordnet werden.

**Tabelle 2: Pathogenität der *C15um006*, *W50um220*, *W60um241*, *C5um12* und *C15um268* Deletionsmutanten.**

Inoculum	deletiertes Gen	Anzahl der infizierten Pflanzen	Anzahl der infizierten Pflanzen die Tumore ausbildeten (%) <sup>a)</sup>
FB1 x FB2	-	50	42 (84)
HE170 x HE175	<i>C5um12</i>	49	47 (95)
HE179 x HE176	<i>C15um268</i>	35	28 (80)
HE160 x HE165	<i>C15um006</i>	48	41 (85)
HE150 x HE155	<i>W50um220</i>	38	38 (76)
HE142 x HE146	<i>W60um241</i>	50	40 (80)

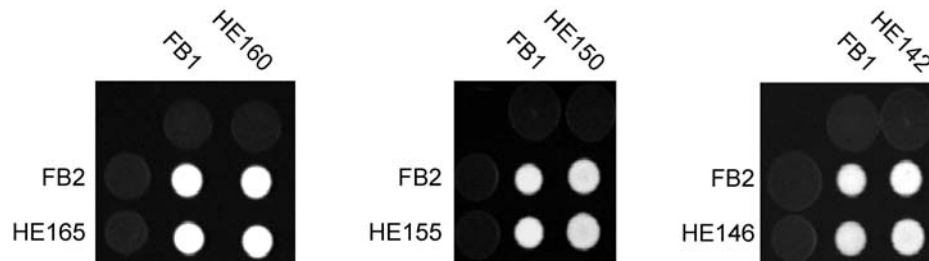
a) 14 Tage nach Infektion

#### 2.5.4.3 Untersuchung der Transkriptionsfaktoren *C15um006*, *W50um220* und *W60um241*

Unter den Kpp2-induzierten Genen befanden sich auch die potentiellen Transkriptionsfaktoren *C15um006*, *W50um220* und *W60um241*. Die Expression aller drei Gene war nach Aktivierung der Kpp2-Kaskade zwei- bis dreifach hochreguliert. Von besonderem Interesse waren die Prf1-unabhängig regulierten Gene *C15um006* und *W50um220*, die als mögliche Kandidaten für einen zentralen Transkriptionsfaktor der Konjugationshyphenentwicklung in Frage kamen.

Bei *C15um006* handelt es sich um ein putatives Zinkfinger-Protein. Für das Gen wird ein offener Leserahmen von 1941 bp vorhergesagt, so dass das abgeleitete Protein 647 Aminosäuren lang ist (G. Mannhaupt und J. Kämper, unveröffentl). Eine Analyse mit dem BLASTP-Programm (Altschul *et al.*, 1990; 1997) ergab, dass *C15um006* Ähnlichkeit zu den Transkriptionsfaktoren Ste12p aus *C. neoformans* und Cst1 aus *Colletotrichum lagenarium* besitzt. Die Homologie beschränkt sich allerdings auf Bereiche zwischen Aminosäure 490 und 511 und 517 und 541, in denen Ähnlichkeit zu DNA-Bindemotiven des C2H2-Zinkfinger-Typs gefunden wird (Bateman *et al.*, 2002). Obwohl *C15um006* die für *STE12* charakteristische Homeodomäne nicht aufweist, wurde dieses Gen näher charakterisiert, da die *STE12*-Homologen *cst1* aus

*C. lagenarium* und *mst12* aus *Magnaporthe grisea* eine essentielle Funktion während der frühen Infektionsphase besitzen (Park *et al.*, 2002; Tsuji *et al.*, 2003).



**Abbildung 19: Kreuzungsverhalten der *C15um006*-, *W50um220*- und *W60um241*-Deletionsmutanten.** Die oben links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen weiß wenn dikaryotische Filamente mit luftgefüllten Abschnitten ausgebildet werden.

Für das Gen *W50um220* konnte mit Hilfe des PEDANT-Algorithmus ein kodierender Bereich von 2016 bp vorhergesagt werden. Das daraus abgeleitete Protein ist 672 Aminosäuren lang (G. Mannhaupt und J. Kämper, unveröffentl.; Frishman *et al.*, 2003). Eine Analyse des Proteins mit dem PFAM-Programm (Bateman *et al.*, 2002) ordnete dem Bereich zwischen Aminosäure 286 und 369 Ähnlichkeit zur Familie der Rfx-Transkriptionsfaktoren zu. Diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren reguliert durch Bindung an sogenannte X-Box-Motive die Expression von Genen unterschiedlicher Funktion (Reith *et al.*, 1990). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *W50um220* in Tumorgewebe stark hochreguliert wird, was auf eine Funktion dieses putativen Transkriptionsfaktors während der pathogenen Entwicklung hindeutet (M. Vranes und J. Kämper, pers. Mitteilung).

Für das Gen *W60um241* wird ein offener Leserahmen von 1941 bp vorhergesagt. Das daraus abgeleitete Protein ist 911 Aminosäuren lang (G. Mannhaupt und J. Kämper, unveröffentl.). In einer Analyse mit dem Programm PFAM (Bateman *et al.*, 2002) zeigte der Bereich zwischen Aminosäure 535 und 655 Ähnlichkeit zu „fork-head“-DNA-Bindemotiven. Mitglieder dieser Proteinfamilie wurden u.a. in *S. cerevisiae* beschrieben. Unter anderem wird beispielsweise für den „fork-head“-Transkriptionsfaktor *HCMI* eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus diskutiert (Horak *et al.*, 2002).

Um die Funktion dieser drei Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten hergestellt. Hierbei wurde der entsprechende offene Leserahmen fast vollständig entfernt und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Für die Herstellung der Deletionsmutanten HE160 (*a1b1ΔC15um006*) und HE165 (*a2b2ΔC15um006*) wurde das Plasmid pΔC15um006, sowie für die Herstellung der Stämme HE150 (*a1b1ΔW50um220*) und HE155 (*a2b2ΔW50um220*) das Plasmid pΔW50um220 in FB1 und FB2 transformiert. Die Stämme HE142 (*a1b1ΔW60um241*) und HE146 (*a2b2ΔW60um241*) wurden durch Transformation des Plasmids pΔW60um241 in FB1 und FB2 hergestellt. In allen Fällen wurde die homologe Integration durch Southernblotanalysen bestätigt (nicht gezeigt). Weder im Wachstumsverhalten noch in der Zellmorphologie konnten Unterschiede im Vergleich zu den Wildtypstämmen gesehen werden (nicht gezeigt). Auch in Bezug auf das Kreuzungsverhalten auf PD-CC-Medium (Abbildung 19) und auf Pathogenität bei der Infektion von Maispflanzen zeigten sich keine Unterschiede zu den Ausgangsstämmen (Tabelle 2). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keiner der untersuchten Transkriptionsfaktoren eine essentielle Funktion für die Kpp2-vermittelte Signalantwort besitzt.

### 2.5.5 Kpp6-regulierte Gene

Zur Identifikation von Zielgenen der MAP-Kinase Kpp6 wurde das Transkriptom der Stämme HE127 (*a1b1Δkpp6ip<sup>r</sup>[P<sub>oref</sub>:kpp6NA]ip<sup>s</sup>fuz7::P<sub>crgl</sub>:fuz7DD*) und HE125 (*a1b1Δkpp6ip<sup>r</sup>[P<sub>oref</sub>:kpp6<sup>AEF</sup>]ip<sup>s</sup>fuz7::P<sub>crgl</sub>:fuz7DD*) mit Hilfe des *U. maydis* Microarrays verglichen. Hierzu wurden die beiden Stämme in CM-Glukose-Medium inkubiert und im Anschluss daran in CM-Arabinose-Medium induziert (siehe vorheriges Kapitel und Material und Methoden). Vor, sowie 75 min, 180 min und 360 min nach Überführung der Zellen in arabinosehaltiges Induktionsmedium wurden Proben genommen und die RNA isoliert. Alle Experimente wurden in biologischen Replikaten durchgeführt. Beim Vergleich der Microarraydaten konnten überraschenderweise zu keinem Zeitpunkt Gene mit einer signifikanten, differentiellen Regulation identifiziert werden.

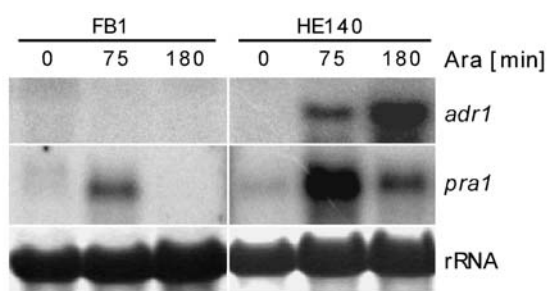


## 2.6 Genomweite Expressionsanalyse nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurden zahlreiche Gene identifiziert, die durch Pheromon bzw. die MAP-Kinase Kpp2 reguliert werden. In diesem Experiment wurde nun das Transkriptom des Stamms HE140 und damit das Expressionsprofil nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs untersucht. Wie einleitend beschrieben wurde ist neben der Kpp2-MAPK-Kaskade der cAMP-Signalweg für die Signalweiterleitung bei der Pheromonantwort essentiell. Mit Hilfe dieses Experiments sollte u.a. untersucht werden, welche der im Pheromonstimulationsexperiment gefundenen Gene durch die cAMP-Kaskade reguliert werden.

### 2.6.1 Charakterisierung des Stamms HE140

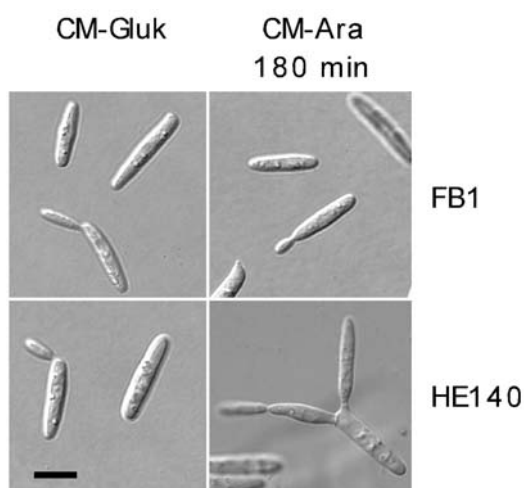
Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, trägt der Stamm HE140 die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A, *adr1*, unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors. Um die Funktion dieses Allels zu überprüfen wurde der Stamm HE140 sowie FB1-Wildtyp in CM-Glukose-Medium bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,4$  inkubiert. Danach wurden die Zellen in gleicher Dichte in arabinosehaltiges Induktionsmedium überführt. Vor, sowie 75 min und 180 min nach Induktion wurden Proben entnommen, die RNA daraus isoliert und in einer Northernanalyse untersucht (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Northernanalyse zur Charakterisierung des Stamms HE140.** FB1 Wildtyp und HE140 wurden in CM-Glukose-Medium bis zu einer  $OD_{600} \approx 0,6$  angezogen und danach in einer Dichte von  $OD_{600} = 0,5$  für 75 min und 180 min in CM-Arabinose-Medium induziert. Pro Spur wurden jeweils  $10 \mu\text{g}$  RNA aufgetragen. Als Ladekontrolle ist eine Methylblaufärbung der rRNA gezeigt.

Zunächst wurde der Blot mit einer *adr1*-spezifischen Sonde beprobt. Wie Abbildung 20 zeigt, war in der RNA aus Wildtypzellen sowie dem Stamm HE140 zum Zeitpunkt 0 min nur eine sehr geringe Menge an *adr1*-Transkript detektierbar. Während das Expressionsniveau in HE140 nach der Induktion deutlich anstieg, konnte in RNA-Proben aus FB1 keine *adr1*-Expression detektiert werden (Abbildung 20).

Außerdem wurde der Northernblot mit einer Sonde des Pheromonrezeptorgens *pral* beprobt, von dem gezeigt wurde, dass er durch *adr1* induziert wird (Krüger *et al.*, 1998). Die *pral*-Expression in HE140-Zellen wurde 75 min nach Überführung in Induktionsmedium stark hochreguliert und ging nach 180 min auf ein niedrigeres Niveau zurück. In FB1-Zellen wurde 75 min nach Überführung der Zellen in arabinosehaltiges Medium ebenfalls eine Zunahme von *pral*-mRNA beobachtet, dieser Anstieg war jedoch transient und verschwand nach 180 min. Dies deutete darauf hin, dass die Expression durch den Medienwechsel vorübergehend beeinflusst wurde. Die Funktion des *P<sub>crg1</sub>:adr1*-Allels wurde darüber hinaus auf morphologischer Ebene untersucht. Hierzu wurden Zellen des HE140 Stamms zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion lichtmikroskopisch untersucht und mit Zellen des Wildtyps verglichen. 180 min nach der Überführung in arabinosehaltiges Medium hatten 7 % der HE140-Zellen eine zweite Knospe am selben Pol ausgebildet, oder bildeten laterale Knospen aus (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Morphologische Veränderung des Stamms HE140 nach Induktion.** FB1 Wildtyp und HE140 wurden in CM-Glukose-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,5$  angezogen und danach in einer Dichte von  $OD_{600} = 0,5$  für 180 min in CM-Arabinose-Medium induziert. Die Zellen wurden mit DIC-Optik mikroskopiert. Der Längenmaßstab bezieht sich auf alle gezeigten Bilder und entspricht  $5 \mu\text{m}$  (Einzelheiten sind im Text beschrieben).

Diese phänotypischen Veränderungen werden als „multiple budding“ bezeichnet (Gold *et al.*, 1994) und können in Zellen beobachtet werden, bei denen die regulatorische Untereinheit der PKA deletiert ist, oder bei Wildtypzellen, denen cAMP in das Kulturmedium zugesetzt wurde (Gold *et al.*, 1994; 1997). Nach zehn Stunden zeigten 71 % der Zellen diesen Phänotyp, während in FB1 keine morphologischen Veränderungen sichtbar waren (Abbildung 21). Diese Ergebnisse zeigten, dass HE140 geeignet ist, die Veränderung des Transkriptoms nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs zu untersuchen.

## 2.6.2 Identifizierung *Adr1*-abhängig regulierter Gene

Für die Durchführung der Microarray-Analysen wurden die Stämme HE140 und FB1 bis zur logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,5$ ) in glukosehaltigem CM-Medium angezogen. Anschließend wurde die Expression von *adr1* durch Überführen der Zellen in arabinosehaltiges CM-Medium induziert. Vor, sowie 75 min und 180 min nach Induktion wurde die RNA isoliert und Microarray-Analysen durchgeführt. Die Experimente wurden in zwei bzw. drei biologischen Replikaten durchgeführt (vergl. Abbildung 22). Beim Vergleich des Stamms HE140 mit dem Wildtyp FB1 wurden 390 Gene herausgefiltert, deren Expression in HE140 bei mindestens einem der untersuchten Zeitpunkte größer oder gleich zweifach induziert oder reprimiert war (dChip; Li und Wong, 2001), (Tabelle 13). Basierend auf dem Expressionsprofil der gefilterten Gene wurde eine Clusteranalyse durchgeführt (dChip; Li und Wong, 2001). Die meisten Gene zeigten ein transientes Expressionsmuster. Beispielsweise wurde im Stamm HE140 zunächst eine Expressionserhöhung beobachtet, welche nach 180 min jedoch wieder auf einen Wert unterhalb der Kontrolle zurückging. Unter diesen Genen befanden sich auch *pral*, *prfl* und die Gene des *b*-Locus (vergl. Abbildung 22A). Die im vorliegenden Experiment beobachtete, transiente Transkriptionsaktivierung dieser Gene deutete auf eine spezifische Eigenschaft des Stamms HE140 hin. Möglicherweise führt die Überexpression von *adr1* zu einer negativen Rückkopplung der Transkriptionsregulation (vergl. Diskussion). Aus diesem Grund wurden bei späteren Vergleichen die Regulation der Gene nach 180 min nicht mit einbezogen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den differentiell regulierten Genen Repräsentanten der unterschiedlichsten funktionellen Kategorien gefunden wurden: Darunter befanden sich beispielsweise zahlreiche Gene, die für potentielle Transporter oder Komponenten des Sekundärmetabolismus kodieren. Eine Gruppe von insgesamt zehn Genen war von besonderem Interesse, da sie ein ähnliches Expressionsmuster aufwiesen (vergl. Abbildung 22B, C) und zudem für Proteine kodieren, die eine putative Funktion bei der Eisenaufnahme in *U. maydis* haben. Unter diesen Genen befanden sich auch die bereits bekannten Gene *sid1* und *sid2*, die als Teil des Siderophoren-Biosyntheseclusters beschrieben wurden (Mei *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 2001). In den folgenden Experimenten wurde die Regulation und Funktion dieser Gencluster näher untersucht.

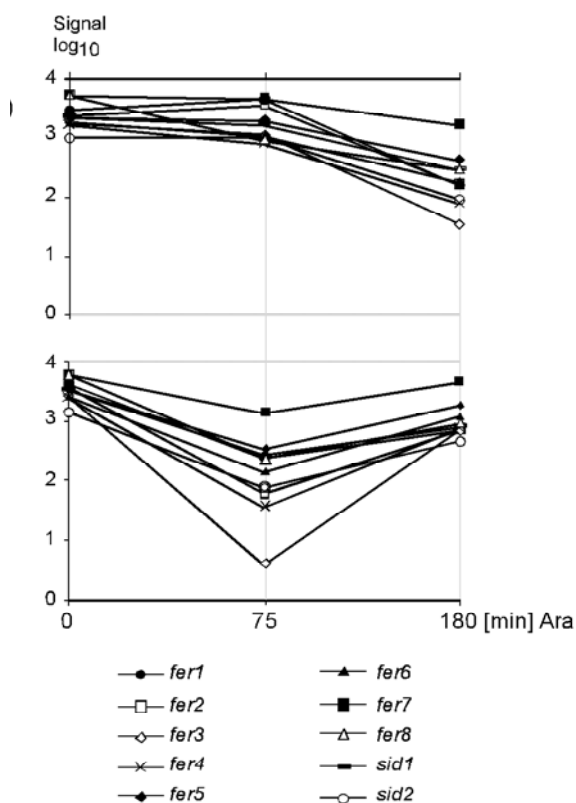




**Abbildung 22 Hierarchische Clusteranalyse Adr1-regulierter Gene.** Gezeigt ist eine hierarchische Clusteranalyse der Expressionsprofile nach Induktion der Expression von *adr1*. Das Transkriptom wurde nach Inkubation des Stamms HE140 in CM-Glukose-Medium (0 min) sowie 75 min und 180 min nach Wachstum in Induktionsmedium (CM-Arabinose-Medium) untersucht (siehe Text). Die Clusteranalyse wurde mit dem Programm dChip durchgeführt (Li und Wong, 2001). Hierzu wurden zunächst 390 Gene aus den insgesamt 16 Einzelexperimenten herausgefiltert, deren Expression in HE140 nach der Aktivierung des cAMP-Signalwegs bei einem der untersuchten Zeitpunkte größer oder gleich zweifach induziert oder reprimiert war im Vergleich zu FB1 (Li und Wong, 2001). Bei der Analyse wurden die Gene basierend auf der Korrelation ihres Expressionsmuster geclustert (Li und Wong, 2001). In horizontaler Orientierung sind die Einzelexperimente in zeitlicher Reihenfolge dargestellt. Arabische Ziffern kennzeichnen biologische Replikate. Auf der rechten Seite ist jeweils die Bezeichnung des „probe sets“ sowie die vorläufige Annotation des dazugehörigen Gens aufgelistet (J. Kämper, pers. Mitteilung). Der Farbcode kennzeichnet Gene, die auf dem selben Chromosom liegen, teilweise sind die Farben doppelt vergeben. Die relative Expressionsstärke der detektierten Signale ist durch den im Bild unten dargestellten Farbverlauf gezeigt. Bei dieser Darstellung nach Eisen *et al.* (1998) werden durch rote Farbe Expressionswerte gekennzeichnet, die über der durchschnittlichen Expression des Gens über alle Einzelexperimente liegen. In grün sind Expressionswerte angegeben, die niedriger als der durchschnittliche Expressionswert sind. Auf der linken Seite ist der Cluster-Stammbaum der Gene abgebildet. Einzelne Gengruppen sind besonders gekennzeichnet: „A“ koregulierende Gene mit neuen und bekannten Genen der Pheromonantwort, „B,C“ Eisengencluster, siehe Text.

### 2.6.3 Identifizierung von drei koregulierten Genclustern mit vermutlicher Funktion bei der Eisenaufnahme

Die Expression der zuvor angesprochenen Gene, die als *fer*-Gene bezeichnet wurden, ist in Abbildung 23 dargestellt. Sowohl im Wildtyp als auch in HE140 wurde für alle *fer*-Gene sowie für *sid1* und *sid2* ein relativ hohes Expressionsniveau vor der Induktion von *adr1* gefunden. 75 min nach Aktivierung des cAMP-Wegs blieb dieses Expressionsniveau in HE140-Zellen stabil und sank nach 180 min auf einen niedrigeren Wert ab (Abbildung 23). Dagegen fiel die Expression der *fer*-Gene in FB1 bereits nach 75 min deutlich ab und kehrte nach 180 min auf etwa Ausgangsniveau zurück (Abbildung 23).

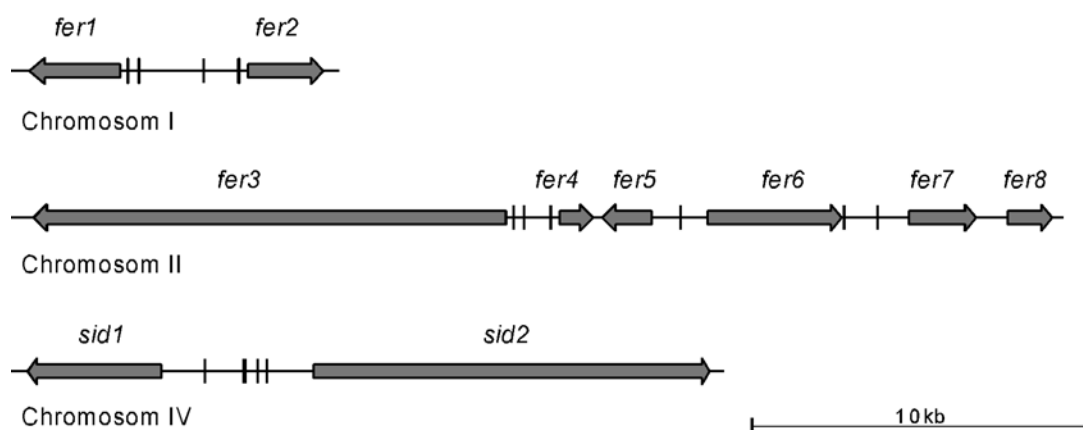


**Abbildung 23: Koregulierte Genexpression der *fer*-Gene in den Eisengenclustern.**

Dargestellt ist die transiente Genexpression der *fer*-Gene (siehe Legende) in den Stämmen FB1 (unten) und HE140 (oben) vor (0 min) und nach Inkubation der Stämme in Induktionsmedium. Aufgetragen sind die durchschnittlichen Expressionssignale der biologischen Replikate gegen die Zeit.

Dieses Ergebnis zeigte, dass die Expression von *adr1* einen Einfluss auf die Expression der *fer*-Gene bzw. auf *sid1* und *sid2* hat. Diese Gene waren nicht nur koreguliert und hatten eine putative Funktion bei der Eisenaufnahme, sondern konnten darüber hinaus in drei Genclustern lokalisiert werden (Abbildung 24 und Tabelle 3). Unter diesen Clustern befand sich das bereits bekannte Siderophoren-Biosynthesecluster auf Chromosom IV, das die Gene *sid1* und *sid2* umfasst. *sid1* kodiert für eine L-Ornithin-N<sup>5</sup>-Monooxygenase. Dieses Enzym katalysiert die Hydroxylierung von Lysin und damit

den initialen Syntheseschritt der Siderophorenbiosynthese (Mei *et al.*, 1993). Sid2 ist eine Nichtribosomale-Peptid-Synthetase (NRP) und vermittelt die Synthese von Ferrichrom, einem von zwei Siderophoren in *U. maydis* (Budde und Leong, 1989; Yuan *et al.*, 2001). Die Gene *fer3-fer8* wurden auf Chromosom II lokalisiert (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Physikalische Karte der Eisengencuster.** Die koregulierten Gene *fer1-fer8*, sowie die bereits bekannten Gene *sid1* und *sid2* sind auf drei Chromosomen lokalisiert (Budde und Leong, 1989; Mei *et al.*, 1993). Kodierende Bereiche sind als graue Pfeile dargestellt, Pfeilspitzen kennzeichnen die Richtung der Transkription. Als vertikale Striche sind potentielle Urbs1 Bindestellen eingezeichnet, die der Konsensussequenz (G/TGATAA) entsprechen (Kapitel 2.6.4; An *et al.*, 1997).

*fer3* kodiert für eine neue, putative Siderophoren-Peptidsynthetase. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt große Ähnlichkeit zu Sid2 (Tabelle 3). Divergent zu *fer3* wird das Gen *fer4* transkribiert (Abbildung 24 und Tabelle 3). *fer4* kodiert für eine putative Enoyl-CoA-Isomerase (Tabelle 3). Möglicherweise katalysiert dieses Enzym die *trans*-Isomerisierung des Acetyl-Rests von Hydroxy-Ornithin. Im selben Cluster wurde mit *fer5* das Gen einer vermutliche Acetylase gefunden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt Ähnlichkeit zu einer Transacetylase, die eine Funktion in der Aerobaktin-Siderophoren-Biosynthese in *E. coli* besitzt (Tabelle 3). Außerdem wurden mit den *fer6* und *fer7* zwei Gene für Transporter der „major-facilitator“-Proteinfamilie gefunden (Tabelle 3). Die abgeleitete Proteinsequenz von *fer7* zeigt Homologie zu dem Siderophorentransporter Sit1p aus *S. cerevisiae* (Lesuisse *et al.*, 1998). Dies deutet auf eine vergleichbare Funktion von Fer7 hin. Bei *fer6* handelt es sich vermutlich um das Gen eines multispezifischen ABC-Transporters, für den eine Rolle beim Transport alternativer Eisenkomplexe diskutiert wird (vergl. Tabelle 3; Kosman, 2003). Damit



---

besitzen die Produkte aller auf Chromosom II und IV lokalisierten Gene eine vermutliche Funktion bei der nicht-reduktiven Eisenaufnahme von *U. maydis* (Tabelle 3). Eine Ausnahme bildet *fer8*, dessen Funktion unklar ist. Im Gegensatz hierzu kodieren die beiden auf Chromosom I lokalisierten Gene *fer1* und *fer2* für potentielle Komponenten des reduktiven Eisenaufnahmewegs (Tabelle 3, vergl. Kosman, 2003). *fer1* kodiert für eine putative Ferroxidase (Tabelle 3). In divergenter Transkriptionsrichtung liegt das Gen *fer2* benachbart. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt Ähnlichkeit zu einer hochaffinen Eisenpermease aus *Candida albicans* (Tabelle 3; Kapitel 2.7).

**Tabelle 3: Homologie der Gene in den Eisengenclustern**

Funktion <sup>b)</sup>	Gen	aa <sup>b)</sup>	Position <sup>a)</sup>	Acc. No.	Homologie/Referenz	E-Wert
Putative Ferroxidase	<i>fer1</i>	629	222056-220167 <sup>b)</sup> (2)	BK004082	Afet3, Ferro-O2-oxidoreduktase, <i>Arxula adenivorans</i> , CAB90817	1e-108
Hochaffine Eisenpermease	<i>fer2</i>	486	224728-226275 <sup>b)</sup> [1] <sup>c)</sup>	BK004082	CaFTR2, Hochaffine Eisenpermease, <i>C.albicans</i> , AAF69681	9e-46
Putative Siderophoren-Peptidsynthetase	<i>fer3</i>	4830	92548-107141 <sup>b)</sup> [1]	BK004083	Sid2, Ferrichrom Siderophoren-Peptidsynthetase, <i>U. maydis</i> , U62738	7e-90
Putative Enoyl-CoA-Isomerase	<i>fer4</i>	274	90867-89862 <sup>b)</sup> [2]	BK004083	Enoyl-CoA-Hydratase <i>Homo sapiens</i> , CAA56260	4e-37
Putative Acetylase	<i>fer5</i>	427	88032-89579 <sup>b)</sup> [3]	BK004083	Putative Acetylase, <i>Pseudomonas fluorescens</i> , AAL59665	3e-26
„major facilitator“	<i>fer6</i>	1397	86344-82151 <sup>b)</sup> (49)	BK004083	ABC-Transporter <i>Neurospora crassa</i> AL513445	0.0
Putativer Siderophoren-transporter	<i>fer7</i>	659	80066-77991 <sup>b)</sup> [1]	BK004083	Sit1p, Siderophoren-transporter; <i>S. cerevisiae</i> , NP_010849	9e-37
Hypothetisches Protein	<i>fer8</i>	398	77048-75648 <sup>b)</sup> [2]	BK004083	-	-
L-N <sup>5</sup> -Ornithin-5-Monooxygenase	<i>sid1</i>	570	236891-240880 [2]	M98520	Baigen <i>et al.</i> , 1993	siehe Referenz
Ferrichrom-Siderophoren-Peptidsynthetase	<i>sid2</i>	4114 <sup>d)</sup>	245412-257756 <sup>b)</sup> (188)	U62738	Yuan <i>et al.</i> , 2001	siehe Referenz

a) [http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/ustilago\\_maydis/](http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/); (Contig); [vorhergesagte Introns]

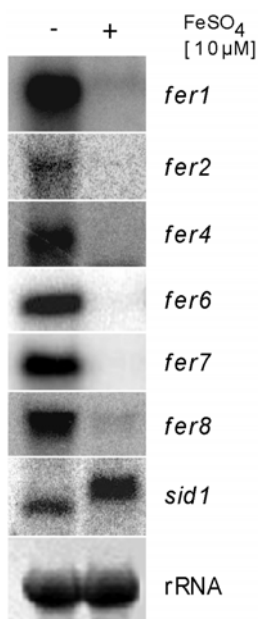
b) PEDANT-Analyse, G. Mannhaupt, J. Kämper und W. Mewes, nicht veröffentl.

c) durch Sequenzierung bestätigt (siehe Text)

d) Die durch das Whitehead-Institut bestimmte Sequenz (a) unterscheidet sich von der von Yuan *et al.*, (2001) um 55 aa des C-Terminus von *sid2*, der nach der Whitehead Sequenz 226 aa umfasst.

### 2.6.4 Die Expression der *fer*-Gene wird durch Eisen reprimiert

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression der Gene *sid1* und *sid2* unter Bedingungen, in denen eine ausreichende Konzentration von Eisen vorhanden ist, reprimiert wird (Mei *et al.*, 1993; An *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 2001). Diese negative Regulation wird durch den GATA-Transkriptionsfaktor Urbs1 vermittelt (An *et al.*, 1997). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Promotorbereiche der *fer*-Gene auf potentielle Urbs1-Bindesequenzen (G/TGATAA) hin durchsucht (An *et al.*, 1997). Mit Ausnahme von *fer8* konnten in allen intergenischen Bereichen Urbs1-Bindestellen identifiziert werden, die der Konsensussequenz entsprechen (Abbildung 24). Um zu untersuchen, ob die Transkription der *fer*-Gene durch Eisen reprimiert wird, wurden Northernanalysen durchgeführt.



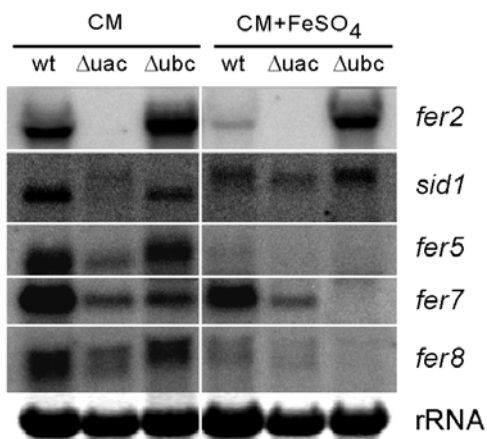
**Abbildung 25: Die Expression der *fer*-Gene wird durch Eisen reprimiert.** Der Stamm FB1 (Wildtyp) wurde in Minimalmedium (Sundström, 1964) mit (+) und ohne (-) Zugabe von 10  $\mu$ M  $\text{FeSO}_4$  bis zu einer Dichte  $\text{OD}_{600} = 0,5$  inkubiert. Pro Spur wurden 10  $\mu$ g RNA geladen. Zwei Gele wurden parallel hergestellt und nacheinander beprobt (siehe Material und Methoden; die Northernanalyse wurde teilweise von F. Leßing durchgeführt). Als Ladekontrolle ist die Methylenblaufärbung der rRNA gezeigt.

Hierzu wurden FB1 (*alb1*) Wildtypzellen in Eisenmangelmedium (Sundström, 1964) oder im gleichen Medium, dem 10  $\mu$ M  $\text{FeSO}_4$  zugesetzt wurde, inkubiert. Die RNA aus diesen Kulturen wurde in einem Northernblot aufgetrennt und mit spezifischen Hybridisierungssonden der *fer*-Gene beprobt (Abbildung 25). Wie in der Abbildung 25 zu sehen ist, zeigten alle untersuchten Gene ein basales bzw. nicht detektierbares Expressionsniveau, wenn dem Medium Eisen ( $\text{FeSO}_4$ ) zugesetzt war. Unter Eisenmangelbedingungen konnte für alle diese Gene eine starke Expression

nachgewiesen werden (Abbildung 25). Als Kontrolle wurde mit einer *sid1*-Sonde beprobt. Hierbei konnte die Beobachtung bestätigt werden, dass unter Eisenmangel ein etwa 2,3 kb großes Transkript dominiert, während in Medium, dem 10  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> zugesetzt wurde, ein größeres Transkript nachgewiesen werden kann (Mei *et al.*, 1993). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression der *fer*-Gene durch Eisen reprimiert wird, wie dies auch für *sid2* gezeigt werden konnte (Mei *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 2001). Es kann außerdem abgeleitet werden, dass in CM-Medium, welches für die Microarray-Experimente benutzt wurde, Eisenmangelbedingungen herrschen.

### **2.6.5 Zur Expression der *fer*-Gene wird ein intakter cAMP-Signalweg benötigt**

Um den Zusammenhang zwischen der eisenabhängigen Repression und der cAMP-abhängigen Regulation näher zu beleuchten, wurde das Expressionsverhalten der *fer*-Gene in Mutanten des cAMP-Signalwegs untersucht. Hierzu wurden die Stämme FB1 $\Delta$ uac1, FB1 $\Delta$ ubc1 und FB1 in CM bzw. unter Zugabe von FeSO<sub>4</sub> angezogen und die Expression einzelner *fer*-Gene in Northernanalysen untersucht (Abbildung 26). Im  $\Delta$ uac1-Stamm ist die Adenylatzyklase deletiert. In diesen Mutanten kann kein cAMP gebildet werden. Dagegen liegt in der  $\Delta$ ubc1-Mutante, der die regulatorische Untereinheit der Adr1 fehlt, eine maximal aktivierte PKA vor (Barrett *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 1994). In FB1 $\Delta$ uac1 konnte keine Expression von *fer2* nachgewiesen werden, während in FB1 ein hohes Expressionsniveau unter Eisenmangelbedingungen nachweisbar war (Abbildung 26). In CM-Medium, dem Eisen zugesetzt war, konnte nur eine basale Menge an *fer2*-mRNA detektiert werden. In der  $\Delta$ ubc1-Mutante wird die *fer2*-Expression induziert. Diese Induktion scheint weitgehend von der Eisenkonzentration im Medium unabhängig zu sein. Bei den Genen *fer5*, *fer7* und *fer8* wurde ein anderes Expressionsmuster beobachtet (Abbildung 26). Für diese Gene wurden im Vergleich zum Wildtyp geringere Mengen an mRNA in  $\Delta$ uac1-Stämmen detektiert. Das Expressionsniveau in FB1 $\Delta$ ubc1 war vergleichbar mit Wildtypzellen und fast vollständig reprimiert wenn Eisen dem Medium zugegeben war (Abbildung 26). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in diesem Fall die eisenvermittelte, negative Regulation dem Effekt einer aktivierten PKA übergeordnet ist.



**Abbildung 26: Für die Expression der *fer*-Gene wird ein intakter cAMP-Signalweg benötigt.** Für die gezeigte Northernanalyse wurden die angegebenen Stämme mit und ohne Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  bis zu einer Dichte  $\text{OD}_{600} = 0,5$  in CM-Glukose-Medium inkubiert. Pro Spur wurden 10  $\mu\text{g}$  RNA geladen. Zwei Gele wurden parallel hergestellt und nacheinander beprobt (siehe Material und Methoden). Als Ladekontrolle ist die Methylenblaufärbung der rRNA gezeigt.

Für *sid1* wurde in FB1  $\Delta uac1$ -Proben ein 2,7 kb großes Transkript detektiert und zwar unabhängig von der Präsenz von Eisen im Medium. Dagegen konnte dieses Transkript in FB1 Wildtypzellen nur nach Kultivierung in eisenhaltigem Medium nachgewiesen werden. Das kleinere 2,3 kb große Transkript war in FB1 Wildtyp sowie in der  $\Delta ubc1$ -Mutante nachweisbar, wenn diese Stämme unter Eisenmangelbedingungen angezogen wurden (Abbildung 26). Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Expression des kleineren Transkripts, das unter Eisenmangelbedingungen sichtbar war, ein intakter cAMP-Weg benötigt wird. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die *fer*- und *sid*-Gene auf unterschiedliche Weise durch cAMP und Eisen reguliert werden.

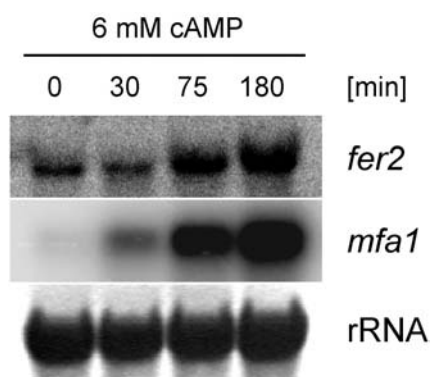
## 2.7 Untersuchung des Gens für eine hochaffine Eisenpermease (*fer2*)

Nachdem von Mei *et al.* (1993) gezeigt wurde, dass das nicht-reduktive Eisenaufnahmesystem in *U. maydis* keine Funktion während der pathogenen Entwicklung besitzt, konzentrierte sich die Untersuchung in der vorliegenden Arbeit auf das reduktive Eisenaufnahmesystem. Die abgeleitete Proteinsequenz des zuvor identifizierten *fer2*-Gens zeigte eine signifikante Ähnlichkeit zu anderen pilzlichen hochaffinen Eisenpermeasen, die Bestandteil dieses konservierten Systems sind. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von Fer2 ergab eine Übereinstimmung von 44 % bzw. 35 % zu Ftr2p aus *Candida albicans* sowie zu Ftr1p aus *S. cerevisiae* (BLASTP; Altschul *et al.*, 1990; 1997). Durch eine Analyse der abgeleiteten Fer2-Proteinsequenz mit den Programmen SMART und PFAM (Schultz *et al.*, 1998; Bateman *et al.*, 2002) konnte

das hochkonservierte REGLE-Motiv zwischen Aminosäureposition 262 und 268 identifiziert werden. Dieses Motiv besitzt eine essentielle Rolle bei der Eisenaufnahme (Fang und Wang, 2002). Für *FTR2* konnte gezeigt werden, dass es sich um einen essentiellen Pathogenitätsfaktor des Humanpathogens *C. albicans* handelt (Ramanan und Wang, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde *fer2* näher untersucht.

### 2.7.1 Die Expression von *fer2* wird durch cAMP induziert

Nachdem die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass die Expression von *fer2* nur erfolgt wenn der cAMP-Signalweg intakt ist, wurde diese Beobachtung durch ein cAMP-Fütterungsexperiment näher untersucht (Abbildung 27). Hierzu wurden FB1 Wildtypzellen bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,5$  in CM-Glukose-Medium inkubiert und danach 6 mM cAMP zugegeben. Vor der Stimulierung, sowie 30, 75 und 180 min nach Zugabe des cAMP wurden Proben genommen, die RNA isoliert und im Northernblot analysiert.



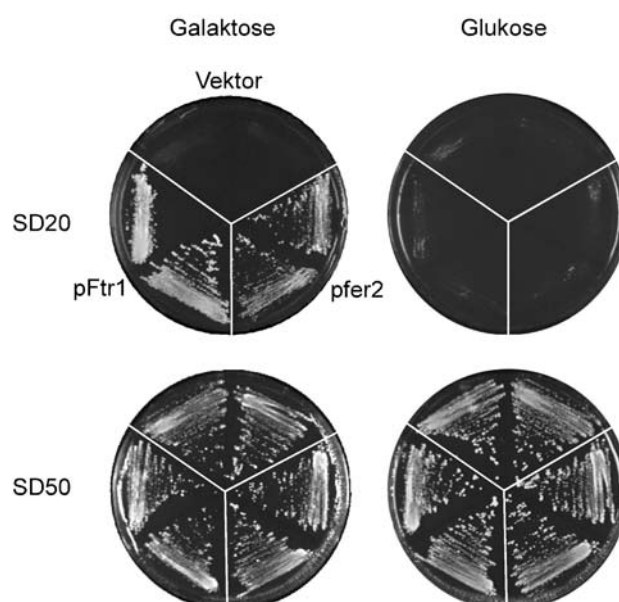
**Abbildung 27: Die Expression des Gens der hochaffinen Eisenpermease, *fer2*, wird durch cAMP induziert.**

Der Stamm FB1 wurde in CM-Glukose-Medium inkubiert. Nach anschließender Stimulierung mit 6 mM cAMP wurden Proben nach den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Pro Spur wurden 10 µg RNA geladen. Der Blot wurde mit einer *fer2*-spezifischen Sonde beprobt. Als Kontrolle für die Induktion wurde mit dem *mfa1*-Gen beprobt. Als Ladekontrolle ist die Methylenblaufärbung der rRNA gezeigt.

Als Kontrolle für die Induktion wurde zunächst die Expression des *mfa1*-Gens untersucht, von dem eine Induktion nach cAMP-Zugabe bereits gezeigt wurde (Krüger *et al.*, 1998). Zum Zeitpunkt null konnte eine basale Transkriptmenge nachgewiesen werden, die nach Zugabe von cAMP stark anstieg. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, konnte auch für *fer2* vor der Induktion ein basales Transkriptionsniveau detektiert werden. 75 min nach Zugabe von cAMP wurde ein deutlicher Anstieg des Expressionsniveaus beobachtet.

### 2.7.2 *fer2* kann den Phänotyp der *S. cerevisiae ftr1*-Mutante komplementieren

Um zu untersuchen, ob es sich bei *Fer2* um eine funktionelle Eisenpermease handelt, wurde getestet, ob *fer2* den Eisen(III)-abhängigen Wachstumsdefekt von *ftr1*-Mutanten in *S. cerevisiae* komplementieren kann (Stearman *et al.*, 1996; Ramanan und Wang, 2000), (Abbildung 28). Hierzu wurden die centromerischen Plasmide *pfer2* und *pFtr1* hergestellt und in den Hefestamm BY4741D *ftr1* transformiert. Diese Plasmide exprimieren *U. maydis fer2* bzw. *S. cerevisiae FTR1* unter der Kontrolle eines galaktoseinduzierbaren Promotors. Zur Kontrolle wurde das leere Plasmid in die *ftr1*-Mutanten transformiert. Alle Transformanten wuchsen auf Platten, denen 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  zugesetzt wurde (Abbildung 28, SD50-Medium).



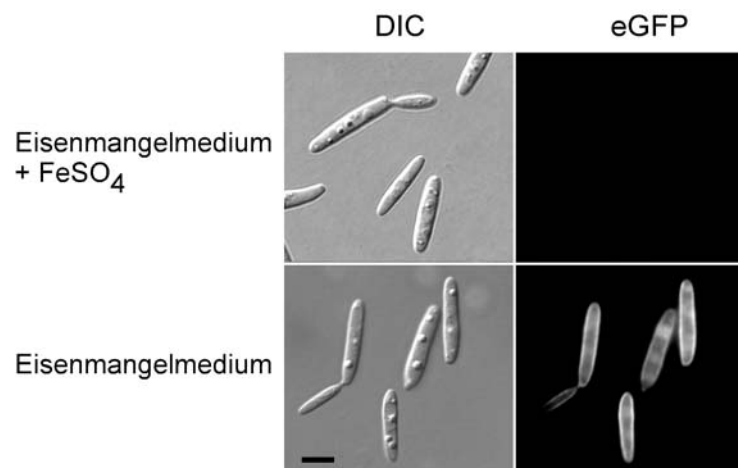
**Abbildung 28: Fer2 ist eine funktionelle hochaffine Eisenpermease.** Die *ftr1*-Deletionsmutante aus *S. cerevisiae* zeigt einen Eisen-abhängigen Wachstumsdefekt auf SD20-Medium (Ramanan und Wang, 2000). Die Mutante wurde mit dem leeren Plasmid YCplac111-G/T transformiert (Vektor); einem Plasmid, das *FTR1* (*pFtr1*) sowie einem Plasmid, das *U. maydis fer2* (*pfer2*) unter der Kontrolle des *S. cerevisiae GAL1*-Promotors exprimiert, transformiert. Zwei unabhängige Transformanten wurden auf Eisenmangelmedium (SD20) sowie auf eisenhaltigem Medium (SD50) ausgestrichen. Die Platten beinhalten entweder Galaktose (rechts) oder Glukose als Kohlenstoffquelle. Die Platten wurden drei Tage bei 28°C inkubiert. Weitere Einzelheiten sind im Text beschrieben.

Transformanten, die den leeren Vektor (YCplac111-G/T) trugen, waren nicht in der Lage unter Eisenmangelbedingungen (SD20-Medium) zu wachsen, auch nicht auf Galaktose-Induktionsmedium (Abbildung 28). Dagegen wuchsen *ftr1*-Mutanten, die mit *pFTR1* bzw. *pfer2* transformiert waren, auch auf galaktosehaltigem Eisenmangel-

medium (Abbildung 28). Diese Ergebnisse zeigen, dass *fer2* den Wachstumsdefekt eines *ftr1*-Hefestamms komplementieren kann und damit für eine funktionelle Eisenpermease kodiert.

### 2.7.3 Fer2 ist in der Zellmembran lokalisiert

Analysen mit dem Programm PSORTII (Nakai und Horton, 1999) sagen für Fer2 mit einer Wahrscheinlichkeit von 39 % eine Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum, und mit einer Wahrscheinlichkeit von 35 % an der zytoplasmatischen Membran voraus. Um zu untersuchen wo das *fer2*-Genprodukt *in vivo* lokalisiert, wurde eine C-terminale Translationsfusion des Fer2-Proteins mit eGFP hergestellt (Eichhorn *et al.*, 2004). Die resultierenden Stämme FB1*fer2*:eGFP und FB2*fer2*:eGFP zeigten in Bezug auf Wachstum bzw. Kreuzungsverhalten und Pathogenität keinen Unterschied zu Wildtypstämmen (nicht gezeigt). Auf Grund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass das Fer2-Fusionsprotein funktionell ist.



**Abbildung 29: Lokalisierung von Fer2 in der Plasmamembran.** Der Stamm FB1*fer2*:eGFP wurde in Minimalmedium (Sundström, 1964) mit und ohne FeSO<sub>4</sub> (10 µM) bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 inkubiert und mikroskopisch untersucht: Auf der linken Seite sind lichtmikroskopische Bilder (DIC), auf der rechten Seite Fluoreszenz-Bilder (eGFP) gezeigt. Der Längenmaßstab entspricht 5 µm und bezieht sich auf alle gezeigten Aufnahmen.

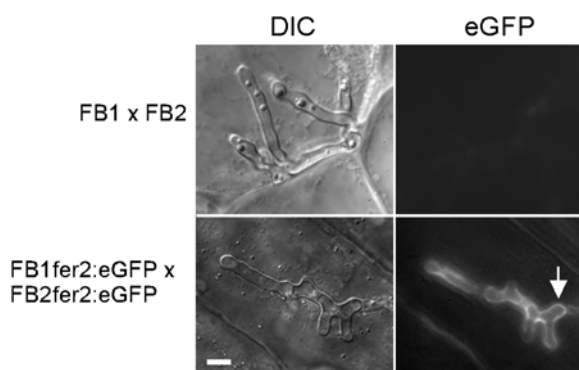
Zur Lokalisierung von Fer2:eGFP wurden die Stämme in Eisenmangelmedium (Sundström, 1964) mit und ohne Zugabe von FeSO<sub>4</sub> bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 inkubiert und mikroskopisch untersucht. Exemplarisch sind in Abbildung 29 Aufnahmen des Stamms FB1*fer2*:eGFP gezeigt. Nach Anzucht von FB1:*fer2*:eGFP unter Eisenmangel konnte eine gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins über die gesamte



zytoplasmatische Membran der Sporidien beobachtet werden (Abbildung 29). Zudem wurde ein schwächeres Fluoreszenzsignal im Zytoplasma und in den Vakuolen detektiert (Abbildung 29). Dagegen wurde kein Fluoreszenzsignal in Zellen detektiert, die in Medium angezogen wurden, dem 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  zugesetzt wurde (Abbildung 29).

#### 2.7.4 *fer2* wird in der späten Infektionsphase exprimiert

Um das Expressionsmuster von *fer2* während des biotrophen Wachstums von *U. maydis* zu untersuchen, wurden fünf Tage alte Maispflanzen mit einer Mischung aus FB1*fer2*:eGFP und FB2*fer2*:eGFP infiziert. Die Stämme wurden zuvor in YEPS<sub>L</sub>-Medium angezogen. Sie zeigten keine Fluoreszenz, das heißt offensichtlich liegt in YEPS<sub>L</sub>-Medium eine Eisenkonzentration vor, die zur Repression der *fer2*-Expression führt (Daten nicht gezeigt). In Infektionsstrukturen auf der Pflanze sowie in Pilzhypen in der Pflanze war ebenfalls keine Fluoreszenz sichtbar (nicht gezeigt). Erst sechs Tage nach der Infektion wurde in Hyphenstadien, die stark verzweigt waren, ein charakteristisches Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran gesehen (Abbildung 30).

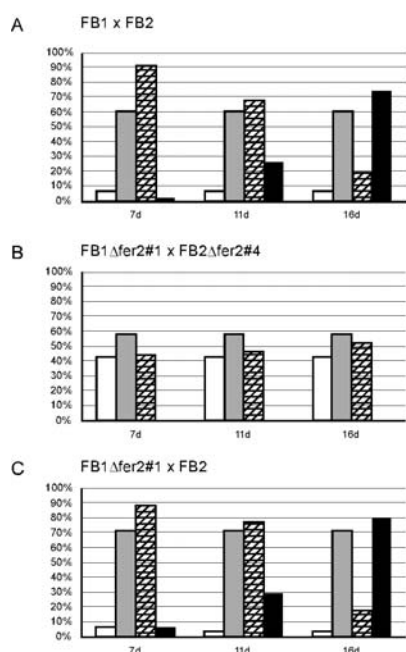


**Abbildung 30: *fer2* wird in einem spezifischen Stadium während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* exprimiert.** Die angegebenen Stämme wurden in YEPS<sub>L</sub>-Medium angezogen, Maispflanzen mit den angegebenen Mischungen infiziert und mikroskopisch untersucht. Sechs Tage nach der Infektion konnte die Expression von *fer2* durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Der Längenmaßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$  und bezieht sich auf alle gezeigten Aufnahmen.

Es handelt sich hierbei um ein Stadium, das der Sporulation vorausgeht (Snetselaar und Mims, 1994; Banuett und Herskowitz, 1996). Zu späteren Zeitpunkten konnte keine Fluoreszenz mehr detektiert werden (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten an, dass die Expression von *fer2* auf eine spezielle Entwicklungsphase innerhalb der Pflanze begrenzt ist.

### 2.7.5 Deletionsmutanten der hochaffinen Eisenpermease zeigen einen drastischen Pathogenitätsdefekt

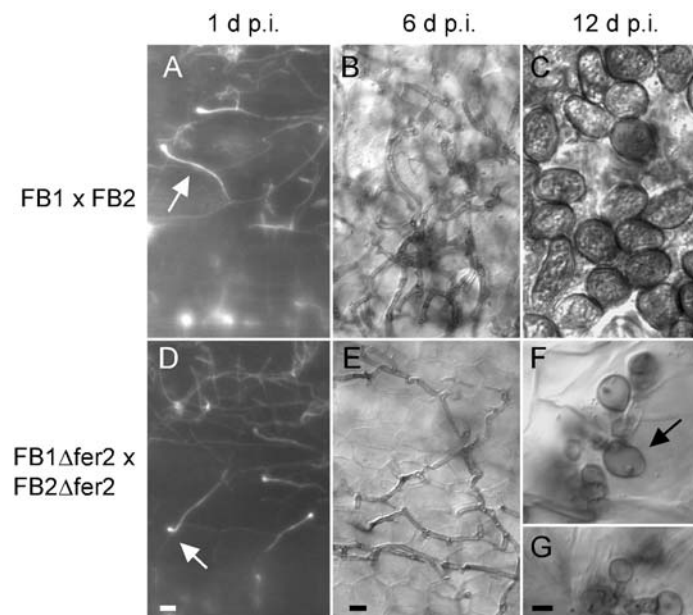
Um die Funktion von *fer2* während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten hergestellt, in denen der vollständige offene Leserahmen von *fer2* durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Hierzu wurde das Plasmid p $\Delta$ *fer2* in die Stämme FB1, FB2 und SG200 transformiert. Homologe Integrationsereignisse wurden durch Southernblotanalysen bestätigt (nicht gezeigt). Die Stämme FB1 $\Delta$ *fer2* und FB2 $\Delta$ *fer2* wurden im Rahmen der Diplomarbeit von F. Leßing hergestellt). Der Stamm SG200 (*a1:mfa2bW2bE1*) ist in der Lage, ohne vorherige Fusion eine Infektion hervorzurufen und dient daher zur Analyse von Ereignissen nach der Zellfusion. Die Stämme FB1 $\Delta$ *fer2* (*a1b1 $\Delta$ fer2*), FB2 $\Delta$ *fer2* (*a2b2 $\Delta$ fer2*) und HE187 (*a1:mfa2bW2bE1 $\Delta$ fer2*) zeigten weder im Wachstumsverhalten in YEPS<sub>L</sub>-Medium noch in der Zellmorphologie erkennbare Unterschiede zu den Ausgangsstämmen.



**Abbildung 31: Ergebnisse der Pflanzeninfektionen mit *fer2*-Deletionsmutanten.** Fünf Tage alte Maispflanzen wurden mit Mischungen der Wildtypstämme FB1 und FB2 sowie mit einer Mischung der *fer2*-Stämme sowie einer Mischung aus FB1 und FB2 $\Delta$ *fer2* infiziert und die pathogene Entwicklung zu den angegebenen Zeitpunkten ausgewertet. Die Analyse wurde mehrfach mit unabhängigen Deletionsstämmen durchgeführt, in dem hier exemplarisch gezeigten Experiment wurden 33-53 Pflanzen infiziert. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf die Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (siehe Text). Gesunde Pflanzen, die keine Symptome zeigen, sind als ungefüllte Balken dargestellt, in grau sind Pflanzen mit Anthocyanbildung abgebildet, karierte Balken repräsentieren Pflanzen mit Tumorbildung, tote Pflanzen sind in schwarz dargestellt.

Auch hinsichtlich des Kreuzungsverhaltens von FB1 $\Delta$ *fer2* und FB1 $\Delta$ *fer2* war auf aktivkohlehaltigen PD-Platten keine Differenz zu den isogenen Wildtypstämmen zu beobachten (nicht gezeigt). Bei der Infektion von Maispflanzen war die Anthocyanbildung der Pflanzen, die mit den *fer2*-Deletionsmutanten infiziert wurden,

vergleichbar hoch wie in den Wildtypkontrollen (Abbildung 31). Pflanzen die mit kompatiblen *Afer2*-Stämmen infiziert wurden zeigten eine signifikant reduzierte Tumorbildung im Vergleich zu entsprechenden Wildtypinfektionen (Abbildung 31). Nur etwa 50% der infizierten Pflanzen bildeten überhaupt Tumore aus und diese waren deutlich kleiner als bei der Wildtypkontrolle. Folglich waren mit *fer2*-Deletionsmutanten infizierte Pflanzen auch 16 Tage nach der Infektion vital und wuchsen zu normaler Größe heran. Dagegen waren 74 % der mit Wildtyp infizierten Pflanzen zu diesem Zeitpunkt bereits abgestorben (Abbildung 31).



**Abbildung 32: Untersuchung der biotrophen Entwicklung von *fer2*-Deletionsmutanten.** Um die Entwicklung von *Afer2*-Stämmen während der biotrophen Phase mit dem Wildtyp zu vergleichen, wurde eine Mischung der angegebenen Stämme in fünf Tage alte Maispflanzen injiziert und die Entwicklung mikroskopisch verfolgt. (A, D) Appressorienbildung bei Wildtyp- und Mutantenkreuzung (Pfeil) ein Tag p.i., pilzliche Strukturen auf der Blattoberfläche sind durch Calcofluor-Färbung im UV-Licht sichtbar. (B, C, E-G) Lichtmikroskopie (DIC). (B, E) Pilzhyphen sechs Tage p.i. in der Pflanze. (C) Reife Teliosporen bei der Wildtypkreuzung sowie unreife Vorläuferstrukturen von Sporen (F, G) bei der Mutantenkreuzung zwölf Tage p.i., pilzliche Strukturen sind mit Chlorazol-Black-E gefärbt. Der unten angegebene Größenstandard entspricht 5 µm und bezieht sich auf die jeweils vertikal angeordneten Bilder. Teile dieser Abbildung wurden freundlicherweise von F. Leising zur Verfügung gestellt.

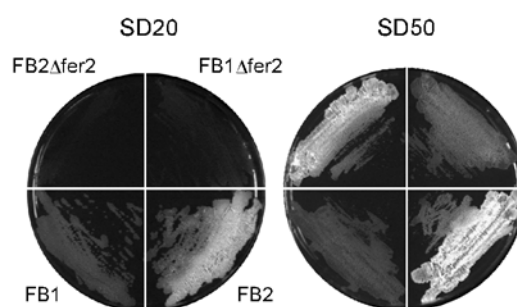
Ein vergleichbares Ergebnis zeigten auch Infektionen mit dem haploid solopathogenen Stamm HE187 (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zum Ausgangsstamm SG200 war hier die Tumorbildung um 40 % reduziert und damit vergleichbar mit den Mutantenkreuzungen. Daraus lässt sich schließen, dass der durch Verlust von *fer2* beobachtete

Defekt postfusional sein muss. Bei Infektionen mit Mischungen aus Wildtyp und kompatiblen *Δfer2*-Stämmen wurde der Pathogenitätsdefekt vollständig komplementiert (Abbildung 31 und nicht gezeigt).

Die pathogene Entwicklung der *fer2*-Deletionsmutanten wurde auch auf mikroskopischer Ebene verfolgt. Hierbei zeigten *Δfer2*-Stämmen 24 h nach der Infektion keine Unterschiede bei der Ausbildung von Appressorien auf der Blattoberfläche im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 32). Im Abstand von zwei Tagen wurden Pflanzenproben genommen und pilzliche Strukturen durch den Farbstoff Chlorazol Black E sichtbar gemacht. Sechs Tage nach der Infektion zeigten *fer2*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich reduzierte Proliferation von Hyphen in der Pflanze (Abbildung 32). Dieser Unterschied war auch zu späteren Zeitpunkten zu sehen (nicht gezeigt). Zwölf Tage nach der Infektion hatten Pflanzen, die mit Wildtyp infiziert wurden stets reife Teliosporen ausgebildet. Dagegen konnten in Tumoren, die aus Infektionen mit *fer2*-Deletionsstämmen resultierten, nur unreife sporenartige Strukturen gesehen werden (Abbildung 32). Auch in mehreren Wiederholungsexperimenten gelang es nicht reife Sporen in solchen Infektionen nachzuweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Wachstum und die Entwicklung von *Δfer2*-Mutanten während der biotrophen Phase im Vergleich zum Wildtyp stark eingeschränkt ist.

### 2.7.6 *fer2*-Deletionsmutanten zeigen einen Wachstumsdefekt auf Eisenmangelmedium

Nachdem zuvor gezeigt wurde, dass es sich bei *Fer2* um eine funktionelle Eisenpermease handelt, wurde nun untersucht, ob die *fer2*-Deletionsstämme einen eisenabhängigen Wachstumsdefekt auf Festmedium zeigen. Drei Tage nach Inkubation auf Festmedium bei 28°C, zeigten sowohl die  $\Delta fer2$ -Mutanten als auch die Wildtypstämme FB1 und FB2 Wachstum auf Platten, denen 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  zugesetzt wurde (Abbildung 33, rechts). Die Stämme FB1 und FB2 zeigten unterschiedliche Koloniemorphologien. Dieser Unterschied wird dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund beider Stämme zugeschrieben. Vergleichbare Beobachtungen wurden in früheren Untersuchungen gemacht (R. Kahmann, pers. Mitteilung). Auf Eisenmangelmedium (SD20) wurde dagegen nur bei den Wildtypstämmen normales Wachstum beobachtet.

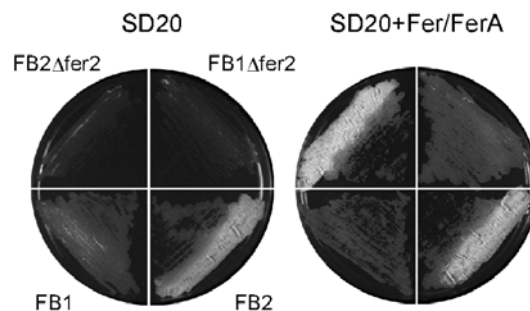


**Abbildung 33: Wachstumsverhalten von *fer2*-Deletionsmutanten und Wildtyp auf Eisenmangelmedium.**  $\Delta fer2$ -Stämme sowie die Wildtypstämme wurden auf Eisenmangelmedium, das mit 20  $\mu\text{M}$  (SD20) bzw. 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  (SD50) versetzt wurde, ausgestrichen. Die Platten wurden drei Tage bei 28°C inkubiert.

Das Wachstum von *fer2*-Deletionsmutanten war hier sehr stark reduziert (Abbildung 33). Diese Ergebnisse zeigen, dass unter Bedingungen in denen die Eisenkonzentration limitierend ist, *fer2* eine wichtige Rolle bei Aufnahme von Eisen(III) und folglich beim Wachstum von *U. maydis* hat. Außerdem legte dieses Ergebnis nahe, dass der unter den untersuchten Bedingungen vorliegende Eisenmangel nicht durch das nicht-reduktive Eisenaufnahmesystem ausgeglichen wird.

### 2.7.7 *U. maydis* Siderophoren komplementieren den Wachstumsdefekt von *fer2*-Deletionsmutanten

Um zu überprüfen, ob  $\Delta fer2$ -Stämme überhaupt in der Lage sind Siderophoren-komplexiertes Eisen aufzunehmen, wurden die *fer2*-Deletionsstämme sowie die Wildtypstämme auf Eisenmangelmedium (SD20-Medium) sowie auf SD20-Medium, dem die *U. maydis* Siderophoren Ferrichrom und Ferrichrom A zugesetzt wurden, ausgestrichen (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Komplementierung des Wachstumsdefekts der  $\Delta fer2$ -Stämme mit *U. maydis* Siderophoren.** Die angegebenen *fer2*-Deletionsmutanten und Wildtypstämme wurden auf Eisenmangelmedium, das mit 20  $\mu\text{M}$  (SD20)  $\text{FeCl}_3$  (SD50) versetzt wurde (links), sowie mit 1  $\mu\text{M}$  der *U. maydis* Siderophoren Ferrichrom und Ferrichrom A (ECM microcollections GmbH; rechts). Die Platten wurden drei Tage bei 28°C inkubiert.

Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, zeigten *fer2*-Deletionsmutanten Ferrichrom und Ferrichrom A abhängiges Wachstum auf SD20-Medium. Diese Beobachtung legt nahe, dass die im SD20-Medium vorhandene  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration zu einer Repression der Siderophorenbiosynthese führt. Folglich werden keine Siderophoren produziert, die den  $\Delta fer2$ -abhängigen Eisenaufnahmedefekt ausgleichen könnten.

### 3. Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Ausdehnung des *p*-Locus untersucht und die Regulation einzelner Gene dieses Genomabschnitts näher charakterisiert. Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit wurde die Identifizierung und Charakterisierung von Zielgenen der Pheromonantwort sowie der MAP-Kinasen Kpp2, Kpp6 und der Proteinkinase A, Adr1, durch genomweite Microarray-Analysen durchgeführt. Durch die Herstellung und anschließende Transkriptomanalyse von Stämmen, die genetisch aktivierbare Signalkaskaden tragen, konnten zahlreiche Zielgene dieser Signalwege gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil dieser Gene einer komplexen Regulation unterliegt, die häufig durch verschiedene Signalkaskaden beeinflusst wird. Die Rolle des zentralen Transkriptionsfaktors Prf1 bei der Regulation dieser Gene wurde durch Analyse der Expressionsprofile in  $\Delta prf1$ -Mutanten ermittelt.

Nach Expression von *adr1* konnten drei koregulierte Gencluster identifiziert werden, die Gene mit einer putativen Funktion bei der Eisenaufnahme besitzen. Das Gen einer hochaffinen Eisenpermease wurde detaillierter untersucht und erwies sich als Virulenzfaktor.

#### 3.1 Der *p*-Locus in *U. maydis*

Nach den jetzt vorliegenden Analysen umfasst der *p*-Locus einen ca. 24 kb großen Genomabschnitt, der auf Chromosom 19 lokalisiert wurde. In der Nähe bereits bekannter Gene konnte ein weiteres pflanzenreguliertes Gen, *pig7*, sowie ein weiteres konstitutiv exprimiertes Gen, *npi4*, identifiziert werden. Vergleichbar zu *pig3* konnte auch für *pig7* neben einem konstitutiv exprimierten Transkript ein weiteres Transkript nachgewiesen werden, welches stadienspezifisch während der biotrophen Phase exprimiert wird. Das Auftreten des differentiellen Transkripts könnte auf die Aktivierung eines zusätzlichen Promotors zurückgeführt werden, der spezifisch während der biotrophen Phase reguliert wird. Nachdem die Ausdehnung des *p*-Locus bekannt war, konnte nun die Funktion dieses Genomabschnitts während der biotrophen Entwicklung näher untersucht werden. Die Analyse von Mutanten, in denen der

gesamte *p*-Locus deletiert wurde, zeigte, dass die *pig*-Gene keine essentielle Funktion während der pathogenen Entwicklung haben. Aus Bakterien sind koregulierte Gencluster bekannt, die eine Funktion während der pathogenen Entwicklung haben und hier beispielsweise für Typ-III-Sekretionssysteme kodieren (Hueck, 1998). Solche „Pathogenitätsinseln“ weisen oftmals einen im Vergleich zum übrigen Genom unterschiedlichen GC-Gehalt auf und besitzen transponierende oder repetitive Elemente im Flankenbereich. Ihre Entstehung kann durch horizontalen Gentransfer erklärt werden. In pflanzenpathogenen Pilzen wurde bislang nur für das PEP-Gencluster in *Nectria haematococca* eine Ähnlichkeit zu solchen „Pathogenitätsinseln“ beschrieben (Han *et al.*, 2001). Der *p*-Locus entspricht allerdings nicht den Kriterien einer solchen Pathogenitätsinsel: Die *pig*-Gene werden nur teilweise koreguliert und darüber hinaus weist dieser Genomabschnitt keinen abweichenden GC-Gehalt oder Sequenzelemente auf, die auf die zuvor beschriebene Entstehung hindeuten. Nicht zuletzt ist eine solche Hypothese unwahrscheinlich, da der *p*-Locus das essentielle *npil*-Gen mit einschließt.

In der vorliegenden Arbeit konnten Mutanten in einem vermuteten negativen Regulator von *pig4* komplementiert werden. Hierbei wurde auf zwei unabhängigen Wegen das Gen *rpg1* isoliert, das Ähnlichkeit zu Cyclinen hat. Weitere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es sich bei *rpg1* vermutlich um einen unspezifischen Suppressor und nicht um das Gen des gesuchten *pig4*-Regulators handelt. Es bleibt spekulativ, welche Funktion *rpg1* hat, bzw. wie dieses Gen als Suppressor wirken könnte. Vermutlich handelt es sich dabei um einen indirekten Effekt, der durch die Regulation einer Cyclin-abhängigen Kinase vermittelt wird und zur Stabilisierung geringer mRNA-Mengen des Reportergens geführt haben könnte. Bereits in einer früheren Arbeit wurde eine Mutante mit einem Gen komplementiert, das vermutlich einen mRNA-stabilisierenden Effekt ausübte (K. Hansson, *vergl.* Kapitel 2.2.2). Daher muss die Frage gestellt werden, ob die Verwendung von *pyr6* als Reportergen in *U. maydis* geeignet ist, um Regulatoren zu identifizieren.

Durch den Einsatz von eGFP-Reporterstämmen konnte gezeigt werden, dass *pig4* ein entwicklungspezifisches Expressionsmuster während der biotrophen Phase aufweist. *pig4* besitzt eine signifikante Ähnlichkeit zu Genen, die für bekannte Proteine der „major-facilitator“-Transporter kodieren (Aichinger *et al.*, 2003). Basierend auf einer Analyse von Proteindomänen mit dem Programm SMART (Schultz *et al.*, 2000;



Letunic *et al.*, 2002) konnte *Pig4* in die Unterfamilie der Zuckerpermeasen eingeordnet werden. In verschiedenen biotrophen Pilzen wurde die Regulation solcher Zuckertransporter während der Interaktion mit dem Wirtsorganismus beschrieben. Für den Rostpilz *Uromyces fabae* konnte gezeigt werden, dass der Transporter *Hxt1* in den Haustorien induziert wird und vermutlich den Austausch von Nährstoffen und Signalkomponenten zwischen Pilz und Wirtsorganismus vermittelt (Ozcan und Johnston, 1999). Darüber wird der Monosaccharid-Transporter *Mst1* als Schlüsselkomponente des Ectomykorrhiza-Pilzes *Amanita muscaria* während der biotrophen Entwicklung diskutiert (Nehls *et al.*, 1998). Eine vergleichbare Funktion kann für *pig4* postuliert werden. Die Beobachtung, dass die Deletion von *pig4* zu keinem Pathogenitätsverlust führte, deutete auf die Existenz weiterer Transporter hin. In einer Datenbanksuche mit der Genomsequenz von *U. maydis* konnten elf weitere putative Zuckertransporter identifiziert werden, die eine solche Funktion übernehmen könnten. Die Situation ist somit vergleichbar mit Untersuchungen aus *S. cerevisiae*, in denen die funktionelle Redundanz von Hexosetransportern beschrieben wurde (Nelissen *et al.*, 1997; Ozcan und Johnston, 1999).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Verlust des *p*-Locus keinen Einfluss auf die pathogene Entwicklung hat, wenn gewährleistet ist, dass das essentielle *npi1*-Gen beibehalten wird. In Zukunft könnten genomweite Expressionsanalysen von *U. maydis*-Zellen, die aus spezifischen Entwicklungsstadien aus der Pflanze isoliert wurden, die Identifikation von Regulatoren der *pig*-Gene ermöglichen.

## 3.2 Die genomweite Transkriptionsanalyse in *U. maydis*

### 3.2.1 Die Annotationsproblematik des *U. maydis* Genoms

Von besonderem Interesse ist die Frage, welche gemeinsamen funktionellen Eigenschaften die in einer bestimmten Situation koregulierten Gene haben, und ob bestimmte Gengruppen in einer solchen Situation verstärkt exprimiert werden. Eine solche ganzheitliche Analyse der Microarray-Daten ist jedoch zur Zeit für *U. maydis* noch nicht durchführbar. Die momentan vorliegende, automatisch erstellte Annotation des Genoms ist noch unvollständig und fehlerhaft. Deshalb ist die Einordnung von Genen in funktionelle Kategorien, wie dies beispielsweise für *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Mewes *et al.*, 1998; Mewes *et al.*, 1999; Frishman *et al.*, 2001), derzeit nicht möglich (J. Kämper, pers. Mitteilung).

In *U. maydis* wurden erste Versuche unternommen, die Gene durch ein automatisches Verfahren in funktionelle Kategorien (z.B. Transkription, Metabolismus, Transport, Signalweiterleitung) einzuordnen (M. Muensterkoetter, G. Mannhaupt und J. Kämper, pers. Mitteilung). Basierend auf der vorläufigen Annotation (PEDANT; G. Mannhaupt und J. Kämper, unveröffentl.) wurde auf zwei unabhängigen Wegen versucht, sämtliche Gene in die funktionellen MIPS-Kategorien (vergl. Mewes *et al.*, 1999; MIPS, München) einzusortieren. Einerseits wurde hierzu die Homologie zu Datenbank-einträgen als Grundlage für die Zuordnung gewählt. Andererseits wurde in einer unabhängigen Zuordnung die Identität der Aminosäuresequenz als Kriterium zur Einordnung herangezogen (Gene können hierbei Bestandteil mehrerer Kategorien, z.B. „Metabolismus“ und „Transport“ sein). Die auf diese Weise ermittelten prozentualen Anteile der einzelnen Kategorien wurden mit der Situation in *S. cerevisiae* und *N. crassa* verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die für das *U. maydis* Genom berechneten Anteile der funktionellen Kategorien deutlich von denen der Referenzorganismen abwichen. Während bei dem auf Homologie basierenden Zuordnungsverfahren die meisten Kategorien im Vergleich zu *S. cerevisiae* und *N. crassa* überrepräsentiert waren, erwies sich das auf Proteinidentität basierte Zuordnungsverfahren als zu stringent; bei diesem Verfahren waren die Gene der meisten Kategorien im Vergleich zu den Referenzorganismen unterrepräsentiert (M. Muensterkoetter, G. Mannhaupt und

J. Kämper, pers. Mitteilung). Es ist sehr unwahrscheinlich, dass dies die besonderen Eigenschaften von *U. maydis* als Pflanzenpathogen widerspiegelt, da diese Unterschiede auch in Kategorien auftraten, die für den basalen Metabolismus der Zelle verantwortlich sind (z.B. DNA Replikation, Aminosäure Biosynthese, Nukleotid Metabolismus). Durch eine Kombination beider Wege soll in Zukunft versucht werden, eine neue Zuordnung durchzuführen, welche die tatsächlich im Genom vorhandenen Anteile besser widerspiegelt. Dies setzt auch voraus, dass die automatische Annotation durch eine manuelle Annotation ergänzt wird. Nach Einordnung der Gene in funktionelle Klassen wird eine weitergehende Auswertung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten möglich werden. Im folgenden werden daher nur ausgewählte Gengruppen diskutiert, die auf Grund ihrer vorläufigen Annotation bzw. ihres Expressionsmusters von besonderem Interesse waren.

### **3.2.2 In wie weit reflektieren die induzierbaren Stämme die natürliche Situation?**

Für die Identifikation von Kpp2-Zielgenen wurde ein Stamm verwendet, in dem die in der Signalkaskade oberhalb von Kpp2 liegende MAPKK genetisch aktiviert war und induziert werden konnte. Für den Stamm HE121 (*kpp2WT<sub>P<sub>crg1</sub></sub>fuz7DD*) konnte auf morphologischer Ebene gezeigt werden, dass die Aktivierung von *fuz7DD* zur Ausbildung von Konjugationshyphen-ähnlichen Filamenten führt. Dagegen blieb im Stamm HE125, der das nicht-phosphorylierbare Allel von *kpp2* trägt, diese Reaktion aus. Diese Ergebnisse sowie der Befund, dass das Expressionsmuster aller bekannten Gene dem natürlichen entspricht, das bei der Pheromonantwort beobachtet werden kann, spricht dafür, dass das eingesetzte System der natürlichen Situation ähnelt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der *crg1*-Promotor auch im Glukose-reprimierten Zustand eine minimale Expression vermittelt (Brachmann, 2001). Bei den vorliegenden Experimenten wurde jedoch bei einem Vergleich des Stamms HE121 mit dem Stamm HE125 kein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster beobachtet, d.h. die Expression im uninduzierten Zustand reicht nicht aus, um Unterschiede in der Expressionsstärke zu erkennen.

Um Zielgene des cAMP-Signalwegs zu identifizieren wurde der Stamm HE140 hergestellt, der die regulierbare Expression der katalytischen Untereinheit der PKA

erlaubt. Nach Aktivierung des *crg1*-Promotors zeigen HE140-Zellen den „multiple-budding“-Phänotyp und damit eine morphologische Veränderung, die auch in Wildtypzellen beobachtet wird, in denen ein hoher cAMP-Spiegel vorliegt (Gold *et al.*, 1994). Da in diesem Stamm das endogene *adr1*-Gen erhalten ist, war zu erwarten, dass nur Gene identifiziert werden können, deren Expression sich bei hoher PKA Aktivität verändert. 75 min nach Induktion von HE140 wurde die Expression von *prf1* und der *a*-Locus Gene hochreguliert (vergl. Abbildung 20 und 22(A)). Auch nach 180 min war in diesem Stamm eine, im Vergleich zum Ausgangslevel bzw. zum Expressionslevel des Wildtypstamms, hohe Expression detektierbar (Abbildung 20 22(A)). Diese Beobachtung ist im Einklang mit früheren Experimenten mit *Δubc1*-Mutanten, in denen der cAMP-Weg konstitutiv aktiv ist. Auch in diesen Mutanten konnte eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte *prf1*- bzw. *mfal*-Expression nachgewiesen werden (Hartmann *et al.*, 1999).

Für die Mehrheit der Gene wurde nach Induktion von *adr1* ein transientes Expressionsmuster beobachtet. Diese vorübergehende Transkriptionsaktivierung deutet auf eine spezifische Eigenschaft des Stamms HE140 hin und könnte auf die Überexpression von *adr1* zurückzuführen sein. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass hohe cAMP-Konzentrationen zu einer Repression der *mfal*-Expression führen (Krüger *et al.*, 1998). Es kann spekuliert werden, dass möglicherweise die Kinase Crk1, die für die Expression von *prf1* benötigt wird, an der beobachteten transienten Regulation beteiligt sein könnte. Die Expression von *crk1* unterliegt einer negativen Regulation durch den cAMP-Weg (Garrido und Perez-Martin, 2003; Garrido *et al.*, 2004). Darüber hinaus unterliegt Crk1 vermutlich auch einer negativen, durch die PKA vermittelten posttranskriptionellen Regulation (Garrido und Perez-Martin, 2003). Im vorliegenden Experiment wurde zwar keine Repression von *crk1* beobachtet. Möglicherweise führt jedoch die Überexpression der PKA in HE140 zu einer Modifizierung von Crk1, die eine negative Rückkopplung zur Folge hat. Aufgrund dieser Beobachtungen muss in Frage gestellt werden, in wie weit der Stamm HE140 die natürliche Situation nach Aktivierung des cAMP-Wegs wiedergeben kann.

Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die beobachteten Regulationsmuster teilweise auch durch experimentelle Bedingungen beeinflusst wurden. Ein solcher Effekt wurde z.B. bei den Pheromonstimulationsexperimenten deutlich. Ein Teil der

Gene war im ersten Microarray-Experiment stärker reprimiert als in der später durchgeführten Expressionskinetik (75 min nach Pheromonzugabe, vergl. Abbildung 10, Seite 31). Da in diesen beiden Versuchen unterschiedliche Medienchargen verwendet wurden, sind die beobachteten Regulationsmuster vermutlich auf unterschiedliche experimentelle Bedingungen zurückzuführen. In allen anderen Experimenten wurde Kulturmedium der selben Charge eingesetzt und auf diese Weise versucht, solche Abweichungen auszuschließen. Allgemein kann gesagt werden, dass die Signifikanz von Expressionsänderungen, die nur zu einem Zeitpunkt um den Faktor zwei oder geringfügig größer abwichen, in Frage gestellt werden muss. Insbesondere bei den Experimenten, in denen eine Induktion durch Medienwechsel durchgeführt wurde, ist es denkbar, dass geringfügige Unterschiede bei der Induktion zu vorübergehenden Transkriptionsänderungen führen könnten. Um im Einzelfall solche Effekte zu bewerten, kann die Betrachtung eines Zeitkinetikexperiments hilfreich sein, da hier nicht nur eine Momentaufnahme des Transkriptoms, sondern der Verlauf der Expression beobachtet werden kann.

### 3.3 Regulation von Genen durch die Proteinkinase *Adr1*

Nach Aktivierung des Stamms HE140 wurden über einen Zeitraum von drei Stunden insgesamt 390 Gene differentiell reguliert. Dabei wurden 75 min nach Induktion der PKA die Gene *mfa1*, *pra1*, *prf1* sowie mehrere Gene des *cab*-Locus unter den induzierten Genen gefunden. Von diesen Genen ist bekannt, dass sie nach Aktivierung des cAMP-Wegs induziert werden (Krüger *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999; Brachmann, 2001). Darüber hinaus nahm die Expression der *b*-Locus Gene signifikant zu. Dieses Ergebnis war unerwartet, da frühere Experimente darauf hindeuteten, dass die alleinige Aktivierung des cAMP-Wegs nicht ausreicht, um eine Expression der *b*-Gene zu vermitteln (Kaffarnik *et al.*, 2003). Wie könnte also die beobachtete Transkriptionserhöhung zu erklären sein? Möglicherweise führt die Überexpression von *adr1* im Stamm HE140 zur Phosphorylierung aller in *Prf1* vorhandenen PKA-Phosphorylierungsstellen und dies vermittelt dann eine Induktion der *b*-Gene. Diese Hypothese wird durch *Prf1*-Mutanten unterstützt, die vor kurzem in dem solopathogenen Stamm CL13 hergestellt wurden (K. Zarnack und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). In diesen Stämmen wurde die Aktivierung aller fünf PKA-

Phosphorylierungsstellen in Prf1 durch das Einfügen von Aspartatresten simuliert. Im Gegensatz zum Ausgangsstamm wuchsen solche Stämme filamentös, was auf eine erhöhte *b*-Expression hinweist (K. Zarnack und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). Es ist daher anzunehmen, dass unter natürlichen Bedingungen nicht alle PKA-Phosphorylierungsstellen nach Aktivierung des cAMP-Wegs phosphoryliert werden und deshalb die Expression der *b*-Gene unterbleibt.

Ein Vergleich des Expressionsprofils nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs mit dem Transkriptom nach Pheromonstimulation bzw. nach Aktivierung der Kpp2-MAPK-Kaskade zeigte, dass eine deutliche Überlappung der differentiell regulierten Gengruppen vorliegt (Abbildung 35). Unter den koregulierten Genen befanden sich überwiegend Gene, die eine bekannte oder potentielle Funktion bei der Pheromonantwort von *U. maydis* haben (vergl. Tabelle 4). Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise das Gen eines putativen ABC-Transporters, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu Ste6p aus *S. cerevisiae* zeigt. Der Transporter Ste6p vermittelt die Sekretion des farnesylierten  $\alpha$ -Faktors in der Bäckerhefe (Kuchler *et al.*, 1989; Browne *et al.*, 1996). Da in *U. maydis* beide Pheromone farnesyliert sind (Spellig *et al.*, 1994a), ist naheliegend, dass der hier gefundene Transporter die Sekretion des  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Pheromons übernehmen könnte. Unter den induzierten Genen wurde darüber hinaus das Gen einer potentiellen  $\beta$ -Untereinheit der Farnesyltransferase (vergl. Kapitel 3.5) sowie ein Gen mit Ähnlichkeit zu *PRM1* aus *S. cerevisiae* gefunden. Prm1p ist ein an der Zellfusion beteiligtes Transmembranprotein (Heiman und Walter, 2000). Während die zuvor angesprochenen Gene zur Biosynthese des Pheromonsignals beitragen, wurde mit *prm1* erstmals ein Gen in *U. maydis* gefunden, welches für ein Protein kodiert, das vermutlich direkt an der Zellfusion beteiligt ist. Bisher konnte in quantitativen Fusionstests gezeigt werden, dass dem cAMP-Signalweg eine essentielle Funktion bei der Pheromon-vermittelten Zellfusion zukommt: Deletionsmutanten der  $\alpha$ -Untereinheit *gpa3* zeigen einen nahezu vollständigen Verlust der Fusionskompetenz mit Wildtypzellen, der durch Zugabe von cAMP aufgehoben werden kann (Müller *et al.*, 2004). Die Bedeutung der Kpp2-MAPK-Kaskade konnte durch Fusionsexperimente mit zwei kompatiblen *kpp2*-Deletionsmutanten demonstriert werden. In solchen Mischungen wurden 20-mal seltener Fusionsereignisse beobachtet als in vergleichbaren Wildtypmischungen (Mayorga und Gold, 1999).

Sowohl unter den induzierten als auch bei den reprimierten Genen wurden zahlreiche Gene gefunden, die für Proteine mit potentiellen Funktionen in sekundären Stoffwechselwegen kodieren. Zu dieser Gruppe zählen auch Gene für putative Transportproteine. Von besonderem Interesse war die Gruppe der koregulierten *fer*-Gene, die für vermutliche Komponenten der Eisenaufnahme kodieren (vergl. Kapitel 3.7). 57 der deregulierten Gene kann zur Zeit keine Funktion zugeordnet werden. Wie im Kapitel 3.2.2 angesprochen wurde, unterliegen die in diesem Experiment identifizierten Gene vermutlich einer komplexen Regulation, die teilweise auch durch die Überexpression der PKA im Stamm HE140 bedingt sein könnte. Welche weiteren Einflüsse hierbei eine Rolle spielen könnten, wird bei einem Vergleich mit der Bäckerhefe deutlich. In *S. cerevisiae* tragen sowohl der cAMP-Weg als auch die Kss1p-MAPK-Kaskade zur Regulation des pseudohyphalen Wachstums bei (Pan *et al.*, 2000). An der Aktivierung beider Kaskaden ist das G-Protein Ras2p beteiligt (Mosch *et al.*, 1999). Während die PKA Tpk2p an der Aktivierung des pseudofilamentösen Wachstums beteiligt ist, wirken zwei weitere katalytische Untereinheiten (Tpk1p und Tpk3p) reprimierend auf die Ausbildung von Pseudofilamenten (Pan *et al.*, 2000). Welche Effektoren diese negative Rückkopplung vermitteln, ist allerdings nicht bekannt. Vergleichbar zu *S. cerevisiae* wurden auch in *U. maydis* zwei weitere potentielle katalytische Untereinheiten (Uka1 und Uka2) beschrieben (Dürrenberger *et al.* 1998 und J. Kronstad, zitiert in Krüger, 1998). Der Verlust von *uka1* hat keinen Einfluss auf die Zellmorphologie. In Bezug auf die Pathogenität wurde eine geringfügige Reduktion im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Dürrenberger *et al.*, 1998). Welche Funktion Uka2 hat ist nicht bekannt. Bei Überexpression von *adr1* in HE140 muss in Erwägung gezogen werden, dass das Gleichgewicht zwischen den katalytischen Untereinheiten der PKA und der regulatorischen Untereinheit, Ubc1, verschoben wurde. Daraus resultierend könnten unter diesen Bedingungen Uka1 und Uka2 partiell aktiviert werden und zu dem beobachteten Regulationsmuster beitragen.

Vergleichbar mit der Situation in der Bäckerhefe ist die cAMP-Signalkaskade in *U. maydis* vermutlich auch an der Wahrnehmung von Umweltsignalen wie Kohlenstoffquellen und/oder Stickstoffquellen beteiligt. In *S. cerevisiae* wird die Aktivierung des cAMP-Wegs durch die Wahrnehmung von Glukose ausgelöst. Diese Regulation erfolgt über die G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit Gpa2p, die mit dem potentiellen

Glukoserezeptor Gpr1p assoziiert ist (Thevelein und de Winde, 1999; Thevelein *et al.*, 2000). In *U. maydis* sind allerdings bisher noch keine vergleichbaren Rezeptoren für die Wahrnehmung von Umweltsignalen bekannt. Unter den gewählten Bedingungen zur Induktion von *adr1* wurden sowohl der Wildtypstamm als auch HE140 durch einen Wechsel der C-Quelle induziert. Auf diese Weise konnten Effekte, die durch das Induktionsmedium ausgelöst wurden, beim Vergleich der beiden Transkriptome ausgeschlossen werden. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass eventuell die Anwesenheit einer bestimmten C-Quelle, im vorliegenden Fall Arabinose, Voraussetzung für die PKA-abhängige Regulation bestimmter Gene ist bzw. mit der Regulation durch den cAMP-Weg interferiert.

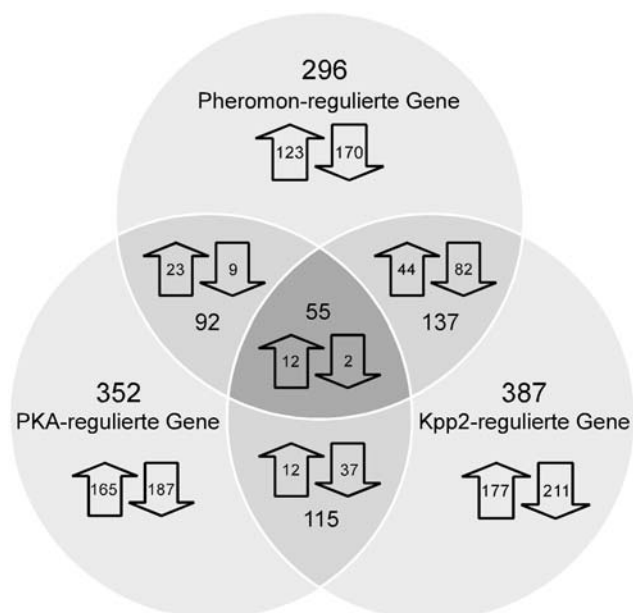
Die hier beobachtete Koregulation von bekannten und neuen Genen nach Überexpression von *adr1* und Pheromonstimulation (vergl. Abbildung 35) bestätigte die Funktion des cAMP-Signalwegs bei der Weiterleitung des Pheromonsignals bzw. bei der Zellfusion. Wie nachfolgend deutlich wird, handelt es sich bei dieser Teilgruppe u.a. um Gene, deren Produkte eine potentielle Funktion bei der Biosynthese des Pheromonsignals bzw. der Zellfusion besitzen. An der Regulation dieser Gene sind neben *Prf1* vermutlich weitere Komponenten beteiligt.

### **3.4 Identifizierung von Zielgenen der MAP-Kinase Kpp2**

Vergleichbar zu Expressionsanalysen des Fus3p-MAPK-Signalwegs in der Bäckerhefe (Roberts *et al.*, 2000) wurde in dieser Arbeit das Transkriptom von *U. maydis* nach Aktivierung des Kpp2-MAPK-Moduls untersucht. Hierbei wurden Stämme verwendet, die eine gezielte Aktivierung der Kpp2-MAPK-Kaskade erlauben. Beim Vergleich der Expressionsprofile von HE121 (*kpp2WT*) und HE125 (*kpp2AEF*) konnten 387 differentiell regulierte Gene identifiziert werden (Abbildung 14, Seite 39). Darunter befanden sich auch zahlreiche Gene, deren Kpp2-abhängige Expression aus früheren Arbeiten bekannt war (Müller *et al.*, 1999; Müller, 2003). Unter diesen Genen waren *prf1*, sowie Gene des *a*- und *b*-Locus. 106 Gene wurden differentiell reguliert, denen zur Zeit keine Funktion zugeordnet werden kann. Zudem wurden auch in diesem Experiment eine große Anzahl von Genen dereguliert, die für potentielle Komponenten primärer und sekundärer Stoffwechselprozesse kodieren. So wurde beispielsweise eine Gruppe von Genen induziert, die eine putative Funktion im Kohlenhydratstoffwechsel



hat. Darüber hinaus wurde auch die Expression einiger Hexosetransporter-Gene hochreguliert. Denkbar ist, dass diese Transporter bei der biotrophen Entwicklung benötigt werden (vergl. Kapitel 3.1).



**Abbildung 35: Vergleichende Transkriptomanalyse Kpp2-regulierter Gene mit PKA-regulierten Genen und der Pheromonantwort.** Im Schnittmengendiagramm ist die Gesamtzahl der in den entsprechenden Experimenten bzw. Vergleichen als differentiell reguliert gefundenen Gene angegeben<sup>1</sup>. Gene, die zu mindestens einem Zeitpunkt im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle zweifach oder stärker induziert bzw. reprimiert waren sind durch Pfeile dargestellt. „Pheromon-regulierte Gene“: Gene, die nach Stimulierung von FB1-Zellen mit synthetischem *a2*-Pheromon differentiell reguliert wurden. „Kpp2-regulierte Gene“: Gene, die im Stamm HE121(*kpp2WT*) im Vergleich mit dem Stamm HE125(*kpp2AEF*) differentiell reguliert wurden. „PKA-regulierte Gene“: Gene, die im Stamm HE140(*P<sub>erg1</sub>.adr1*) im Vergleich mit dem Ausgangsstamm FB1 differentiell reguliert wurden (vergl. Kapitel 2., Ergebnisse).

Nachdem die Kpp4/Fuz7/Kpp2-Kaskade an der Übermittlung des Pheromonsignals beteiligt ist, war zu erwarten, dass ein großer Teil der *kpp2*-regulierten Gene mit den Zielgenen der Pheromonantwort überlappt (Abbildung 35). Insgesamt wurden 137 Gene identifiziert, die sowohl nach Pheromonzugabe als auch nach Aktivierung der MAPK-Kaskade differentiell reguliert wurden. Unter diesen Genen befinden sich zwei Cyclin-

<sup>1</sup> Um die Expressionswerte miteinander vergleichen zu können wurden alle Microarray-Experimente normalisiert. Daraus folgend erklärt sich der Unterschied in der Anzahl der Pheromon-regulierten Gene im Vergleich zu der im Ergebnisteil beschriebenen Anzahl, bei der dieser Datensatz separat ausgewertet wurde. Der Unterschied kommt überwiegend durch Gene zustande, die, je nach Normalisierung, das zur Auswertung gesetzte Kriterium „um Faktor zwei oder stärker differentiell reguliert“ knapp über bzw. unterschreiten.

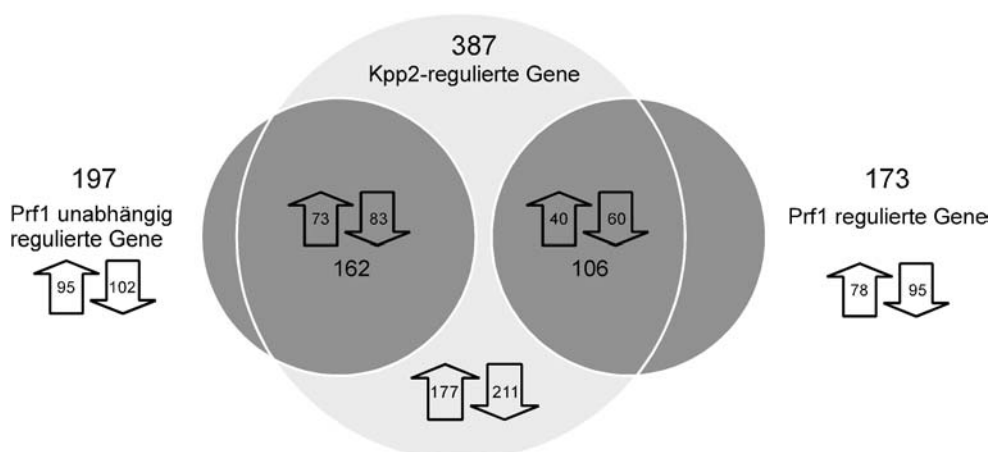
Gene. Das Gen des bekannten B-Typ-Cyclin Clb1 wurde nach Aktivierung der MAPK-Kaskade reprimiert. Eine vergleichbare Expressionsänderung wurde für ein Cyclin-Gen mit Ähnlichkeit zu *PCL1* aus *S. cerevisiae* beobachtet. Beide Gene sind Teil einer Gruppe, deren Gene für bekannte und potentielle Zellzyklusregulatoren kodieren (vergl. Kapitel 3.5.1).

Auffallend war auch eine Gruppe von fünf Genen, die für potentielle Motorproteine der Kinesin-Familie kodieren. Im Genom von *U. maydis* konnten zehn Kinesine identifiziert werden, die verschiedenen Unterfamilien angehören (I. Manns, pers. Mitteilung). Die Situation ist somit vergleichbar zu einer Reihe von filamentösen Pilzen, in denen diese Anzahl von Kinesinen als konserviert beschrieben wurde (Schoch *et al.*, 2003). Dabei können Kinesine, die am Transport von Zellorganellen beteiligt sind, von Kinesinen die an der Mitose beteiligt sind, unterschieden werden (Steinberg *et al.*, 1998; Schoch *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *U. maydis* fünf der zehn potentiellen Kinesin-Gene nach Aktivierung der Kpp2-MAPK-Kaskade bzw. bei der Pheromonantwort differentiell reguliert werden. Vier der Gene werden um einen Faktor von 2,3 bis 7 reprimiert, dagegen wird eines der Gene um Faktor 2,4 induziert. Bei dem induzierten Gen handelt es sich um *kin3*. Für Kin3 konnte eine Funktion beim Transport von Endosomen in haploiden Zellen gezeigt werden (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Die hier beschriebenen Daten deuten auf eine Funktion von Kin3 bei der Entwicklung von Konjugationshyphen hin. Es bleibt zu untersuchen, ob Kin3 dabei auch am Transport von Endosomen oder anderen Organellen beteiligt ist. Im Gegensatz zu *kin3* handelt es sich bei den reprimierten Genen um potentielle Kinesine der Mitose. Die Regulation dieser Gene ist damit in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass der Zellzyklus während der Pheromonantwort in der G<sub>2</sub>-Phase arretiert wird (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Unter diesen Genen befindet sich einerseits das bereits bekannte Kinesin *kin1* (Lehmler *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurden *kin4*, dessen Produkt Ähnlichkeit zu Kinesinen der Kar3/NCD-Familie hat, ein weiteres Gen, welches für ein potentielles Kinesin der BimC-Unterfamilie kodiert, sowie ein Gen für ein Kinesin der MCAK-Familie (I. Manns und G. Steinberg, pers. Mitteilung), reprimiert (vergl. Steinberg *et al.*, 1998; Schoch *et al.*, 2003). Über die genaue Funktion dieser Gene ist noch wenig bekannt. Insbesondere auf Grund der von Lehmler *et al.* (1997) gemachten Beobachtung, dass *kin1*-Deletionsmutanten keinen Phänotyp zeigen,

wäre es interessant zu untersuchen, ob eines der hier gefundenen Kinesine die Funktion von Kin1 übernehmen kann. Mit Hilfe von Doppeldeletionsmutanten oder Stämmen, die funktionell inaktive Kinesin-Varianten tragen, könnte diese Fragestellung untersucht werden. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass in *U. maydis* Gene die für Motorproteine kodieren transkriptionell reguliert werden.

### 3.4.1 Neben Prf1 regulieren weitere Transkriptionsfaktoren die Signalantwort von Kpp2

Insgesamt konnten 173 Gene identifiziert werden, die in Abhängigkeit von Prf1 durch Kpp2 reguliert wurden. Die Mehrheit dieser Gene wurde bereits unter den Kpp2-abhängig regulierten Genen identifiziert (vergl. Abbildung 36). Gene, die nur in einem dieser Experimente gefunden wurden, waren meistens nur zu einem der Zeitpunkte geringfügig dereguliert. Dabei handelt es sich überwiegend um potentielle Gene der Stressantwort bzw. um Gene, die für ribosomale RNA kodieren.



**Abbildung 36: Vergleichende Transkriptomanalyse Prf1-abhängig und unabhängig regulierter Gene.** Im Schnittmengendiagramm ist die Gesamtzahl der in den entsprechenden Experimenten bzw. Vergleichen als differentiell reguliert gefundenen Gene angegeben. Gene, die zu mindestens einem Zeitpunkt im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle zweifach oder stärker induziert bzw. reprimiert waren sind durch Pfeile dargestellt. A) „Prf1 regulierte Gene“: Gene, die im Stamm HE121(*kpp2WT*) im Vergleich mit dem Stamm HE182(*kpp2WTΔprf1*) differentiell reguliert wurden. B) „Prf1 unabhängig regulierte Gene“: Gene, die im Stamm HE182(*kpp2WTΔprf1*) im Vergleich zum Stamm (*kpp2AEFΔprf1*) differentiell reguliert wurden (vergl. Kapitel 2. Ergebnisse).

Unter den Prf1-abhängig induzierten Genen wurden die Gene der Paarungstyploci gefunden. Darüber hinaus wurden die zuvor identifizierten Gene wiedergefunden, deren Produkte eine mögliche Funktion bei der Pheromon-Modifizierung und -Sekretion

haben. Unter den Prf1-abhängig reprimierten Genen befanden sich dagegen überwiegend Gene, die für Proteine mit einer potentiellen Funktion in primären und sekundären Stoffwechselprozessen kodieren. Dabei handelt es sich beispielsweise um Enzyme, die am Fettstoffwechsel beteiligt sind oder die Übertragung bestimmter Reste bei der Aminosäuresynthese katalysieren. Aus den bisherigen Experimenten wurde deutlich, dass eine Überlappung der Transkriptionsantworten des cAMP-Signalwegs und der Kpp2-MAPK-Kaskade vorliegt. Durch weitere Analysen wurde nun versucht Regulationsmechanismen zu erkennen, die unabhängig - oder abhängig - von dem zentralen Transkriptionsfaktor Prf1 verlaufen. Unter diesen Genen könnten sich auch weitere Regulatoren befinden, die Prf1-abhängig reguliert werden. Zunächst wurde daher untersucht, welche Zielgene „pheromon response elements“ (PREs) im Promotorbereich tragen und somit potentielle Bindemotive für Prf1 aufweisen. Basierend auf der Genomsequenz von *U. maydis* (Whitehead) wurden die 5'-Bereiche aller Gene untersucht, die nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs, der Kpp2-MAPK-Kaskade bzw. nach der Pheromonstimulation induziert wurden. Insgesamt konnten 35 Gene identifiziert werden, die in ihrem potentiellen Promotor mindestens ein PRE enthalten, das der perfekten Konsensussequenz entspricht (Tabelle 4), (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996). Gene des *b*-Locus mit mehreren PRE-Boxen, die nicht im Promotorbereich liegen (Urban *et al.*, 1996), wurden in die Analyse eingeschlossen. Wie frühere Untersuchungen gezeigt haben, ist eine einzelne PRE-Box im Promotorbereich nicht ausreichend, um die Transkription zu vermitteln (Urban *et al.*, 1996). Allerdings können vermutlich auch weiter entfernt liegende PREs zur Transkriptionsaktivierung beitragen (Urban *et al.*, 1996). Vor diesem Hintergrund wurden die 5'-Bereiche von zehn dieser 35 Gene, die nach Pheromonzugabe am stärksten induziert waren, näher untersucht (Tabelle 4). Dabei konnten weitere PREs, die teilweise in einer Basenposition von der Konsensussequenz abweichen, identifiziert werden. Wie in Tabelle 4 zu sehen ist, konnten unter den Pheromon-induzierten Genen 33 Gene mit PRE-Boxen identifiziert werden. 18 dieser Gene werden nach Aktivierung des Fuz7/Kpp2-Signalwegs und 15 Gene nach Induktion der PKA hochreguliert. Beim Vergleich der Expressionsmuster fallen insbesondere drei Kategorien von Genen auf: Eine Gengruppe verhält sich ähnlich wie die Gene des *a*-Locus. Ihre Expression kann sowohl durch den cAMP-Weg, als auch

**Tabelle 4: Vergleich aller differentiell regulierten Gene mit „pheromone response elements“ im potentiellen Promotorbereich (Einzelheiten siehe Text).**

Nr.	„probe set“	<i>a2</i> <sup>1)</sup>	<i>kpp2</i> <sup>2)</sup>	<i>prf1</i> <sup>3)</sup>	$\Delta$ <i>prf1</i> <sup>4)</sup>	<i>adr1</i> <sup>5)</sup>	Gen/Annotation	PREs <sup>6)</sup>
1	W25um110G	X	X	X		X	<i>bE1</i>	a)
2	C112um175G	X	X	X		X	<i>prf1</i>	1
3	W51um130G	X	X	X		X	No Significant Function	1 (6)
4	W40um030G	X	X	X		X	Multi drug resistance protein, <i>STE6</i> like	2 (5)
5	C25um007G C23um007G	X	X	X		X	No Significant Function	1 (6)
6	C140um075G	X	X	X		X	Carboxy-esterase [ <i>Mus musculus</i> ]	1 (7)
7	W120um091G	X	X	X		X	No Significant Function	1
8	C20um077G	X	X	X		X	Membrane protein, related to <i>PRM1</i>	2 (5)
9	W10um286G	X	X	X		X	No Significant Function	1 (3)
10	W42um026G	X	X	X		X	<i>mfa1</i>	3
11	W40um026G	X	X	X		X	<i>pra1</i>	2
12	W115um227G	X	X	X			Farnesyl protein transferase alpha subunit	1
13	C83um085G	X	X	X			CAAX prenyl protease	1
14	C20um110G	X	X			X	<i>bW1</i>	a)
15	W20um280G	X	X		X		Unknown protein	1
16	W155um044G	X	X		X		<i>kpp6</i>	1
17	W25um077G	X	X				No Significant Function	2
18	C110um212G C111um212G	X	X		X		No Significant Function	1
19	C95um157G		X		X		Putative aquaporin	1
20	W55um007G	X		X		X	Farnesyl transferase beta subunit	1
21	C50um125G	X		X			No Significant Function	1 (3)
22	C70um145G	X		X			No Significant Function	1
23	C50um007G					X	Conserved hypothetical protein	1
24	W50um041G	X				X	No Significant Function	1
25	C100um020G	X					No Significant Function	1
26	C70um179G	X					Alpha adaptin like complex, AP-2 related	1 (2)
27	C76um154G	X					No Significant Function	1
28	C45um130G	X					No Significant Function	1
29	W70um083G	X				X	Clathrin associated adaptor complex, AP-2	2 (4)
30	W5um145G	X					Hypothetical ORF; Ypl184cp	1
31	C60um188G	X					No Significant Function	1
32	W105um133G	X					similar to <i>pot1</i> [ <i>E. nidulans</i> ]	1
33	W85um085G	X					Cyclin C [ <i>Homo sapiens</i> ]	1
34	W10um155	X					No Significant Function	1 (3)
35	W2um212G	X					Adaptor related protein complex, Sigma2	1
<b>Summe</b>		<b>33</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>16</b>		

1) Pheromon-induzierte Gene (FB1+a2/FB1+DMSO), vergl. Kapitel 2.3.2, Seite 28.

2) Kpp2-abhängig induzierte Gene (HE121/HE125), vergl. Kapitel 2.5.2, Seite 38.

3) Prf1-abhängig durch Kpp2 induzierte Gene (HE121/HE182), vergl. Kapitel 2.5.3, Seite 42.

4) Prf1-unabhängig durch Kpp2 induzierte Gene (HE182/HE185), vergl. Kapitel 2.5.3, Seite 42.

5) PKA-abhängig regulierte Gene (HE140/FB1), vergl. Kapitel 2.6.2, Seite 55.

6) Basierend auf der *U. maydis* Genomsequenz (Whitehead Institut) wurden alle Gene berücksichtigt, die mindestens ein „pheromone response element“ (PRE) im potentiellen Promotorbereich (-1000 bp) aufweisen, dass der perfekten Konsensussequenz (ACAAAGGGA) entspricht (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996).

In Klammern ist die Anzahl der perfekten und nicht-perfekten PREs (ein „miss-match“) angegeben, die in den 5'-Bereichen (-3000 bp) der zehn am stärksten durch Pheromon regulierten Gene gefunden wurden (s. Text).

a) Die im *b*-Locus befindlichen PREs liegen nicht im Promotorbereich der Gene, (vergl. Urban *et al.*, 1996).

über die Aktivierung der Kpp2-MAPK-Kaskade erfolgen (Tabelle 4, Nr. 1-13). Vergleichbar zu den *a*-Genen scheint *prf1* auch für die bislang unbekanntenen Gene dieser Gruppe essentiell zu sein, denn in *Aprf1*-Stämmen konnte nach Induktion von *fuz7DD* keine Induktion mehr beobachtet werden (Tabelle 4, Nr. 1-13).

Eine aktive Kpp2-MAPK ist offensichtlich nötig für die Expression einer anderen Gruppe von Genen (Tabelle 4, Nr. 14-19). In dieser Gruppe befand sich auch *kpp6*, dessen Promotor zwei PRE-Boxen enthält (Brachmann *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit früheren Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass die Transkriptionsaktivierung von *kpp6* zum Teil auch unabhängig von Prf1 erfolgen kann (Brachmann *et al.*, 2003). Für diese Gene konnte keine Prf1-abhängige Regulation nach Aktivierung der Kpp2-MAPK-Kaskade beobachtet werden. Daher ist es denkbar, dass für eine Prf1-abhängige Transkriptionsaktivierung dieser Gene zugleich ein induzierter cAMP-Weg benötigt wird.

Eine besonders interessante Gengruppe, die auch für Komponenten des potentiellen Clathrin-Adaptorkomplexes kodiert, wurde ausschließlich nach Pheromonstimulierung induziert (Tabelle 4, Nr. 25-28, 30-35). Ob diese Gene tatsächlich alle auch Prf1-abhängig reguliert werden muss in Frage gestellt werden, sie wurden nämlich nicht unter den Prf1-abhängig durch Kpp2 regulierten Genen gefunden. Möglicherweise werden zur Induktion dieser Gene zusätzliche Komponenten benötigt. Ob solche Faktoren zusammen oder als Interaktionspartner mit Prf1 eine Transkriptionsaktivierung vermitteln, bleibt spekulativ. Allerdings werden in einigen 5'-Bereichen dieser Gene mehrere PREs gefunden, was eine Regulation durch Prf1 wahrscheinlich macht. In früheren Arbeiten wurde bereits die Existenz weiterer Signalwege vermutet, die parallel zum cAMP-Signalweg und der Kpp4/Fuz7/Kpp2-Kaskade während der Pheromonantwort agieren (Müller *et al.*, 2003b) und an der Regulation solcher Komponenten beteiligt sein könnten. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob diese Gengruppe auch Prf1-unabhängig reguliert werden kann. Um diese Frage zu beantworten könnte eine Transkriptomanalyse mit einer *prf1*-Deletionsmutante nach Pheromonstimulation durchgeführt werden. In einem solchen Stamm müsste allerdings der Pheromonrezeptor *pral* konstitutiv exprimiert werden, da *Aprf1*-Mutanten „blind“ gegenüber Pheromon sind und weder Pheromon noch Pheromonrezeptor exprimieren (Hartmann *et al.*, 1996).

Desweiteren konnten insgesamt vier Gene mit einer PRE-Box im potentiellen Promotorbereich gefunden werden, die nach Aktivierung des cAMP-Wegs bzw. der Kpp2-MAPK-Kaskade reprimiert wurden. Die Funktion dieser Gene ist zur Zeit nicht bekannt. Allerdings waren sie nur geringfügig reguliert und zeigten nach Pheromonzugabe keine Expressionsänderung, was eine mögliche Prf1-abhängige Repression in Frage stellt.

Frühere Untersuchungen von Kaffarnik *et al.* (2003) zeigten, dass die Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsantworten durch die Phosphorylierung von Prf1 vermittelt wird. So führt die Weiterleitung des Pheromonsignals über den cAMP-Weg zur Phosphorylierung von Prf1 und dies hat die Transkriptionsaktivierung der *a*-Gene zur Folge. Die Phosphorylierung von Prf1 durch die PKA und Kpp2 ist hingegen notwendig, um die *b*-Gen Expression zu vermitteln (Kaffarnik *et al.*, 2003). Auch am Beispiel des Transkriptionsfaktors Ste12p aus *S. cerevisiae* wird deutlich, dass verschiedene Entwicklungsprogramme durch den selben Transkriptionsfaktor reguliert werden können: Die programmspezifische Bindung von Ste12p an die Promotoren von Zielgenen wird durch unterschiedliche Interaktionspartner von Ste12p vermittelt (Zeitlinger *et al.*, 2003). Ste12p kann dabei sowohl alleine, als auch zusammen mit Mcm1p Gene der Pheromonantwort regulieren (Errede und Ammerer, 1989; Primig *et al.*, 1991; Kirkman-Correia *et al.*, 1993; Oehlen *et al.*, 1996). Für die Aktivierung von Genen des filamentösen Wachstums wird dagegen die Interaktion mit Tec1p benötigt (Baur *et al.*, 1997; Mosch *et al.*, 1999). Vor diesem Hintergrund ist es vorstellbar, dass Prf1 erst nach Interaktion mit weiteren Komponenten bestimmte Gruppen von Genen erkennt.

Vergleichbar zu der Situation in *S. cerevisiae* konnte in *U. maydis* das MADS-Box Protein Umc1 identifiziert werden, welches Ähnlichkeit zu Mcm1p aus *S. cerevisiae* hat und als möglicher Interaktionspartner von *prf1* diskutiert wurde (Hartmann, 1997; Krüger *et al.*, 1997). Allerdings zeigten *umc1*-Deletionsmutanten nur eine leicht veränderte Expression der Gene des *a*- und *b*-Locus, weshalb die Existenz weiterer Komponenten vermutet wurde (Krüger *et al.*, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 197 Gene identifiziert, die unabhängig von Prf1 durch die Kpp2-MAPK-Kaskade reguliert wurden. Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, konnten diese Gene als Untergruppe der Kpp2-regulierten Gene wiedergefunden

werden. Unter diesen Genen wurden auch Regulatoren der pathogenen Entwicklung sowie der Konjugationshyphenbildung vermutet. So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass der Pathogenitätsverlust von *Δprf1*-Mutanten vollständig, der Pathogenitätsdefekt von *kpp2*-Deletionsmutanten dagegen nur teilweise durch die konstitutive Expression eines aktiven b-Heterodimers (dem zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung) aufgehoben werden kann (Hartmann *et al.*, 1996; Müller, 2003). Dass neben Prf1 ein weiterer Transkriptionsfaktor existieren muss, der für die Entwicklung von Konjugationshyphen benötigt wird, wurde durch Untersuchungen von Müller *et al.* (2003a) deutlich. So können beispielsweise Stämme, die das *fuz7DD*-Allel tragen (und damit eine genetisch aktivierte Kpp2-MAPK-Kaskade) auch dann Konjugationshyphen ausbilden, wenn *prf1* deletiert ist (Müller *et al.*, 2003b).

Nachdem für die potentiellen Transkriptionsfaktoren W50um006 und W50um220 eine solche Funktion nicht nachgewiesen werden konnte, wurde nun untersucht, ob die in diesem Experiment identifizierten Gene möglicherweise durch einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor reguliert werden, der sich nicht unter den identifizierten Zielgenen befand. In einer ersten *in silico* Analyse wurde deshalb versucht, regulatorische Elemente in den 5'-Bereichen der Kpp2-abhängig regulierten Gene zu identifizieren, an die ein solcher Regulator binden könnte. Für diese Analyse wurde das Programm MDscan (Liu *et al.*, 2002) eingesetzt, mit dessen Hilfe in *S. cerevisiae* zahlreiche bekannte *cis*-Elemente, basierend auf Microarray-Daten, wiedergefunden werden konnten. Zunächst wurden die Promotoren der 18 am stärksten Kpp2-abhängig induzierten Gene analysiert (siehe Tabelle 9, Anhang; diese Gengruppe beinhaltete auch folgende in Tabelle 4 gezeigten Gene: *prf1*, *ste6*, *mfal*, *pra1*, *kpp6*, sowie Gen Nr. 3, 5, 6, 18 und 19), (Conlon *et al.*, 2003). Tatsächlich entsprachen die besten fünf gefundenen Motive der Konsensussequenz der PRE-Box. Die Prf1-abhängige Regulation dieser Gene konnte zum Teil durch spätere Microarray-Analysen bestätigt werden (vergl. Tabelle 4, „prf1“, Nr. 1-6, 10, 11 ).

Im Anschluss daran wurden die Promotoren von Genen untersucht, die unabhängig von Prf1 durch Kpp2 induziert wurden (vergl. Abbildung 17, Seite 47; Gene, deren 5'-Bereiche analysiert wurden sind mit „m“ gekennzeichnet). In diese Analyse wurden nur Gene einbezogen, die bereits 75 min nach Induktion von *fuz7DD* in HE182 (*kpp2WTΔprf1*) im Vergleich zu HE185 (*kpp2AEFΔprf1*) eine erhöhte Expression



zeigten. Hierbei konnte ein Sequenzelement (AWTCRYGAWT) in mehreren Promotorbereichen identifiziert werden. Als Konsensussequenz wurde interessanterweise eine palindromische Sequenz (AATCATGATT) gefunden. In den untersuchten Promotorbereichen konnten teilweise zwei der nicht-perfekten Elemente identifiziert werden. Ob es sich hierbei tatsächlich um ein *cis*-aktives Element handelt, muss jedoch in Frage gestellt werden. Die Sequenz AWTCRYGAWT findet sich auch in einfacher Kopie in den Promotorbereichen zufällig ausgewählter Gene, die in den vorliegenden Experimenten nicht reguliert waren. Auf experimentellem Weg könnte durch den Einsatz von Reportergenkonstrukten geprüft werden, ob das gefundene Element eine spezifische Kpp2-abhängige und Prf1-unabhängige Transkriptionsaktivierung vermitteln kann.

Zusammen betrachtet zeigen diese Untersuchungen, dass zwar eine Vielzahl von Genen nach Aktivierung der Kpp2-MAPK-Kaskade reguliert werden. Da die Prf1-unabhängig regulierten Gene jedoch keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten im Promotor aufweisen, scheint ein einzelner Regulator, der alle Prf1-unabhängig regulierten Gene steuert und zum Beispiel an der Entwicklung von Konjugationshyphen beteiligt sein könnte, unwahrscheinlich. Bei den in der Expressionsanalyse detektierten Genen handelt es sich somit möglicherweise um Zielgene von Regulatoren. Es ist vorstellbar, dass die gesuchten regulatorischen Komponenten nicht transkriptionell, sondern auf posttranskriptioneller Ebene durch Kpp2 reguliert werden. Da in den Promotorbereichen der Prf1-unabhängig regulierten Gene kein gemeinsames regulatorisches Element gefunden wurde, kann spekuliert werden, dass nicht ein einzelner Transkriptionsfaktor, sondern vermutlich mehrere Komponenten an der Regulation beteiligt sind.

In verschiedenen eukaryotischen Modellorganismen konnte gezeigt werden, dass MAPK-Signalwege an der Regulation des Cytoskeletts beteiligt sind (Leeuw *et al.*, 1995; Zarzov *et al.*, 1996; Yuzyuk *et al.*, 2002; Samaj *et al.*, 2004). Es wäre vorstellbar, dass vergleichbare Mechanismen auch in *U. maydis* an der Entwicklung von Konjugationshyphen beteiligt sind. Um posttranskriptionelle Mechanismen zu erkennen, wäre eine Analyse des Phosphoproteoms aufschlussreich. Hierzu könnten die Stämme HE121 und HE125 in einer vergleichenden Untersuchung eingesetzt werden.

Die auf diese Weise erzeugten Daten könnten mit der hier beschriebenen Expressionsanalyse korreliert werden.

### **3.5 Die genomweite Expressionsanalyse der Pheromonantwort**

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurden zahlreiche bekannte aber auch neue potentielle Gene der Pheromonantwort identifiziert. Durch die Expressionsanalyse Pheromon-stimulierter Zellen konnte die Regulation dieser Gene bestätigt werden. Darüber hinaus wurde in diesem Experiment deutlich, dass vermutlich weitere, bislang unbekannte Signalwege an der Pheromonantwort beteiligt sind.

Über den untersuchten Zeitraum von 360 min war die Expression von 156 Genen um den Faktor 2 bis 61 induziert und die Expression von 138 Genen war um den Faktor 2 bis 7 reprimiert. Diese Ergebnisse liegen in einer vergleichbaren Größenordnung wie Resultate aus Experimenten mit *S. cerevisiae*, in denen *MATa*-Zellen mit  $\alpha$ -Faktor stimuliert wurden (Roberts *et al.*, 2000). Mit den Genen *pra1*, *bE1*, *bW1*, *prf1*, *kpp6* konnten Gene gefunden werden, von denen bekannt ist, dass sie bei der Pheromonantwort induziert werden (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2003). Für die *cab*-Gene konnte in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Pheromon-Signalkaskade zu einer Repression führt (Brachmann *et al.*, 2001). Zugleich konnte mit den *cab*-Genen eine koregulierte Gengruppe wiedergefunden werden, deren Produkte vermutlich auch eine gemeinsame Funktion bei der Kapselbildung von *U. maydis* haben (Brachmann *et al.*, 2001).

Interessanterweise wurde in diesen Experimenten auch die Pheromon-induzierte Expression von *fuz7* und *kpp2* beobachtet. Welche Transkriptionsfaktoren diese Regulation vermitteln könnten, und ob dabei möglicherweise auch der Transkriptionsfaktor Ncp1 (Hartmann *et al.*, 1999) beteiligt ist, dessen Gen ebenfalls nach Pheromonzugabe induziert wurde, bleibt spekulativ.

Vergleichbar zur Situation nach Aktivierung des cAMP-Wegs führte die Pheromonzugabe zur Induktion bislang unbekannter Gene, deren Proteine eine mögliche Funktion bei der Pheromonantwort haben. Darunter befand sich das Gen des putativen

Pheromontransporters Ste6. Zudem wurden verschiedene Gene induziert, die für vermutliche Enzyme der Pheromonreifung und eines potentiellen Rezeptor-Recyclingprozess kodieren. Beispielsweise wurden die Gene einer potentiellen CAAX-Prenyl-Protease, der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit einer putativen Farnesyltransferase, sowie einer potentiellen Methyltransferase identifiziert. Die Regulation dieser Gene ist im Einklang mit der Beobachtung, dass die Pheromonvorläufer-Peptide posttranslational modifiziert werden (Spellig *et al.*, 1994a). Während Mfa1 und Mfa2 40 bzw. 38 Aminosäuren lang sind, weisen die sekretierten Pheromone eine Länge von dreizehn bzw. neun Aminosäuren auf (Bölker *et al.*, 1992; Spellig *et al.*, 1994b). Beide Proteine sind an einem C-terminalen Cystein-Rest farnesyliert und carboxy-methyl-esterifiziert (Spellig *et al.*, 1994a). In der Bäckerhefe ist gezeigt worden, dass eine Vielzahl von Proteinen, die ein C-terminales CAAX-Motiv tragen, posttranslational modifiziert werden. Hierzu gehören beispielsweise die Ras-Proteine oder der a-Faktor (Goodman *et al.*, 1990; Trueblood *et al.*, 1993; Trueblood *et al.*, 2000). Der strukturelle Aufbau der *U. maydis* Pheromone ist vergleichbar mit dem a-Faktor aus *S. cerevisiae*, der ebenfalls am C-Terminus farnesyliert und methyl-esterifiziert wird (He *et al.*, 1991; Hrycyna *et al.*, 1991).

Auffallend war die Induktion von drei Genen, die für Proteine mit einer möglichen Funktion bei Clathrin-vermittelten Endocytose kodieren. Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieser Gene zeigt Homologie zu Komponenten des AP-Komplexes („adaptor protein“) aus *S. cerevisiae*. Derartige Komplexe sind hochkonserviert und werden bei der rezeptorvermittelten Endocytose gebraucht (Baggett und Wendland, 2001; Boehm und Bonifacino, 2002). Vergleichbar zur Situation in *S. cerevisiae* ist vorstellbar, dass diese Komponenten für die Internalisierung nach Bindung von Pheromon bzw. für einen Recyclingprozess des Pheromonrezeptors gebraucht werden (Schandel und Jenness, 1994; Chen und Davis, 2000).

### 3.5.1 Regulation des Zellzyklus während der Pheromonantwort

Unter den Pheromon-regulierten Genen wurden mehrere Gene von potentiellen Zellzyklusregulatoren identifiziert. Darunter waren auch vier Gene, die für bekannte bzw. potentielle Cycline kodieren (vergl. Abbildung 10, Seite 31, die Gene sind mit „o“ gekennzeichnet). Die Expression von *clb1*, welches für ein bekanntes B-Typ-Cyclin

kodiert, wurde nach Pheromonzugabe reprimiert. Dies unterstreicht die Ergebnisse von García-Muse *et al.* (2004), die zeigten, dass Clb1 eine essentielle Funktion bei der Regulation des Übergangs von der G<sub>1</sub> zur S-Phase sowie von der G<sub>2</sub> in die M-Phase hat. In *U. maydis* wird der Zellzyklus während der Pheromonantwort in der G<sub>2</sub>-Phase arretiert (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Hierin unterscheidet sich *U. maydis* von Ascomyceten, bei denen die Wahrnehmung von Pheromon zu einem Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase führt (Davey, 1998; Oliver und Schweizer, 1999). In *U. maydis* reguliert Clb1 zusammen mit einem weiteren Cyclin, Clb2, die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk1 (Garcia-Muse *et al.*, 2004). So können beispielsweise Stämme, in denen die sogenannten „destruction-box“-Motive in *clb1* mutiert wurden, die Mitose nicht mehr vollständig durchlaufen (Garcia-Muse *et al.*, 2004). Ob Cdk1 über die Interaktion oder die vorhandene Menge an Clb1 reguliert wird ist unbekannt (J. Pérez, pers. Mitteilung). Die vorliegenden Daten zeigten, dass *clb1* auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Auf Grund dieser Beobachtung kann postuliert werden, dass während der Pheromonantwort über die Transkriptmenge vermutlich auch die Menge an Clb1 reduziert wird. Eine solche Regulation wäre vergleichbar mit Clb2p aus *S. cerevisiae*. Für dieses B-Typ-Cyclin konnten Spellman *et al.* (1998) zeigen, dass neben der Regulation der Proteinstabilität die transkriptionelle Regulation eine wichtige Rolle spielt.

Neben *clb1* wurden drei weitere Cyclin-Gene mit Ähnlichkeit zu *PCL1* und *PCL2* aus *S. cerevisiae* bzw. Cyclin C aus Mensch, differentiell reguliert. Während das *U. maydis* *pcl1* unter den hochregulierten Genen identifiziert wurde, handelt es sich bei *pcl2* um ein Pheromon-reprimiertes Gen. In *S. cerevisiae* sind beide Cycline namensgebend für die PCL1,2-Cyclin-Unterfamilie (Measday *et al.*, 1997). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von G<sub>1</sub>-Cyclinen, die mit der Cyclin-abhängigen Kinase Pho85p interagiert und zum Eintritt in die Mitose benötigt wird (Measday *et al.*, 1997). Neben den bekannten Komponenten wurden weitere Regulatoren in *U. maydis* postuliert, welche den Übergang von der G<sub>1</sub> in die S-Phase bzw. von der G<sub>2</sub> in die M-Phase regulieren (Garcia-Muse *et al.*, 2004). Die oben beschriebenen Cycline könnten an dieser Regulation beteiligt sein. In *S. cerevisiae* konnte nach Pheromonzugabe sowohl die Induktion als auch die Repression von G<sub>1</sub>-Cyclin-Genen, die für Aktivatoren bzw. Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen kodieren, gezeigt werden (Wittenberg *et*

*al.*, 1990; Measday *et al.*, 1994; Measday *et al.*, 1997). Auf Grund der gegensätzlichen Expressionsmuster der hier gefundenen Cyclin-Gene kann über eine antagonistische Funktion spekuliert werden. Möglicherweise unterstützt beispielsweise Pcl1 in *U. maydis* die Arretierung des Zellzyklus, während Pcl2, vergleichbar zu Clb1, für den Eintritt in die Mitose benötigt werden könnte. Im Rahmen dieser Arbeit ist es nicht gelungen, Deletionsmutanten von *pcl1* herzustellen (nicht gezeigt). Diese Beobachtung wird durch Versuche von J. Pérez gestützt und deutet auf eine essentielle Funktion dieses Gens während des Zellzyklus hin (J. Pérez, pers. Mitteilung). Um die Funktion dieser neuen Komponenten bei der Pheromonantwort in *U. maydis* untersuchen zu können, wäre es hilfreich, konditionale Mutanten herzustellen.

### **3.6 Werden zusätzliche Komponenten zur Aktivierung von Genen, die unterhalb von Kpp6 liegen, benötigt?**

Um Zielgene der MAP-Kinase Kpp6 zu identifizieren, wurde das Transkriptom der Stämme HE127 (*kpp6WT*) und HE131 (*kpp6AEF*) analysiert und miteinander verglichen. Unter den untersuchten Bedingungen konnten keine Kpp6-regulierten Gene detektiert werden. Hierbei könnten verschiedene Gründe eine Rolle spielen. Wird Kpp6 nicht durch Fuz7, sondern durch eine andere MAPKK aktiviert? In der Genomsequenz von *U. maydis* werden neben Fuz7 noch mindestens zwei weitere putative MAPK-Kinasen gefunden, die Ähnlichkeit zu MAPK-Kinasen aus *S. cerevisiae* zeigen. Um zu untersuchen, ob diese Kinasen an der Aktivierung von Kpp6 beteiligt sind, könnten analog zu *fuz7DD* konstitutiv aktive Allele dieser MAPK-Kinasen konstruiert werden.

Da es sich bei *kpp6* um ein essentielles Gen der frühen Infektionsphase handelt, wäre es auch denkbar, dass neben der Aktivierung durch Fuz7 weitere Komponenten für die Funktion von Kpp6 entscheidend sind. Solche Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren, könnten durch das b-abhängige Programm bereitgestellt werden und waren daher im untersuchten haploiden Stamm nicht präsent. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnten Transkriptionsanalysen mit Stämmen durchgeführt werden, die analog zu HE127 und HE131 aufgebaut sind und zusätzlich ein aktives b-Heterodimer produzieren.

Interessanterweise wurde bei der Aktivierung des Stamms HE127(*kpp6AEF*) eine im Vergleich zum Stamm HE131(*kpp6WT*) schnellere und stärkere morphologische

Antwort beobachtet. Zellen, die das *kpp6AEF*-Allel exprimierten, bildeten deutlich schneller Konjugationshyphen-ähnliche Strukturen aus, als Stämme die das *kpp6WT*-Allel trugen. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Kpp6 die Aktivität von Kpp2 regulieren kann. So konnte in „Two-Hybrid“-Analysen gezeigt werden, dass Kpp2 und Kpp6 Heterodimere ausbilden können (Müller, 2003). Darüber hinaus konnte vor kurzem durch die Verwendung eines  $pTE_{pY}$ -spezifischen Antikörpers gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Kpp2 nach Aktivierung von *fuz7DD* im Stamm HE131 (*kpp6AEF*) deutlich schneller und stärker verläuft als im Stamm HE127 (*kpp6WT*), (P. Müller, pers. Mitteilung). Dagegen ist es bisher nicht gelungen, die Phosphorylierung von Kpp6 durch Fuz7DD in diesen Stämmen eindeutig zu zeigen (P. Müller, pers. Mitteilung). Zusammen betrachtet deuten diese Untersuchungen darauf hin, dass Kpp6 die Aktivität von Kpp2 inhibieren kann und die Aktivierungsdomäne hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Die Frage, ob diese Regulation durch die Phosphorylierung von Kpp6 oder die Interaktion der beiden Kinasen vermittelt wird, bleibt offen. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit früheren Ergebnissen, die zeigten, dass Kpp2 und Kpp6 zeitlich versetzt agieren und unterschiedliche Entwicklungsschritte kontrollieren (Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003b). Eine vergleichbare Situation wurde in *S. cerevisiae* beschrieben. Dort limitiert die Aktivierung von Fus3p sowohl die Stärke als auch die Dauer der Phosphorylierung von Kss1p und verhindert vermutlich auf diese Weise eine Überschneidung der Signalantworten für filamentöses Wachstum bzw. Pheromonantwort (Sabbagh *et al.*, 2001).

Zur Identifikation von Kpp6-Zielgenen wäre es darüber hinaus hilfreich, eine Technik zu entwickeln, die es erlaubt, in ausreichender Menge Zellmaterial des frühen Infektionsstadiums, d.h. aus den Appressorien-artigen Strukturen, zu isolieren. Die hieraus isolierte RNA könnte mit Microarrays untersucht werden. Allerdings war es bislang nicht möglich, das Appressorienstadium auf artifiziellen Membranen zu erzeugen.

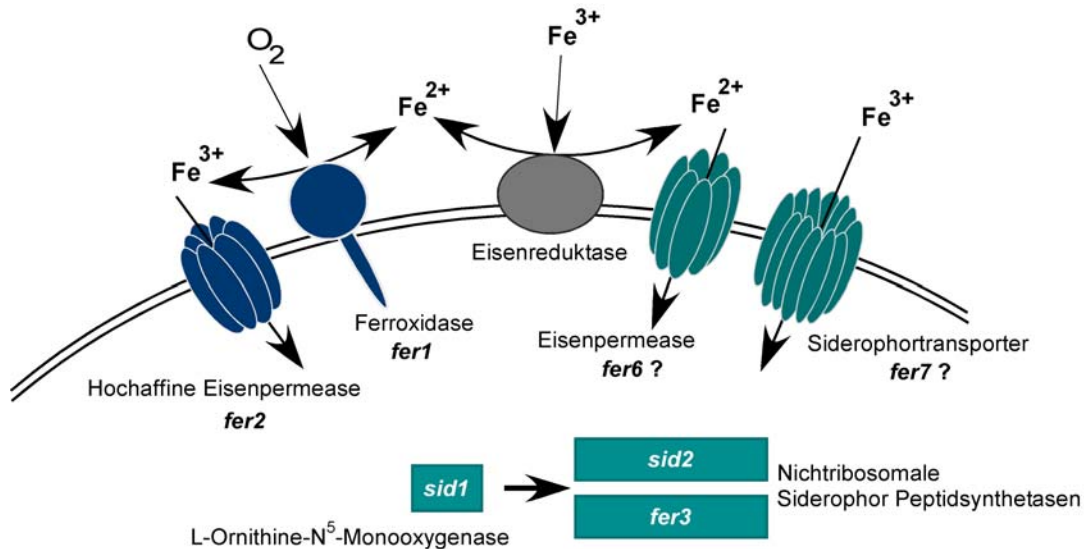
### 3.7 Die Eisengencuster in *U. maydis*

Wie im Kapitel 2.6.2 beschrieben wurde, konnte nach Aktivierung des cAMP-Wegs eine Gruppe von zehn koregulierten Genen identifiziert werden, die für Proteine mit einer vermutlichen Funktion bei der Eisenaufnahme kodieren.

Hauptbestandteil des nicht-reduktiven Eisenaufnahmesystems ist die Siderophorenvermittelte Aufnahme von  $\text{Fe}^{3+}$  (Kosman, 2003). In *U. maydis* werden die Siderophoren Ferrichrom und Ferrichrom A synthetisiert (Wang *et al.*, 1989). In beiden Fällen handelt es sich um zyklische Peptide, die nichtribosomal produziert werden und vermutlich durch Transporter ausgeschieden und wieder aufgenommen werden (Wang *et al.*, 1989; Kosman, 2003). In *U. maydis* konnte bereits gezeigt werden, dass die Siderophorenbiosynthese keine Funktion während der pathogenen Entwicklung hat (Mei *et al.*, 1993). In dieser Arbeit konnten weitere potentielle Gene des nicht-reduktiven, aber auch des reduktiven Eisenaufnahmesystems identifiziert werden. Diese Gene konnten interessanterweise in drei Clustern auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert werden. Fast alle der auf Chromosom II und IV gruppierten Gene scheinen eine Funktion bei der Synthese und Aufnahme von Siderophoren zu haben und kodieren somit für neue putative Komponenten des nicht-reduktiven Eisenaufnahmewegs. Hierunter befand sich auch das bereits bekannte Siderophorenbiosynthesecluster auf Chromosom IV, das die Gene *sid1* und *sid2* umfasst (Mei *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 2001). Die Clusterung der Gene einer Siderophoren-Peptidsynthetase und einer Ornithin-N<sup>5</sup>-Monooxygenase wurde erstmals in *U. maydis* beschrieben (Yuan *et al.*, 2001). Auch in *S. pombe* und *Aureobasidium pullans*, jedoch nicht in *A. nidulans*, wurde eine solche Anordnung gefunden (Haas, 2003).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden nur zwei pilzliche, nichtribosomale Peptidsynthetasen charakterisiert, welche die Synthese von Siderophoren katalysieren: Sid2 aus *U. maydis* und SidC aus *Aspergillus nidulans* (Yuan *et al.*, 2001; Eisendle *et al.*, 2003; Haas *et al.*, 2003). Nachdem gezeigt wurde, dass Sid2 die Synthese des Ferrichroms katalysiert, war naheliegend, dass Fer3 für die Biosynthese von Ferrichrom A verantwortlich sein könnte (Yuan *et al.*, 2001). Vor kurzem ist es gelungen Deletionsmutanten von *fer3*, dem Gen der weiteren potentiellen Siderophoren-

synthetase in *U. maydis*, herzustellen. In HPLC-Analysen konnte durch den Vergleich mit Wildtypstämmen gezeigt werden, dass  $\Delta fer3$ -Stämme kein Ferrichrom A bilden können. Damit ist gezeigt, dass Fer3 tatsächlich für die Synthese von Ferrichrom A verantwortlich ist (F. Leßing und H. Eichhorn, unveröffentl.). Neben *fer3* könnte in Zukunft auch die Funktion der anderen Gene des Eisenclusters auf Chromosom II in Bezug auf Modifikation und Transport der Siderophoren untersucht werden.



**Abbildung 37: Modell zur Eisenaufnahme in *U. maydis*.** Gezeigt ist ein Modell der Eisenaufnahme-Vorgänge an der Zellmembran von *U. maydis*. Komponenten des reduktiven und nicht-reduktiven Eisenaufnahmesystems, die in dieser Arbeit als koreguliert identifiziert wurden, sind farbig dargestellt. Komponenten des hochaffinen reduktiven Aufnahmewegs sind in blau eingezeichnet. Die Abbildung wurde in Anlehnung an die Darstellung von D. Kosmann (2003) gezeichnet.

Das Gencluster auf Chromosom II von *U. maydis* ist vergleichsweise groß, neben *fer3* wurden weitere potentielle Gene der Siderophorenbiosynthese gefunden und zudem zwei Gene, die für Transporter der „major-facilitator“-Proteinfamilie kodieren. Der Transporter Fer7 zeigt Ähnlichkeit zu dem Siderophorentransporter Sit1p aus *S. cerevisiae*, weshalb eine vergleichbare Rolle naheliegt. Eine Clusterung von Transportkomponenten mit anderen Komponenten des nicht-reduktiven Eisenaufnahmesystems wurde in anderen Pilzen noch nicht beschrieben, wohl aber in pathogenen Bakterien. In zahlreichen Bakterienspezies finden sich Gencluster zur Eisenaufnahme auf Pathogenitätsinseln (Schryvers und Stojiljkovic, 1999; Carniel, 2001; Rodriguez und Smith, 2003). Im Gegensatz zu vielen bakteriellen Pathogenen besitzt der nicht-reduktive Eisenaufnahmeweg jedoch keine entscheidende Funktion in



der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. So zeigen *sid1*-Deletionsmutanten, die weder Ferrichrom noch Ferrichrom A produzieren können, da sie die notwendige Vorstufe Hydroxyornithin nicht bilden können, keine Reduktion in der Pathogenität im Vergleich zu Wildtypstämmen (Mei *et al.*, 1993). Darüber hinaus deuten auch erste Versuche mit *fer6*-Deletionsmutanten, denen ein putativer Transporter fehlt, darauf hin, dass dies keinen Einfluss auf die Pathogenität von *U. maydis* hat (Daten nicht gezeigt).

Nachdem Eisen ein essentieller Kofaktor für zahlreiche Schlüsselenzyme darstellt, müssen Pathogene insbesondere während der Interaktion mit dem Wirtsorganismus um die Aufnahme von Eisen konkurrieren. In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass in *U. maydis* das reduktive Eisenaufnahmesystem eine solche Funktion während der biotrophen Entwicklung übernimmt.

Auf Chromosom I konnte ein drittes Gencluster identifiziert werden, das für zwei Komponenten des reduktiven Eisenaufnahmesystems kodiert. Dieses System basiert auf einer Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) durch relativ unspezifische Reduktasen. Im Genom von *U. maydis* konnten mindestens vier putative Eisenreduktasen gefunden werden, die allerdings nicht innerhalb der beschriebenen Cluster liegen. Eine dieser potentiellen Reduktasen zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie die *fer*-Gene, allerdings wurde das Gen nach Aktivierung des cAMP-Wegs nur weniger als zweifach reguliert. Die Situation ist damit vergleichbar mit der in *S. cerevisiae*, wo gezeigt werden konnte, dass die Expression verschiedener Reduktasen unterschiedlich reguliert wird bzw. konstitutiv ist (Haurie *et al.*, 2003). Die Funktion dieser Reduktasen ist eher unspezifisch, sowohl Kupfer- als auch Eisenionen werden als Substrate umgesetzt (Kosman, 2003).  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen können anschließend über einen Reoxidationsprozess, der zugleich ein hohes Maß an Spezifität vermittelt, aufgenommen werden (Kosman, 2003). Diese Reoxidation und Aufnahme von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen wird durch einen membranständigen Komplex, der aus einer Ferroxidase und einer hochaffinen Eisenpermease besteht, vermittelt. Vergleichbar zu *N. crassa* und *S. pombe* konnten auch in *U. maydis* die Gene der Ferroxidase und der Eisenpermease benachbart gefunden werden (Askwith und Kaplan, 1997; Frishman *et al.*, 2003). Übereinstimmend mit den hier beschriebenen Ergebnissen konnte in *S. pombe* gezeigt werden, dass die Expression dieser Gene durch Eisen reprimiert wird (Askwith und Kaplan, 1997). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Eisenpermease, Fer2, konnte in der Zellmembran lokalisiert werden.

Außerdem konnte der Wachstumsdefekt von Null-Mutanten der *S. cerevisiae* Eisenpermease, *FTR1*, vollständig durch *fer2* komplementiert werden. Dieses Resultat legt nahe, dass es sich bei Fer2 tatsächlich um eine funktionelle Eisenpermease handelt.

In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass für die Funktion des hochaffinen Eisenaufnahmesystems eine korrekte Membrantopologie entscheidend ist. Diese Anordnung wird durch die Interaktion von Ftr1p mit der Ferroxidase, Fet3p, bestimmt (Stearman *et al.*, 1996). So gelang es zum Beispiel nicht, die Ferroxidasemutante *fet3* aus *S. cerevisiae* mit dem entsprechenden Gen *fiol1* aus *S. pombe* zu komplementieren (Askwith und Kaplan, 1997). In *U. maydis* ist es inzwischen auch gelungen, Deletionsmutanten der potentiellen Ferroxidase, *fer1*, herzustellen. In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Pathogenität von  $\Delta$ *fer1*-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp um ca. 60% reduziert ist und nur kleine Tumore gebildet wurden. Dieser Phänotyp ist somit vergleichbar zu *fer2*-Deletionsmutanten und bestätigt die Bedeutung des reduktiven Eisenaufnahmewegs während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*.

### **3.7.1 Die Regulation der Gene der Eisengengcluster**

Die Eisengengcluster wurden basierend auf ihrer Koregulation nach Aktivierung der PKA identifiziert. Durch Northernanalysen konnte gezeigt werden, dass alle *fer*-Gene, sowie *sid1* einen intakten cAMP-Weg für die Expression benötigen. In Deletionsmutanten der Adenylatzyklase ist die Expression der *fer*-Gene reduziert oder nicht detektierbar, d.h. der Grundlevel an PKA-Aktivität reicht vermutlich für die Expression dieser Gene aus. Expressionsanalysen mit  $\Delta$ *ubc1*-Mutanten, die einen konstitutiv aktiven cAMP-Signalweg nachahmen, zeigten dagegen, dass nur *fer2* durch die PKA induziert wird. Diese Beobachtung konnte durch ein cAMP-Fütterungsexperiment bestätigt werden. Für die anderen Gene war die Expression in der *ubc1*-Deletionsmutante entweder unverändert oder sogar leicht reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Diese Beobachtung überraschte, da die Gene im Array-Experiment koreguliert waren, allerdings ist ein direkter Vergleich zwischen den Experimenten nicht möglich. Wie zuvor beschrieben unterliegen die Gene, die nach Induktion des Stamms HE140 dereguliert wurden, vermutlich einer komplexen Regulation. Es ist denkbar, dass der Medienwechsel bei der Induktion die Regulation dieser Gene

beeinflusst hat. Während das Expressionsniveau der *fer*-Gene im Wildtyp nach der Induktion stark abfiel, wirkte die Induktion der PKA im Stamm HE140 einer solchen Regulation entgegen, was den Einfluss des cAMP-Wegs bei der Regulation dieser Gene deutlich macht. Mit Ausnahme von *fer2* konnten darüber hinaus Hinweise erhalten werden, dass die eisenabhängige Repression der Regulation durch den cAMP-Weg übergeordnet ist. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Transkription von Genen der Eisenaufnahmesysteme durch eine der drei katalytischen Untereinheiten der PKA, Tpk2p, reprimiert wird. Diese Gruppe von Genen beinhaltet neben verschiedenen Eisenreduktasen auch eine Eisenpermease sowie den putativen Siderophorentransporter Sit1p (Robertson *et al.*, 2000). Für einen Teil dieser Gene konnte die transkriptionelle Aktivierung durch Aft1p unter Eisenmangelbedingungen nachgewiesen werden (Yun *et al.*, 2000; Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004). Die Situation ist damit genau umgekehrt zu der Regulation in *U. maydis*. Hier konnte gezeigt werden, dass der GATA Transkriptionsfaktor Urbs1 bei Anwesenheit von Eisen die Gene *sid1* und *sid2* reprimiert (Voisard *et al.*, 1993; An *et al.*, 1997). Unter eisenlimitierenden Bedingungen wird diese Repression aufgehoben (Voisard *et al.*, 1993). Auch die Expression der neu identifizierten *fer*-Gene war unter Eisenmangel hochreguliert und reprimiert durch Eisen. In den Promotorbereichen dieser Gene konnten potentielle Urbs1-Bindesequenzen identifiziert werden. Basierend auf diesem Resultat ist es wahrscheinlich, dass auch die *fer*-Gene durch Urbs1 reguliert werden.

Während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* konnte nur in einem sehr kleinen Zeitfenster, sechs Tage nach der Infektion von Maispflanzen, die Expression von *fer2* detektiert werden. Auf Grund der Tatsache, dass für dieses Experiment die Stämme unter eisenreprimierenden Bedingungen angezogen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass zunächst interne Eisenspeicher aufgebraucht wurden bevor es zu einer Eisenmangelsituation kommt. In Versuchen mit der Bäckerhefe konnte nach einem „shift“ von eisenhaltigem Medium in Eisenmangelmedium gezeigt werden, dass zunächst vier Zellteilungen erfolgen müssen, bevor das Permease-gestützte Aufnahmesystem angeschaltet wird (Georgatsou und Alexandraki, 1994). Zur Zeit ist jedoch ungeklärt, ob die in der Pflanze beobachtete *fer2*-Expression durch Eisenmangel oder einen hohen internen cAMP-Spiegel bedingt ist. Gegen eine Regulation durch die PKA sprechen Beobachtungen aus früheren Arbeiten mit Stämmen, die einen

aktivierten cAMP-Weg tragen. So wird in Mutanten, die das dominant-aktive *gpa3*<sup>Q206L</sup> exprimieren oder eine aktivierte PKA tragen, die Proliferation bzw. Tumorbildung inhibiert (Gold *et al.*, 1997; Regenfelder *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 2000). Allerdings konnte die Expression von *fer2* nur in einem kurzen Zeitfenster während der Proliferation in der Pflanze beobachtet werden, in dem eine Regulation durch beide Faktoren denkbar wäre.

### **3.7.2 Die Eisenpermease *fer2* ist ein Virulenzfaktor**

Mit zwei kompatiblen Wildtypstämmen infizierte Maispflanzen zeigten zwölf Tage nach der Infektion in über 90 % der Fälle eine Tumorbildung und viele dieser befallenen Pflanzen waren bereits verwelkt oder abgestorben. Dagegen zeigte nur etwa die Hälfte der mit *fer2*-Deletionsmutanten infizierten Pflanzen eine Tumorentwicklung. Hierbei handelte es sich häufig nur um kleine Blat tumore. Alle Pflanzen waren auch zwei Wochen nach der Infektion vital. Aus diesem Grund kann *fer2* als Virulenzfaktor bezeichnet werden. Für den Begriff „Virulenzfaktor“ ist in der Literatur keine eindeutige Definition gegeben (Hogan *et al.*, 1996; Agrios, 1997). Er wird zur Bezeichnung eines Gens benutzt, dessen Verlust keine Auswirkung auf das vegetative Wachstum hat, aber zu einer signifikanten Reduktion der pathogenen Entwicklung führt. *fer2*-Deletionsmutanten bilden Appressorien-artige Strukturen auf der Blattoberfläche aus und auch die Anthocyanbildung, die eine Folge reaktion nach der Penetration darstellt, ist unverändert im Vergleich zu Wildtypinfektionen. Nachdem diese Entwicklungsschritte keinen Unterschied zum Wildtyp aufweisen, kann postuliert werden, dass im Inokulum eine ausreichende Menge Eisen vorlag, um die erste Phase der Infektion zu ermöglichen. In Bezug auf die Proliferation in der Pflanze haben *fer2*-Deletionsmutanten dagegen einen deutlichen Nachteil gegenüber Wildtypstämmen. Sechs Tage nach der Infektion wurde eine starke Besiedlung des Pflanzengewebes durch Dikaryen der Wildtypstämme beobachtet, dagegen war die Proliferation von *Δfer2*-Mutanten retardiert. Auf mikroskopischer Ebene konnte gezeigt werden, dass *Δfer2*-Deletionsmutanten in der Entwicklung stark verlangsamt sind. Zwölf Tage nach der Infektion mit Wildtypstämmen wurde die Ausbildung von reifen, pigmentierten Teliosporen beobachtet. Dagegen zeigten *fer2*-Deletionsmutanten zum gleichen Zeitpunkt sehr viel weniger Zellmasse und eine gestörte Sporenentwicklung. In

Pflanzen, die mit *fer2*-Mutanten infiziert wurden konnten nur rundliche sporenartige Strukturen gefunden werden, die fast keine Pigmentierung zeigten und auch nicht ornamentiert waren. In mehreren unabhängigen Versuchen war es auch zu späteren Zeitpunkten nicht möglich reife Teliosporen zu ernten, was auf einen Block dieses Entwicklungsschritts hindeutet. Auf Grund der zentralen Rolle von Eisen als Kofaktor zahlreicher Schlüsselenzyme sind verschiedene Gründe für den beobachteten Entwicklungsdefekt vorstellbar. Die Verfügbarkeit von Eisen in der Wirtspflanze ist eine Voraussetzung zur Produktion radikaler Sauerstoffspezies zur Abwehr von Pathogenen. Es wäre daher denkbar, dass *Fer2* eine solche Abwehrantwort durch die Aufnahme von Eisen aus dem Pflanzengewebe unterbinden kann. In diesem Zusammenhang könnte auch die beobachtete Störung der Pigmentsynthese von *fer2*-Mutanten stehen. So wurde beispielsweise in *C. neoformans* die Bedeutung von Melanin zur Integrität der Zellwand aber auch zum Schutz vor freien Sauerstoffradikalen deutlich (Jacobson und Hong, 1997; Jacobson, 2000).

### 3.7.3 Modellvorstellung zur Eisenaufnahme in *U. maydis*

In Erweiterung zu den von Mei *et al.* (1993) gemachten Beobachtungen legen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen nahe, dass in *U. maydis* der reduktive Eisenaufnahmeweg während des Wachstums im Apoplasten dem nicht-reduktiven System übergeordnet ist. Es wäre denkbar, dass die beiden Systeme während des biotrophen Wachstums unterschiedlich reguliert werden. Ein solches Modell wird durch das in dieser Arbeit durchgeführte Experiment gestützt, indem gezeigt werden konnte, dass die *fer-2* Mutante durch die Zugabe von *U. maydis* Siderophoren komplementiert werden kann. Dies würde bedeuten, dass das Siderophorensystem, und damit das effizienteste Eisenaufnahmesystem (Winkelmann, 2002), während des biotrophen Wachstums von *U. maydis* nicht genutzt wird. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Expression der *sid*-Gene in der Pflanze zu untersuchen. Die Situation bezüglich der Verfügbarkeit von Eisen innerhalb der Pflanze ist noch wenig verstanden. Sicher ist jedoch, dass ein Großteil des pflanzlichen Eisenpools in der höheren Oxidationsstufe (+III) und überwiegend in Form von Phytochelaten stabilisiert vorliegt (Sparla *et al.*, 1999). Es wäre daher vorstellbar, dass von *U. maydis* zunächst  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird und auf diese Weise phytochelatiertes Eisen freigesetzt wird, das

dem hochaffinen Eisenaufnahmesystem zugeführt werden kann. Untersuchungen in Bakterien und Pilzen konnten verdeutlichen, dass Reduktasen an der Freisetzung von Siderophoren-komplexiertem Eisen beteiligt sind (Haas, 2003; Kosman, 2003; Matzanke *et al.*, 2004; Mazoch *et al.*, 2004). *U. maydis* ist der erste phytopathogene Pilz in dem gezeigt werden konnte, dass ein spezifisches reduktives Eisenaufnahmesystem einen Einfluss auf die pathogene Entwicklung hat. Die Situation ist dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* ähnlich, wo eine der zwei hochaffinen Eisenpermeasen, CaFTR2, eine essentielle Funktion während der pathogenen Entwicklung in Mäusen hat (Ramanan und Wang, 2000). In *C. albicans* gibt es jedoch keine Hinweise darauf, dass die hochaffinen Eisenpermeasen bzw. die Ferroxidase Eisenionen direkt aus Eisenkomplexen des Wirtsorganismus rekrutieren kann (Hu *et al.*, 2002). In diesem System wird die Möglichkeit diskutiert, dass das Siderophoren-System dem reduktiven Aufnahmesystem vorgeschaltet sein könnte. Nachdem in *U. maydis* die Produktion von Ferrichromen bei der pathogenen Entwicklung keine Rolle spielt (Mei *et al.*, 1993), ist es wahrscheinlich, dass Eisen entweder aus Phytochelaten oder als freies  $\text{Fe}^{3+}$  aufgenommen wird.

### 3.8 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass eine große Anzahl von Zielgenen durch die pathogenitätsbestimmenden Signalwege in *U. maydis* reguliert werden. Die identifizierten Targets bieten dabei vielfältige Ansatzpunkte für weitere Analysen auf molekularer und biochemischer Ebene. Am Beispiel der Eisengencluster ist deutlich geworden, dass durch Koregulation neue Gene identifiziert werden können, die eine funktionelle Verwandtschaft mit bereits bekannten Genen besitzen. In der untersuchten Gengruppe befinden sich unter anderem mehrere potentielle Gene der Siderophorenbiosynthese. Diese Gene können zukünftig für eine detaillierte Untersuchung des Biosynthesewegs eingesetzt werden. Interessant wäre auch, die Spezifität der Einzelmodule der beiden Siderophoren-Peptidsynthetasen zu untersuchen bzw. zu vergleichen. Darüber hinaus muss die Frage beantwortet werden, ob und in welcher Form *U. maydis* phytochelatiertes Eisen aus der Pflanze aufnehmen kann.

Durch die vergleichende Analyse der Transkriptome ist auch deutlich geworden, dass die verschiedenen Signalwege miteinander kooperieren. Um solche komplexen

Regulationsvorgänge besser zu verstehen, sind weitergehende Untersuchungen, die stark von der kompletten Annotation des Genoms abhängen, erforderlich. Da bei der Microarray-Analyse nur die erste Ebene der Expressionsregulation betrachtet wird, sollten in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse durch Analysen des *U. maydis* Proteoms erweitert werden. Hierzu können beispielsweise die in dieser Arbeit hergestellten Stämme HE121 und HE125 für differentielle Analysen des Proteinphosphorylierungsmusters nach Aktivierung der Signalkaskade eingesetzt werden. Durch solche Untersuchungen könnten vor allem posttranskriptionelle Regulationsmechanismen aufgeklärt werden, die bei einer Expressionsanalyse nicht gesehen werden können. Die Integration solcher Ergebnisse mit den aus der Transkriptomanalyse gewonnenen Daten könnte einen Beitrag zum Verständnis der komplexen Regulationsvorgänge leisten. Nicht zuletzt stellt die Annotation und Einordnung der Gene in funktionelle Kategorien eine wichtige zukünftige Aufgabe dar. Hieraus folgend könnten weitere verwandte Cluster identifiziert werden und damit auch die Funktion bislang unbekannter Gene aufgeklärt werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

#### 4.1.1.2 Chemikalien

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

#### 4.1.1.3 Puffer und Lösungen

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

#### 4.1.1.4 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien sowie YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989; Aasland *et al.*, 1995). Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

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

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

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

PD-Medium:

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

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

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

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974):

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

Eisenmangelmedium (Sundström, 1964)

Lösung A

20 g D-Glukose  
1,4 g L-Aparagin  
0,35 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,15 g KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O  
0,5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> x 10 H<sub>2</sub>O  
0,1 mg Thiamin  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und 10 min bei 124°C  
autoklaviert



Lösung B

0,1 g CaCl<sub>2</sub>  
 0,41 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
 5,41 g Natriumcitrat  
 5,31 g Citronensäure  
 4,43 g MnSO<sub>4</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
 4,05 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und 10 min bei 124°C  
 autoklaviert;  
 nach dem Autoklavieren von Lösung B werden 7,5 ml  
 zu 150 ml von Lösung A pipettiert

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

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

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

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

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

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

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

a) Top-Agar:  
 1,5% (w/v) Bacto-Agar  
 1 M Sorbitol  
 in YEPS<sub>L</sub>-Medium  
 b) Bottom-Agar:

wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum,  
 5-FOA in einer Konzentration von (500 µg/ml).

CM-CC aktivkohlehaltiges Vollmedium

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

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

PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium:

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

CM-Medium:

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

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

Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert bzw. der Agar auf Grund der Ansäuerung durch 5-FOA nicht mehr fest wird.

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

Alle Medien werden 2,5-fach konzentriert und ohne Kohlenstoffquelle hergestellt. Die Kohlenstoffquelle (10-fach konzentriert) und das destillierte Wasser werden getrennt autoklaviert und später, je nach Verwendung zu dem 2,5-fach konzentrierten Medium zugegeben. Für die Herstellung von Festmedium wird das entsprechende Medium mit 2 % Bacto-Agar versetzt (nach (Guthrie und Fink, 1991).

#### Dropout-Pulver:

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

#### Leu<sup>-</sup>-Synthetic-Complete (SC) -Pulver :

- 36,7 g Dropout-Pulver
- 2 g Histidin
- 2 g Uracil
- 2 g Tryptophan
- 0,5 g Adenin

#### Leu<sup>-</sup>-2x-SC-Medium (Guthrie und Fink , 1991)

- 5 g SC Leu SC-Medium

16,75 g Yeast Nitrogen Base (ohne aa)  
mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllten und 200ml Aliquote autoklavieren.

Für Leu<sup>-</sup>-Glukose- und Leu<sup>-</sup>-Galaktose-Festmedium wurden 250 ml Bacto-Agar (autoklaviert) in einer Endkonzentration von 2% zu 200 ml Leu<sup>-</sup>-2x-SC-Medium zugegeben sowie 50 ml einer 50% (w/v) Glukose-Lösung (sterilfiltriert) bzw. 50 ml einer 20% (w/v) Galaktose-Lösung (sterilfiltriert) zugesetzt.

#### YPD-Medium (Guthrie und Fink, 1991)

- 10 g Yeast Extract
- 20 g Pepton
- mit H<sub>2</sub>O auf 960 ml aufgefüllt
- nach dem Autoklavieren:
- 40 ml 50% (w/v) Glukose-Lösung zugesetzt (Endkonzentration 2%)

#### SD20/SD50-Medium (nach Ramanan und Wang 2000)

- Basierend auf jeweils 500 ml Leu<sup>-</sup>-Glukose- bzw. Leu<sup>-</sup>-Galaktose-Festmedium wurde bei der Herstellung zuerst 500 µl einer 1 M Ascorbat-Lösung (in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) zugesetzt, danach wurden 1 ml einer 1 M Ferrozine-Lösung (in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) zugegeben.
- SD20: Zugabe von 50 µl einer frisch angesetzten 200 mM FeCl<sub>3</sub>-Lösung (in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert)
- SD50: Zugabe von 50 µl einer frisch angesetzten 500 mM FeCl<sub>3</sub>-Lösung (in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert)

### **4.1.1.5 Enzyme**

Restriktionsenzyme und T4-RNA Ligase wurden von NEB Biolabs bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen Superscript Reverse Transkriptase (Gibco), *Taq* DNA-Polymerase (Laborpräparation) sowie *TaqPlus<sup>®</sup>Precision- Pfu*-DNA-Polymerase und *Herculase<sup>™</sup>* (Stratagene).

### **4.1.1.6 Verwendete Kits und sonstiges Material**

Weiterhin wurde das JETquick PCR-Purification-Kit (Genomed) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, das JETsorb Kit (Genomed) zur Elution von DNA-Fragmenten

aus Agarosegelen, das JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, das JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung verwendet. Das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (New England BioLabs) zur radio-aktiven Markierung von DNA-Fragmenten, Sequenzierung, Microspin S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden und Microspin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

#### 4.1.2 Oligonukleotide

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

##### **OHE1fwd**

TCC AGT GGG CTT GCA GTG

Liegt im 5'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE1rev**

CCC CTC CTC TAA CAC TCG

Liegt im 5'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE2fwd**

CGA CAT TGC AGG GCA TCG

Liegt im 5'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE2rev**

CTG TCC CGT TCC TGT CAC

Liegt im 5'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE3fwd**

CGA GAC TGG TTG CCA TGG

Liegt im 5'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE3rev**

GCT CAT CTG CTC AAC GCC

Liegt im 5'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE4fwd**

CGT ATA GAG AGG CCG ACC

Liegt im 5'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE4rev**

TTG TGG CTG TGC GAG TGG

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE5fwd**

CCA CAC TGT CAA GCC AGC

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE5rev**

CCC GAA GAT GTG CAC AGC

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE6fwd**

GTG CGA CGG TTG TCG AAG

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE6rev**

CAC GCC GAT ACC TGT AGC

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE7fwd**

CGC GAA GCT ACC AGA TCC

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE7rev**

GTC CTC GTC ACA TGT GGC

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE8fwd**

AGG CAA AGT CGG AAG ACG

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE8rev**

GCA GCG TCT GTC ATG ACC

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE9fwd**

GGA GTT GCA GCT CAG CCC

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

##### **OHE9rev**

GAA GTA CAC GGT CAT TCG

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

**OHE10fwd**

CGC TCA TCC CAC AGA TGC

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

**OHE10rev**

GCA GGA CGA TAC CGA AGG

Liegt im 3'-Flankenbereich des *p*-Locus.

**OHE34a**

CAC GGC CTG AGT GGC CGA CTG CAG ACG AGT

Liegt im *rpg1*-Locus und führt eine *Sfi*I-Schnittstelle ein.

**OHE34b**

CGT CCG ATC TTG CAG CG

Liegt im *rpg1*-Locus.

**OHE34c**

GTG GGC CAT CTA GGC CCC ATC GCC TGA CCT

Liegt im *rpg1*-Locus und führt eine *Sfi*I-Schnittstelle ein.

**OHE34d**

CAC TTT CAA CCA CCG CTG

Liegt im *rpg1*-Locus.

**OHE38**

TCG AGC TCG CAA TCC ACC

Liegt im *fuz7*-Locus.

**OHE39**

ATT CTT GAC CGG GAG TGC

Liegt im *fuz7*-Gen.

**OHE40**

GCC TCA CCT ACC TCT ACG

Liegt im *fuz7*-Gen; verwendet zum Nachweis des *fuz7DD*-Allels

**OHE41**

GTG TTG CAG CAG GTC GAG

Liegt im *fuz7*-Gen; verwendet zum Nachweis des *fuz7DD*-Allels.

**OHE42**

GAC CCG CTC TTG GTT TCG

Liegt im *p*-Locus und führt eine *Sfi*I-Schnittstelle ein.

**OHE43**

CAC GGC CTG AGT GGC CCA GGA CTG AAC GCT  
GTC G

Liegt im *p*-Locus.

**OHE44**

GTG GGC CAT CTA GGC CGT CTA GCT CGA ATG  
GCG G

Liegt im *p*-Locus und führt eine *Sfi*I-Schnittstelle ein.

**OHE45**

GCT TGT TGA ACC CGT CTG C

Liegt im *p*-Locus.

**OHE74**

CTC TCG TGT GCC ATA AAC GC

Liegt im *C5um12*-Locus.

**OHE75**

GGT GGC CGC GTT GGC CGT GTC CTT GGC AAA  
GGG AC

Liegt im *C5um12*-Locus und führt eine *Sfi*I-Schnittstelle ein.

**OHE76**

ATA GGC CTG AGT GGC CGC AGG ACG CAT TGA  
TCC G

Liegt im *C5um12*-Locus und führt eine *Sfi*I-Schnittstelle ein.

**OHE77**

GTG TCA AGT CGG AAG GTG G

Liegt im *C5um12*-Locus.

**OHE78**

GTC CCT GAT CCT AAC GAG C

Liegt im *C5um12*-Gen.

**OHE79**

GGT TGG CTC TGT TTG CTG G

Liegt im *C5um12*-Gen.

**OHE80**

CGA GAC TTG GTG CAT CTG C  
Liegt im *W51um130*-Locus.

**OHE81**

GGT GGC CGC GTT GGC CTG ATG CTG GTC GCA  
GAG C  
Liegt im *W51um130*-Locus und führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE82**

CGC TTC TGC AAC ACG AGG  
Liegt im *W51um130*-Locus.

**OHE83**

AGC TGG AAT GGC TCC GTG  
Liegt im *W51um130*-Locus.

**OHE84**

ATA GGC CTG AGT GGC CAC CAA GAG CAA GTC  
AGG CG  
Liegt im *W51um130*-Locus und führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE85**

CGC TCG GAC AAT TTG GCA G  
Liegt im *W51um130*-Locus.

**OHE86**

CCT GAG TTC GAG GAC AAG C  
Liegt im *C15um268*-Locus.

**OHE87**

GGT GGC CGC GTT GGC CTT TGC ATC CGG GTT  
CGT GG  
Liegt im *C15um268*-Locus und führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE88**

ATA GGC CTG AGT GGC CCC TAC ACT GCC TCC  
CAT C  
Liegt im *C15um268*-Locus und führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE89**

GTA CCC TAT GCT CTG CGC  
Liegt im *C15um268*-Locus.

**OHE90**

TCG CGG AAG AAC GGA ACG  
Liegt im *C15um268*-Locus.

**OHE91**

TGC GTA ACA GGC CCA ACG  
Liegt im *C15um268*-Locus.

**OHE92**

CAC GGC CTG AGT GGC CCA TAC CAG ACA TCG  
GCA GG  
Liegt im *W15um006*-Locus und führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE93**

GCC GTC TGA CCT TTG TCG  
Liegt im *W15um006*-Locus.

**OHE94**

TCG CCT CGC TCC TTT ACG  
Liegt im *W15um006*-Locus.

**OHE95**

TCG AGC CAG GAG AGT ACG  
Liegt im *W15um006*-Locus.

**OHE96**

GTG GGC CAT CTA GGC CGC TTT GAG CAA GCC  
GAT GC  
Liegt im *W15um006*-Locus und führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE97**

CGC ATG GAA GCT CTA TCT AGC  
Liegt im *W15um006*-Locus.

**OHE98**

CAC GGC CTG AGT GGC CCC ATC GTG GGA AAC  
TGT GC  
Liegt im *W50um220*-Locus führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE99**

CAC CTT GCC ATC TCT CTG G  
Liegt im *W50um220*-Locus.

**OHE100**

GCA TAC GTT TGC GCC TGC  
Liegt im *W50um220*-Locus.

**OHE101**

CGA CGT TGA ACG ACG TCC  
Liegt im *W50um220*-Locus.

**OHE102**

GTG GGC CAT CTA GGC CGG ACG TCG TTC AAC  
GTC G  
Liegt im *W50um220*-Locus führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE103**

CGA TGA GCG GAA CCG AG  
Liegt im *W50um220*-Locus.

**OHE104**

ATC GCA CAC TGC ACA CCG  
Liegt im *W60um241*-Locus.

**OHE105**

CAC GGC CTG AGT GGC CGG GAC GAG ATG TTG  
ACG G  
Liegt im *W60um241*-Locus und führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE106**

CGA GTC GCA ACA GAG GAC  
Liegt im *W60um241*-Locus.

**OHE107**

AAC GGC CTG ATA GAC GGC  
Liegt im *W60um241*-Locus.

**OHE108**

GTG GGC CAT CTA GGC CCG ATT GGA CCG CAT  
GAG C  
Liegt im *W60um241*-Locus und führt eine *SfiI*-  
Schnittstelle ein.

**OHE109**

GGC AGT TCG TGT GAA ACG G  
Liegt im *W60um241*-Locus.

**OHE131**

TTC TGC AGG GGC GAA AAT GGG CTT  
Liegt im *fer2*-Locus und führt eine *PstI*-  
Schnittstelle nach dem Stoppkodon ein.

**OHE132**

GAC TCG CTT ACC GAG TCT G  
Liegt im *fer2*-Gen.

**OHE133**

GAC TCG CTT ACC GAG TCT G  
Liegt im *fer2*-Gen.

**OHE134**

TAT CTA GAC CCG GGA ATG TCG GCA ACG GGC  
AAC  
Liegt im *fer2*-Locus und führt eine *XbaI*- und  
eine *SmaI*-Schnittstelle vor dem Startkodon ein.

**OHE-Umcos99-1**

CAG TCT GAG CGT CAA CGC  
Liegt im *rpg1*-Locus, u.a. zur Sequenzierung  
der *rpg1*-cDNA verwendetes Oligonukleotid.

**OHE-Umcos99-2**

CTG CGG CTA CCA GCG ACG  
Liegt im *rpg1*-Locus, u.a. zur Sequenzierung  
der *rpg1*-cDNA verwendetes Oligonukleotid.

**OHE-Umcos99-3**

GCA CAA CAC ACA AGC CGC  
Liegt im *rpg1*-Locus, u.a. zur Sequenzierung  
der *rpg1*-Mutanten-Allele verwendetes  
Oligonukleotid.

**OHE-Umcos99-4**

GGC TCT TGA TCA ACG GCG  
Liegt im *rpg1*-Locus, u.a. zur Sequenzierung  
der *rpg1*-Mutanten-Allele verwendetes  
Oligonukleotid.

Weitere Oligonukleotide:

**UNI24**

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG  
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt u. a. neben dem Polylinker von pCR2.1-TOPO, pCR4-TOPO.

**Rev24**

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC  
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt u. a. neben dem Polylinker von pCR2.1-TOPO, pCR4-TOPO.

**OGW55**

GTA CCG GTC TGT GCA CAC  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank, verwendet zur Sequenzierung von pHE-e7-1.

**OGW57**

TCT GAC CCT TCC GTT GCC  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank, verwendet zur Sequenzierung von pHE-e7-1.

**FL5**

GAC CTC CTA GGT ATC GGC  
Liegt im *sid1*-Gen.

**FL6**

GCG CGG AAG ATC ATG GTG  
Liegt im *sid1*-Gen.

**FL13**

CTC ACG ACT CGC TTA CCG  
Liegt im *fer2*-Gen.

**FL14**

GAG GGT TCA GCT TCT CCG  
Liegt im *fer2*-Gen.

**FL31**

CTC GCG GAA CAC TAT GCG  
Liegt im *fer5*-Gen.

**FL32**

CTG GGT GAT GCC GAA CAC  
Liegt im *fer5*-Gen.

**FL33**

GCG TGA TGC TGA CGC TTC  
Liegt im *fer7*-Gen.

**FL34**

GAT CGT GCG TTA CCT CCC  
Liegt im *fer7*-Gen.

**FL63**

GAG ACA CCA TGC AAG CCG  
Liegt im *fer4*-Gen.

**FL64**

CCC TGT GAG ACC GAT CTC  
Liegt im *fer4*-Gen.

**FL65**

GGG CGT CAA ATG GGC TCA G  
Liegt im *fer8*-Gen.

**FL66**

CGC TCG ATC GAT TCC CAG  
Liegt im *fer8*-Gen.

**FL67**

CGG ACA GAA CAT CGG GTG  
Liegt im *fer1*-Gen.

**FL68**

CCG TCC CCA AAT CTG GTC  
Liegt im *fer1*-Gen.

## 4.1.3 Stämme

### 4.1.3.1 *E. coli*-Stämme

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

Topo mit dem TOPO-TA Klonierungs-Kit (Invitrogen) wurde teilweise der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: F', *mcrA*,  $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ ,  $\Phi80lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta(ara\text{-}leu)7697$ , *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.

#### 4.1.3.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Für die Komplementationexperimente wurde der Hefestamm BY4741 $\Delta ftr1$  verwendet (Winzeler *et al.*, 1999) Dieser Stamm weist folgenden Genotyp auf :

*MATahis3 $\Delta$ 1leu2 $\Delta$ 0met15 $\Delta$ 0ura3 $\Delta$ 0ftr1::KanMXn.*

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

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



4.1.3.4 *U. maydis*-Stämme

Tabelle 5: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
521	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
SG200	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	Bölker <i>et al.</i> , 1995b
FB1 $\Delta$ uac1	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>uac1</i>	Hyg <sup>R</sup>	Krüger <i>et al.</i> , 1998
FB1 $\Delta$ ubc1	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>ubc1</i>	Nat <sup>R</sup>	Hartmann <i>et al.</i> , 1999
FB1 $\Delta$ pig4:GFP	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pig4:eGFP</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
FB2 $\Delta$ pig4:GFP	<i>a2 b2 <math>\Delta</math>pig4:eGFP</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
FB1 $\Delta$ pyr6 $\Delta$ pig4:pyr6	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
KHP#2	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
KHP#3	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
KHP#4	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
KHP#5	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
KHP#7	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
KHP#15	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
KHP#27	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
KHP#42	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>pyr6 <math>\Delta</math>pig4:pyr6</i>	Cbx <sup>R</sup>	K. Hansson, pers. Mitteilung
FB1kpp2WT	<i>a1 b1 kpp2WT</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 2003b
FB1kpp2AEF	<i>a1 b1 kpp2<sup>T182AY184F</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 2003b
AB81	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>kpp6</i>	Hyg <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2003
AB82	<i>a2 b2 <math>\Delta</math>kpp6</i>	Hyg <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2003
AB223	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>kpp6</i> <i>ip<sup>s</sup>[P<sub>otef</sub>:kpp6NA]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	Brachmann, 2001
AB224	<i>a2 b2 <math>\Delta</math>kpp6</i> <i>ip<sup>s</sup>[P<sub>otef</sub>:kpp6NA]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	Brachmann, 2001
FB1 $\Delta$ fer2	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>fer2</i>	Hyg <sup>R</sup>	Eichhorn <i>et al.</i> , 2004
FB2 $\Delta$ fer2	<i>a2 b2 <math>\Delta</math>fer2</i>	Hyg <sup>R</sup>	Eichhorn <i>et al.</i> , 2004
FB1fer2:eGFP	<i>a1 b1 P<sub>fer2</sub>:eGFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	Eichhorn <i>et al.</i> , 2004
FB2fer2:eGFP	<i>a2 b2 P<sub>fer2</sub>:eGFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	Eichhorn <i>et al.</i> , 2004

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
HE103	<i>a2 b2 Δrpg1</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2
HE105	<i>a1 b1 Δrpg1</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1
HE109	<i>a1 b1 ip<sup>r</sup>[npi1]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1
HE111	<i>a2 b2 ip<sup>r</sup>[npi1]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB2
HE114	<i>a1 b1 Δkpp6</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:kpp6<sup>T355AY357F</sup>]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	AB81
HE117	<i>a2 b2 Δkpp6 ip<sup>r</sup></i> <i>[P<sub>otef</sub>:kpp6<sup>T355AY357F</sup>]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	AB82
HE121	<i>a1 b1 kpp2WT fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DD</i>	Nat <sup>R</sup> Phleo <sup>R</sup>	FB1kpp2WT
HE122	<i>a1 b1 ip<sup>r</sup>[npi1]ip<sup>s</sup></i> <i>Δpig7-Δpig3</i>	Cbx <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	HE109
HE123	<i>a2 b2 ip<sup>r</sup>[npi1]ip<sup>s</sup></i> <i>Δpig7-Δpig3</i>	Cbx <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	HE111
HE125	<i>a2 b2 kpp2<sup>T182AY184F</sup></i> <i>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DD</i>	Nat <sup>R</sup> Phleo <sup>R</sup>	FB1kpp2AEF
HE127	<i>a1 b1 Δkpp6 ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:kpp6NA]ip<sup>s</sup></i> <i>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DD</i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup> Phleo <sup>R</sup>	AB223
HE131	<i>a1 b1 Δkpp6</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:kpp6<sup>T355AY357F</sup>]ip<sup>s</sup></i> <i>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DD</i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup> Phleo <sup>R</sup>	HE114
HE140	<i>a1 b1 ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:adr1]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1
HE142	<i>a1 b1 ΔW60um241</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1
HE146	<i>a2 b2 ΔW60um241</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2
HE150	<i>a1 b1 ΔW50um220</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1
HE155	<i>a2 b2 ΔW50um220</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2
HE160	<i>a1 b1 ΔW15um006</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1
HE165	<i>a2 b2 ΔW15um006</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2
HE170	<i>a1 b1 ΔC5um12:eGFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2
HE175	<i>a2 b2 ΔC5um12:eGFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1
HE176	<i>a1 b1 ΔC15um268:eGFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2
HE179	<i>a2 b2 ΔC15um268:eGFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1
HE182	<i>a1 b1 kpp2WT</i> <i>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DD Aprf</i>	Nat <sup>R</sup> Phleo <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	HE121
HE185	<i>a1 b1 kpp2<sup>T182AY184F</sup></i> <i>fuz7::P<sub>crg1</sub>:fuz7DD Aprf</i>	Nat <sup>R</sup> Phleo <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	HE125
HE187	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Afer2</i>	Phleo <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	SG200

#### 4.1.4 Herstellung und funktionelle Charakterisierung der Stämme HE114 und HE117, HE127 und HE131

Die Stämme HE114 (*a1b1Δkpp6ip<sup>r</sup>* [*P<sub>otef</sub>:kpp6<sup>T355AY357F</sup>]**ip<sup>s</sup>*) und HE117 (*a2b2Δkpp6ip<sup>r</sup>* [*P<sub>otef</sub>:kpp6<sup>T355AY357F</sup>]**ip<sup>s</sup>*) exprimieren das nicht-phosphorylierbare *kpp6<sup>AEF</sup>*-Allel unter der Kontrolle des *otef*-Promotors. Für die Herstellung wurde das Plasmid pPotef:kpp6AEF konstruiert und in den *ip*-Locus von AB81 (*a1b1Δkpp6*) und AB82 (*a2b2Δkpp6*) integriert. Homologe Integrationsereignisse wurden durch Southernanalyse bestätigt (nicht gezeigt). In anschließenden Pflanzeninfektionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Pflanzen die mit einer Mischung von HE114 und HE117 infiziert wurden, eine reduzierte Pathogenität aufwiesen. Bei 57 infizierten Pflanzen wurden in nur 16 % der Fälle kleine Blatttumore ausgebildet. In keiner Pflanze wurde eine Anthocyanbildung beobachtet. Als Kontrolle wurden Infektionen mit einer Mischung der Stämme AB223 und AB224 durchgeführt. Diese Stämme tragen, analog zu den zuvor beschriebenen Stämmen, das *kpp6*-Wildtyp-Allel unter der Kontrolle des *otef*-Promotors (Brachmann, 2001). Hierbei bildeten 73 % der Pflanzen Tumore aus. Bei fast allen der 53 infizierten Pflanzen wurde Anthocyanbildung beobachtet. Dieses Bild stimmt mit älteren Resultaten überein, die zeigten, dass Stämme die das *kpp6<sup>AEF</sup>*-Allel unter dem nativen Promotor exprimieren, einen vergleichbaren Pathogenitätsdefekt aufweisen (Brachmann *et al.*, 2003). Auf Grund dieser Beobachtung konnte der Stamm HE114 als Kontrolle bei der Transkriptomanalyse von *kpp6*-regulierten Genen eingesetzt werden. Um eine induzierbare Aktivierung von Kpp6 durch Fuz7DD zu ermöglichen, wurden die Stämme HE127 und HE131 hergestellt (vergleiche Kapitel 2.4). Hierzu wurde das

Plasmid pcrglfuz7DDhom in die Stämme AB223 und HE114 durch homologe Rekombination eingebracht. Homologe Integrationsereignisse wurden durch Southernanalysen bestätigt (nicht gezeigt).

#### 4.1.5 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Die Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft und alle inserierten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

##### 4.1.5.1 Ausgangsplasmide und Cosmide

###### Klonierungsvektoren

###### pTZ19R (Pharmacia)

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

###### pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen)

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

###### pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Produkte können mit *EcoRI* wieder ausgeschnitten werden. Das Plasmid trägt das bakterielle, Gyrase-hemmende Gen *ccdB* („control of cell death“) im Polylinker und erlaubt hierdurch eine Positivselektion.

## Spezielle Vektoren für das Arbeiten mit *U. maydis*

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

Dieses Plasmid enthält eine 1884 bp Hygromycin Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator flankiert.

### **pMF1-h** (Brachmann, 2004)

Dieses Plasmid enthält eine 2,7 kb Hygromycin Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator flankiert.

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

Dieses Plasmid enthält eine 2,4 kb Phleomycin-Resistenzkassette als *NotI*-Fragment.

### **pMF5-h** (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid enthält eine 3,7 kb eGFP-Hygromycin-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment. Das Konstrukt ist eine Weiterentwicklung von pMF3-h (Brachmann, 2004) und dient zur Herstellung translationaler eGFP-Fusionen. Hierbei wurde die „stromaufwärts“ liegende *SfiI*-Schnittstelle so modifiziert, dass ein „Alanin-Linker“- und kein Stoppkodon entsteht.

### **p123** (C. Aichinger, unveröffentlicht)

Integrativer *U. maydis* Vektor. Derivat von pSP72, enthält den das *egfp*-Gen unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors, den *nos*-Terminator am 3'-Ende des *egfp*-Gens sowie eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion in *U. maydis*.

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

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

### **pNEBUH** (Weinzierl, 2001)

Dieses Plasmid ist ein pNEB193-Derivat, enthält eine Hygromycinkassette sowie die UARS und kann somit frei repliziert werden.

### **pGE101** (Weinzierl, 2001)

Dieses Plasmid wurde zur gerichteten Klonierung von cDNA-Fragmenten, für die Konstruktion der freireplizierenden *U. maydis* cDNA-Genbank hergestellt. Es enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette sowie die UARS zur freien Replikation.

### **pRU11** (Brachmann, 2001)

Dieses Plasmid enthält das *eGFP*-Gen unter der Kontrolle des 3,5 kb-Fragments des *crgl*-Promotors und des *nos*-Terminators, sowie die Carboxin-Resistenzkassette.

### **pKH551** (K. Hansson, pers. Mitteilung)

Dieses pTZ19R-Derivat trägt ein 9 kb *BamHI*-Subklon aus dem Cosmid 21A2 welches den *npi1* Locus umfasst.

### **pMF35** (Kaffarnik *et al.*, 2003)

Dieses Plasmid wurde zur zur Genexpression von *adr1* in *E. coli* konstruiert. Das Plasmid trägt die vollständige kodierende Region des *adr1*-Gens. Am Translationsstart wurde eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt.

### **pBS-fuz7-5'** (P. Müller, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid ist ein pBS(+)-SKII-Derivat und trägt ein 1,7 kb großes *HindIII/BstBI*-Fragment aus pFuz7S (pHA42; A. Hartmann, unveröffentlicht) sowie ein 260 bp großes *HindIII/BstBI*-geschnittenes PCR-Fragment. Die beiden Fragmente umfassen den 5'-Bereich von *fuz7*; durch das PCR-Fragment wurde eine *NotI*-Schnittstelle vor dem Startkodon von *fuz7* eingeführt.

### **p123crg1fuz7DD** (Müller, 2003)

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>crg1</sub>:fuz7DD* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit zur

regulierbaren Expression von *fuz7DD*. Das Plasmid ist ein p123-Derivat und enthält ein 3,5 kb *NotI/NdeI*-Fragment aus pRU11 und ein 1,4 kb *NdeI/SphI*-Fragment aus pSL-tef1-*fuz7DD*. Somit wurde *fuz7DD* und 150 bp des 3'-Bereichs an den *crg1*-Promotor fusioniert.

**pkpp2WT-hom1** (P. Müller, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid ist ein pTZ19R-Derivat und ein Vorläuferkonstrukt für *pkpp2WT-hom*. Es enthält den 5'-Bereich von *kpp2* als 1,3 kb *HindIII/BglII*-Fragment, den 3'-Bereich des *kpp2*-ORFs als ein 0,6 kb *BglII/NotI*-Fragment aus p123kpp2 und den *mfa2*-Terminator als 0,4 kb *NotI/BamHI*-Fragment aus pGE101.

**pPotef:kpp6NA** (Brachmann, 2001)

Diese Plasmid dient der homologen Rekombination des *P<sub>otef</sub>:kpp6*-Allels in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit zur konstitutiven Expression von *kpp6NA*.

**pHAΔprf1-1** (Hartmann, 1997)

Hierbei handelt es sich um ein Plasmid zur Herstellung von *prf1*-Deletionsmutanten. Es enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette sowie Flankenbereiche, die teilweise im ORF von *prf1* liegen. Bei homologer Rekombination mit dem Plasmid wird ein Teil des *prf1*-ORFs durch die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Die Deletion umfasst den für die HMG-Domäne kodierende Bereich.

**pΔfer2** (Eichhorn *et al.*, 2004)

Dieses Plasmid dient zur Erzeugung von *fer2*-Deletionsstämmen. Das Plasmid enthält die PCR-amplifizierten Flankenbereiche des *fer2*-ORFs welche an eine 2,7 kb große Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF3-h ligiert wurden. Das so entstandene Konstrukt wurde in pCR4\_TOPO ligiert und als Marize zur PCR-Amplifikation des Deletionsskonstrukts mit den Primern FL1 und FL4 verwendet.

**P-7-1** (K. Hansson pers. Mitteilung)

Hierbei handelt es sich um ein Cosmid, das die Mutante KHP#7 komplementiert. Dieses Cosmid wurde aus der freireplizierenden *U. maydis* Cosmidgenbank (Weinzierl, 2001) isoliert und trägt ein ca. 30 kb großes genomisches *Sau3A1*-Fragment.

**P-42-3-1** (K. Hansson, pers. Mitteilung)

Hierbei handelt es sich um ein Cosmid welches die Mutante KHP#42 komplementiert. Dieses Cosmid wurde aus einer freireplizierenden *U. maydis* Cosmidgenbank (Weinzierl, 2001) isoliert wurde und trägt ein ca. 33 kb großes genomisches *Sau3A1*-Fragment.

**Freireplizierende cDNA-Bank** (Weinzierl, 2001)

Frei replizierende cDNA-Bank einer Kreuzung der Stämme FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium (für 12, 24 und 48 Stunden). Die Bank wurde in Anlehnung an das cDNA-Library-Kit von Clontech hergestellt.

**Plasmide für die Herstellung von Hybridisierungssonden**

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

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

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

Hierbei handelt es sich um pCR2.1-TOPO Derivat. Das Plasmid enthält ein 845 bp PCR-Fragment aus dem *pral*-Locus.

**ppp1** (Bohlmann, 1996)

Enthält ein Fragment aus dem *ppil*-Locus.

## Plasmide zur Genexpression in *S. cerevisiae*

### **YCplac111-G/T** (H. Ulrich, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid ist ein YCplac111 (Gietz und Sugino, 1988) Derivat. Es trägt eine Centromer-Region, das *LEU2*-Markergen, den *GAL1*-Promoter und den *ADHI*-Terminator. Es ermöglicht die Galaktose-regulierte Genexpression in *S. cerevisiae*.

### **pGAD-Ftr1** (T. Albert und H. Ulrich, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid ist ein Derivat des *Two-Hybrid*-Plasmids pGAD424 (Clontech). Es trägt den vollständigen kodierenden Bereich des *FTR1*-Gens aus *S. cerevisiae*.

## 4.1.5.2 In dieser Arbeit hergestellte und isolierte Plasmide und Cosmide

### Frei replizierende Plasmide

#### **pHE2**

Hierbei handelt es sich um ein Derivat des Cosmids P-42-3-1 welches die Mutante KHP#42 komplementiert. Für die Herstellung wurde ein 9,7 kb *SnaBI*-Fragment aus dem Cosmid P-42-3-1 deletiert. Das Fragment trägt den vollständigen *rpg1*-Locus.

#### **pHE3**

Hierbei handelt es sich um ein freireplizierendes pNEBUH-Derivat welches die Mutante KHP#42 komplementiert. Für die Herstellung wurde ein 14,4 kb *Acc651*-Fragment aus dem Cosmid P-42-3-1 in das *Acc651*-geöffnete pNEBUH-Plasmid ligiert. Das Fragment trägt den vollständigen *rpg1*-Locus.

#### **pHE-e7-1**

Hierbei handelt es sich um ein freireplizierendes cDNA-Expressionsplasmid welches die Mutante KHP#42 komplementiert. Das Plasmid wurde nach Komplementation der Mutante KHP#42 mit der freireplizierenden cDNA-Expressions-

bank (Weinzierl, 2001) reisoliert und sequenziert. Es enthält ein ca. 2 kb großes cDNA-Fragment, das den vollständigen kodierenden Bereich des *rpg1*-Gens umfasst. Darüber hinaus beinhaltet das Fragment einen 190 bp großen Bereich des 5'-untranslatierten Bereichs sowie einen 250 bp großen Bereich der 3'-untranslatierten Region von *rpg1*.

#### **pfer2**

Dieses Plasmid dient der Expression des *fer2* Gens aus *U. maydis* in *S. cerevisiae*. Für die Konstruktion wurde ein 1,5 kb großes cDNA-Fragment, welches den vollständigen kodierenden Bereich von *fer2* umfasst aus pfer2ORF als *XbaI/PstI*-Fragment ausgeschnitten und in das ebenso geöffnete Plasmid YCplac111-G/T ligiert. Damit erlaubt dieses Plasmid die Expression von *fer2* unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors.

#### **pFtr1**

Dieses Plasmid dient der Expression des *FTR1*-Gens in *S. cerevisiae*. Für die Konstruktion wurde ein 1,2 kb großes Fragment, welches den vollständigen offenen Leserahmen von *FTR1* trägt, aus pGAD-Ftr1 als *BamHI/SalI*-Fragment ausgeschnitten und in das ebenso geöffnete Plasmid YCplac111-G/T ligiert. Das Plasmid erlaubt die Expression von *FTR1* unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors.

### Hilfskonstrukte

#### **pfuz7DD-hom-Vorl**

Dieses Plasmid ist ein pTZ19R-Derivat und enthält das *P<sub>crg1</sub>:fuz7DD*-Allel zur regulierbaren Expression von *fuz7DD*. Darüber hinaus enthält das Plasmid den 5'- und 3'-Bereich von *fuz7*. Für die Konstruktion wurde eine Ligation folgenden vier Fragmenten durchgeführt: (1.) ein 2,9 kb großes *SphI/HindIII*-Fragment aus pTZ19R; (2.) ein 1,8 kb *HindIII/NotI*-Fragment aus pBS-fuz7-5', das den 5'-Bereich von *fuz7* umfasst; (3.) ein 2,9 kb *NotI/BstBI*-Fragment aus p123fuz7DD welches einen Teil des *crg1*-Promotors umfasst; (4.) ein 2,2 kb *BstBI/SphI*-Fragment aus p123fuz7DD welches einen Teil

des *crg1*-Promotors, den *fuz7DD* ORF sowie 150 bp des 3'-UTR-Bereichs umfasst.

#### **pC5um12-LB**

Ausgehend von genomischer DNA des *U. maydis* Stamms 521 wurde ein 1 kb großes PCR-Produkt aus dem *C5um12*-Locus amplifiziert. Hierzu wurden die Oligonukleotide OHE74 und OHE75 verwendet. Das Produkt umfasst einen Teil des 5'-kodierenden und einen Teil des 5'-UTR-Bereichs von *C5um12*. Das Produkt wurde in pCR4\_TOPO kloniert und durch Sequenzierung verifiziert.

#### **pC15um268-LB**

Ausgehend von genomischer DNA des *U. maydis* Stamms 521 wurde ein 1 kb großes PCR-Produkt aus dem *C15um268*-Locus amplifiziert. Hierzu wurden die Oligonukleotide OHE86 und OHE87 verwendet. Das Produkt umfasst einen Teil des 5'-kodierenden und einen Teil des 5'-UTR-Bereichs von *C15um268*. Das Produkt wurde in pCR4\_TOPO kloniert und durch Sequenzierung verifiziert.

#### **PW51um130-LB**

Ausgehend von genomischer DNA des *U. maydis* Stamms 521 wurde ein 1 kb großes PCR-Produkt aus dem *W51um130*-Locus amplifiziert. Hierzu wurden die Oligonukleotide OHE80 und OHE81 verwendet. Das Produkt umfasst einen Teil des 5'-kodierenden und einen Teil des 5'-UTR-Bereichs von *W51um130*. Das Produkt wurde in pCR4\_TOPO kloniert und durch Sequenzierung verifiziert.

#### **pfer2ORF**

Durch PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden OHE131 und OHE132, ausgehend von cDNA aus dem Stamm FB1 (*alb1*), wurde ein 1,5 kb großes Fragment erzeugt, die vollständige kodierende Region von *fer2* umfasst. Durch die Primer wurde eine *XbaI*-Schnittstelle vor dem Startkodon und eine *PstI*-Schnittstelle nach dem Stoppkodon eingeführt. Das PCR-Produkt wurde in pCR4-

TOPO kloniert und durch Sequenzierung überprüft.

#### **Plasmide für homologe Rekombination in *U. maydis***

##### **pΔrpg1**

Dieses Plasmid dient zur Erzeugung von Deletionsstämmen des *rpg1*-Gens. Für die Konstruktion wurden zunächst zwei, den *rpg1*-ORF flankierende Bereiche PCR-amplifiziert. Ausgehend von genomischer DNA des Stamms 521 wurde die 5'-UTR-Flanke mit den Oligonukleotiden OHE34a und OHE34b sowie die 3'-UTR-Flanke mit den Oligonukleotiden HE34c und OHE34d amplifiziert (hierbei wurden durch OHE34b und OHE34c *SfiI*-Schnittstellen eingeführt). Die so hergestellten Produkte wurden mit *SfiI* geschnitten, an die 1,9 kb *SfiI*-Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn ligiert und in pCR2.1\_TOPO inseriert. Das resultierende Plasmid diente als PCR-Matrize für die Vervielfältigung des Deletionskonstrukts mit den Primern OHE34a und OHE34d.

##### **pNPII**

Dieses Plasmid ist ein p123-Derivat und dient der homologen Rekombination von *npil* in den *ip*-Locus von *U. maydis*. Für die Herstellung dieses Konstrukts wurde ein 5,8 kb *SfbI/XbaI*-Fragment welches den *npil*-Locus enthält aus pKH551 ausgeschnitten. Anschließend wurden die überhängenden *SfbI*-Enden mit T4-Polymerase abgedaut und die überhängenden *XbaI*-Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Das so hergestellte Fragment wurde in das *PvuII/EcoRV* geöffneten p123 Plasmid kloniert.

##### **pΔpig7-Δpig3**

Dieses Plasmid dient zur Erzeugung von Deletionsstämmen bei denen zugleich alle Gene des *p*-Locus (*pig7-pig3*) deletiert werden. Für die Herstellung wurde 1 kb des 3'-flankierenden Bereichs von *pig7* mit den Oligonukleotiden OHE42 und OHE43 sowie 1 kb des 5'-flankierenden Bereiches von *pig3* mit den Oligonukleotiden OHE44 und OHE45 PCR-

amplifiziert und die Produkte mit *Sfi*I geschnitten (durch OHE43 und OHE44 wurden *Sfi*I-Schnittstellen eingeführt; als PCR-Matrize diente genomische DNA des *U. maydis* Stamms 521). Die so hergestellten Fragmente wurden die 1,9 kb große *Sfi*I Hygromycin-Resistenzkassette aus pBShhn ligiert. Das entstandene Konstrukt wurde in pCR4\_TOPO ligiert. Das so entstandene Plasmid wurde als Matrize zur PCR-Amplifikation des Deletionskonstrukts mit den Primern OHE42 und OHE45 verwendet.

#### **pCrg1fuz7DDhom**

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von  $P_{Crg1}:fuz7DD$  in den *fuz7*-Locus von *U. maydis* und damit zur regulierbaren Expression von *fuz7DD*. Das Plasmid wurde aus pfuz7DD-hom-Vorl hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid mit *Not*I geöffnet und mit einem 2,4 kb großen *Not*I-Fragment aus pNEB-Ble(+) ligiert welches die Phleomycin-Resistenzkassette trägt.

#### **pPotef:kpp6AEF**

Diese Plasmid dient der homologen Rekombination des  $P_{otef}:kpp6^{T355AY357F}$ -Allels in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit zur konstitutiven Expression von  $kpp6^{T355AY357F}$ . Für die Herstellung wurde das Plasmid pPotef:kpp6NA mit den Restriktions-enzymen *Nco*I/*Asc*I geöffnet und ein 1,7 kb *Nco*I/*Asc*I-Fragment aus pkpp6T355A,Y357F inseriert. Hierbei wurde der vollständige kodierende Bereich des *kpp6NA*-Wildtypparallels gegen den vollständigen kodierenden Bereich des  $kpp6^{T355AY357F}$ -Allels ausgetauscht.

#### **pHEcrg1:adr1**

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von  $P_{Crg1}:adr1$  in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit der Arabinose-regulierbaren Expression von *adr1*. Das Plasmid ist ein Derivat von pRU11. Für die Konstruktion wurden drei Fragmente ligiert: (1.) ein 7,7 kb *Nde*I/*Xho*I-Fragment aus pRU11 welches die Carboxin-Resistenzkassette und das *crg1*-

Promotor Fragment umfasst; (2.) ein 1,1 kb *Nde*I/*Xho*I-Fragment aus pMF35, welches den 5'-kodierenden Bereich des *adr1*-Gens enthält und (3.) ein 420 bp *Xho*I/*Eco*RI-Fragment aus pMF35, das den 3'-kodierenden Bereich von *adr1* sowie einen Teil der 3'-UTR umfasst.

#### **pΔC5um12:eGFP**

Dieses Plasmid dient zur Erzeugung von *C5um12* Deletionsstämmen. Zugleich wurde das *eGFP*-Gen an einen kurzen, verbleibenden Bereich des ORFs fusioniert. Hierzu wurden ein 1 kb *Sfi*I-Fragment aus pC5um12-LB sowie ein 1 kb PCR-Produkt, welches mit den Oligonukleotiden OHE76 und OHE77 amplifiziert wurde, an die 3,7 kb *Sfi*I Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF5-h ligiert und in pCR4\_TOPO inseriert (durch OHE76 wurde eine *Sfi*I-Schnittstelle eingeführt; als PCR-Matrize diente genomische DNA des *U. maydis* Stamms 521). Für die Transformation in *U. maydis* zur homologen Rekombination wurde das Plasmid mit *Ssp*I linearisiert.

#### **pΔW51um130:eGFP**

Dieses Plasmid dient zur Erzeugung von Deletions-stämmen *W51um130*. Zugleich wurde das *eGFP*-Gen an einen kurzen, verbleibenden Bereich des ORFs fusioniert. Hierzu wurden ein 1 kb *Sfi*I-Fragment aus pW51um130-LB sowie ein 1 kb PCR-Produkt, welches mit den Oligonukleotiden OHE84 und OHE85 amplifiziert wurde, an die 3,7 kb *Sfi*I Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF5-h ligiert und in pCR4\_TOPO inseriert (durch OHE84 wurde eine *Sfi*I-Schnittstelle eingeführt; als PCR-Matrize diente genomische DNA des *U. maydis* Stamms 521). Für die Transformation in *U. maydis* zur homologen Rekombination wurde das Plasmid mit *Ssp*I linearisiert.

#### **pΔC15um268:eGFP**

Dieses Plasmid dient zur Erzeugung von Deletionsstämmen C15um268. Zugleich wurde das *eGFP*-Gen an einen kurzen, verbleibenden Bereich des ORFs fusioniert. Hierzu wurden ein 1 kb *Sfi*I-Fragment aus pC15um268-LB sowie



ein 1 kb PCR-Produkt, welches mit den Oligonukleotiden OHE88 und OHE89 amplifiziert wurde, an die 3,7 kb *SfiI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF5-h ligiert und in pCR4\_TOPO inseriert (durch OHE88 wurde eine *SfiI*-Schnittstelle eingeführt; als PCR-Matrize wurde genomische DNA des *U. maydis* Stamms 521 verwendet). Für die Transformation in *U. maydis* zur homologen Rekombination wurde das Plasmid mit *XmnI* linearisiert.

#### **pΔW15um006-1**

Dieses Plasmid dient der Erzeugung von Stämmen bei denen ein Teil des Gens *W15um006* deletiert wurde, welcher für eine putative DNA-Bindedomäne kodiert. Für die Herstellung wurden ca. 1 kb große Flanken-Fragmente mit den Oligonukleotiden OHE93 und OHE92 sowie den Oligonukleotiden OHE96 und OHE97 PCR-amplifiziert und die Produkte mit *SfiI* geschnitten (durch OHE92 und OHE96 wurden *SfiI*-Schnittstellen eingeführt; als PCR-Matrize diente genomische DNA des *U. maydis* Stamms 521). Die so hergestellten Fragmente wurden mit der 2,7 kb *SfiI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF3-h ligiert und in pCR4\_TOPO inseriert. Das so entstandene Plasmid diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des Deletionsskonstrukts mit den Primern OHE93 und OHE97.

#### **pΔW50um220**

Dieses Plasmid dient der Erzeugung von Stämmen bei denen ein Teil des Gens *W50um220* deletiert wurde, welcher für eine putative RFX-DNA-Bindedomäne kodiert. Für die Herstellung wurden ca. 1 kb große Flanken-Fragmente mit den Oligonukleotiden OHE99 und OHE98 sowie den Oligonukleotiden OHE102 und OHE103 PCR-amplifiziert und die Produkte mit *SfiI* geschnitten (durch OHE98 und OHE102 wurden *SfiI*-Schnittstellen eingeführt; als PCR-Matrize diente genomische DNA des *U. maydis* Stamms 521). Die so hergestellten Fragmente wurden mit der 2,7 kb *SfiI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF3-h ligiert und in pCR4\_TOPO inseriert. Das so entstandene Plasmid diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des Deletionsskonstrukts mit den Primern OHE99 und OHE103.

#### **pΔW60um241-1**

Dieses Plasmid dient der Erzeugung von Stämmen bei denen ein Teil des Gens *W60um241* deletiert wurde, der für eine putative Forkhead-DNA-Bindedomäne kodiert. Für die Herstellung wurden ca. 1 kb große Flanken-Fragmente mit den Oligonukleotiden OHE104 und OHE105 sowie den Oligonukleotiden OHE108 und OHE109 PCR-amplifiziert und die Produkte mit *SfiI* geschnitten (durch OHE105 und OHE108 wurden *SfiI*-Schnittstellen eingeführt; als PCR-Matrize diente genomische DNA des *U. maydis* Stamms 521). Die so hergestellten Fragmente wurden mit der 2,7 kb *SfiI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF1-h ligiert und in pCR4\_TOPO inseriert. Das so entstandene Plasmid diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des Deletionsskonstrukts mit den Primern OHE104 und OHE109.

## 4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 *Escherichia coli*

#### 4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

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

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

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

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

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

abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

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

RF1-Lösung:

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

RF2-Lösung:

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

## 4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

### 4.2.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

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

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

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 2,5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

### 4.2.2.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Dieses Protokoll ist geringfügig modifiziert nach Guthrie und Fink (1991). Von einer Einzelkolonie ausgehend, wurden 40 ml einer Hefekultur in YPD-Medium bei 28°C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Greiner-Röhrchen, bei 3000 Upm in einer Heraeus-Zentrifuge, bei RT pelletiert. Die Zellen wurden mit 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gewaschen, anschließend in 1100 µl LiT-Lösung aufgenommen und zu 100 µl in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Zu den so hergestellten Zellen wurde 5 µl frisch aufgekochte Herings/Lachs-Sperma-DNA 0,1-1 µg Plasmid-DNA sowie 500 µl

Lithiumacetat/PEG zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Danach werden die Suspensionen mit 50 µl DMSO versetzt und bei 42°C ein 15-minütiger Hitzeschock durchgeführt. Die Zellen werden 30 Sekunden bei 3000 Upm pelletiert und der Überstand abgenommen, in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> aufgenommen und auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen.

LiT-Lösung:

100 mM Lithiumacetat  
10 mM Tris-HCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>, sterilfiltriert

Lithiumacetat/PEG:

10 g Polyethylenglycol 3350 in 10 ml LiT-Lösung sterilfiltriert

Herings/Lachs-Sperma-DNA:

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

## 4.2.3 *Ustilago maydis*

### 4.2.3.1 Kultivierung von *U. maydis*

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

### 4.2.3.2 Induktion von Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in CM-Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *crGI*-Promotors Glukose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu OD<sub>600</sub> ≈ 0,4 bei 28°C und 200 Upm

inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen über einen 500 ml Steritop-Sterilfilter (Millipore) abgesaugt. Die Zellen wurden daraufhin im Steritop-Sterilfilter resuspendiert, abgesaugt und mit einem weiteren Volumen Induktionsmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen (im ursprünglichen Volumen) in Induktionsmedium aufgenommen (im Fall des *crg1*-Promotors Galaktose als einzige Kohlenstoffquelle). Alle Schritte wurden mit auf 28°C vortemperiertem Induktionsmedium durchgeführt. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit geschüttelt. Für die Probenahme wurden 20-40 ml der jeweiligen Kultur in 50 ml-Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert (3.000 Upm, 3 min, 28°C, Heraeus Multifuge 4 KR). Der Überstand wurde abgenommen und die Probe sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

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

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

#### 4.2.3.4 Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS<sub>L</sub>-Medium verdünnt und bei 29°C bis zu einer Zelldichte von 1-2 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml (bis maximal OD<sub>600</sub> = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch

Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10 minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

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

SCS:

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

STC:

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

STC/PEG:

- 15 ml STC
- 10 g PEG4000

#### 4.2.3.5 Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum

*U. maydis*-Stämme wurden von Platte in CM-Glukose-Flüssigmedium inokuliert. Bei 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 7 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD<sub>600</sub> = 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurde gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von jedem Ansatz wurden 5 µl auf eine PD-Charcoal-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 h bei 22°C unter Luftabschluss inkubiert. Anschließend wurde der Kreuzungsversuch anhand der Filamentbildung aus-gewertet.

#### 4.2.3.6 Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu untersuchenden Stämme wurden in CM-Glukose-Flüssigmedium bei 28°C mit 200 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,4 geschüttelt. Jeweils 1 ml Kultur wurde in 15 ml PPN Zentrifugenröhrchen (Greiner) pelletiert (3.000 Upm, 3 min, 28°C, Heraeus Multifuge 4 KR). und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in 1 ml CM-Glukose-Flüssigmedium, dem zuvor kompatibles Pheromon (Endkonzentration 2,5 µg/ml) oder DMSO (Kontrolle) zugesetzt worden war, resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in den PPN-Röhrchen auf einem Drehrad-Inkubator bei ca. 20 Upm, in nahezu waagrecht Position bei 28°C inkubiert.

Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bildung von Konjugationshyphen mikroskopisch untersucht. Für die Arrayexperimente wurden größere Volumina von Zellen mit Pheromon stimuliert, hierzu wurden sterile 200 ml PP-Röhrchen (NUNC) verwendet.

#### 4.2.3.7 Test auf Pathogenität

Der verwendete Pathogenitätstest ist eine Spritzinfektion, bei der 200-500 µl einer Pilzsuspension (in Wasser, OD<sub>600</sub> = 1,5) in das Innere des Blattwirtels von 7 Tage alten Maispflanzen der Sorte Golden Bantam gespritzt werden. Die Stämme wurden vorher über Nacht in YEPS-Flüssigkultur zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 angezogen. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3500 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet und in Wasser OD<sub>600</sub> = 1,5 aufgenommen. Etwa 10-14 Tage nach der Infektion wurden die Sporen lichtmikroskopisch untersucht.

#### 4.2.3.8 Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5%igen CuSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf YEPS<sub>L</sub>-Platten ausplattiert, denen Chloramphenicol, Kanamycin und Tetracyclin zugesetzt war, um bakterielle Kontaminationen zu entfernen. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden zweimal vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6b (*a1 b2*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt. Als Schnelltest zum Nachweis für erfolgreiche Meiose können die aus einer Spore entstandenen Kolonien auch direkt auf PD-Aktivkohle Festmedium vereinzelt werden. Bereiche mit hoher Koloniedichte müssen

filamentös erscheinen, dicht nebeneinander liegende Kolonien in der Hälfte der Fälle an der Kontaktstelle Filamentbildung zeigen, in der anderen Hälfte der Fälle dagegen nicht, und einzeln liegende Kolonien müssen eine glatte Koloniemorphologie aufweisen.

#### 4.2.3.9 Test auf filamentöses Wachstum auf der Maispflanze

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

Lichtmikroskopie Hintergrundfluoreszenz auftreten kann. Anschließend wurden mit einer Rasierklinge händisch Querschnitte des entnommenen Blattstückes angefertigt und für die Analyse Stellen ausgewählt, die etwa 3 bis 6 Zellschichten dick waren.

#### 4.2.3.10 Mikroskopie und Bildbearbeitung

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

### 4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z. B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989) sind in (Brachmann, 1995) ausführlicher beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht OD<sub>260</sub> = 1 einer

Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub>. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen

oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

### 4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren und Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach (Sambrook *et al.*, 1989). 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 200 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
8% (w/v) Saccharose  
5% (v/v) Triton X-100  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym  
10 mM Tris-Cl, pH 8,0  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

#### 4.3.1.1 DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach (Hoffman und Winston, 1987). Es wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium zusammen mit ca. 0,3 g Glasperlen (150-212 microns; Sigma), in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 µl der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Resuspendiert wurde 15 min bei 50°C. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

*Ustilago*-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
1% (w/v) SDS  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

TE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

#### 4.3.1.2 Reisolierung von in *U. maydis* Zellen freireplizierenden Plasmiden

Bei der in Abschnitt 4.2.3.4 beschriebenen Methode der Transformation mit freireplizierenden Plasmiden wird das zirkuläre Plasmid in die Zelle gebracht, es kann aber auch wieder leicht reisoliert werden. Im Fall der Analyse der komplementierten UV-Mutante KHP#42 wurde dazu genomische DNA nach der oben beschriebenen Methode isoliert, dialysiert und schließlich mittels Elektroporation in *E. coli*

DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Die erhaltenen Transformanten enthielten das ursprüngliche Plasmid.

#### 4.3.1.3 RNA-Isolierung aus Flüssigkulturen

RNA-Isolierung mit dem TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). Diese Methode dient zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die in Flüssigmedium gewachsen waren oder aus Pflanzentumormaterial. Dazu wurde das tiefgefrorene Zellpellet aus Flüssigkultur bzw. das mit Hilfe einer Schwingmühle, zu einem feinen Pulver gemahlene, zuvor in flüssigem Stickstoff eingefrorene Tumormaterial in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent resuspendiert, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und ca. 0,3 g Glasperlen (150-212 microns; Sigma) zugegeben. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer Schwingmühle (MM200; Retsch) aufgeschlossen (5 min bei maximaler Geschwindigkeit; es wurden Kunststoffeinsätze verwendet, in die fünf der 2 ml-Reaktionsgefäße eingespannt werden konnten).

Anschließend wurden die Proben mit 200  $\mu$ l Chloroform versetzt, gut gemischt und 15 min bei 4°C und 11000 Upm zentrifugiert (Biofuge; Heraeus). Danach wurden 500  $\mu$ l der wässrigen Phase in ein neues, RNase-freies Reaktionsgefäß überführt, 500  $\mu$ l 2-Propanol zugegeben und die RNA 10 min bei RT gefällt. Die RNA wurde anschließend pelletiert (10 min, 11000 Upm, RT) und mit 500  $\mu$ l Ethanol (70%) gewaschen. Nach dem Trocknen (20 min bei RT) wurde die RNA in 50  $\mu$ l Wasser (RNase-frei; Ambion), für 10 min, bei 55°C gelöst und bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 1  $\mu$ l auf einem 1%igen TBE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260 nm gemessen.

### 4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäure

#### 4.3.2.1 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht werden. Diese Methode hat gegenüber der häufig verwendeten Formamid bzw. Formaldehyd-Denaturierung den Vorteil, bei der Gel-elektrophorese eine deutlich bessere Auftrennung der Fragmente zu bieten. Die RNA-Probe (5-15  $\mu$ g) wurde dazu in 16  $\mu$ l MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50% DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4  $\mu$ l RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1% MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde alle 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. In der Regel wurden mehrere parallele Auftrennungen gleichzeitig durchgeführt.

MOPS-Puffer:

200 mM MOPS, pH 7,0  
80 mM Na-Acetat  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

RNA-Auftragspuffer:

50% (w/v) Saccharose  
0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylencyanol FF  
in MOPS-Puffer

#### 4.3.2.2 Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach (Southern, 1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M



NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 30 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 3 h.

#### 4.3.2.3 Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC über Nacht. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (302 nm, 120 mJ/cm<sup>2</sup>) kovalent mit der Membran verknüpft. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylenblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

20x SSC:

300 mM Na-Citrat, pH 7,0  
3 M NaCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### 4.3.2.4 Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die Hybond-N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10<sup>6</sup> cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven Schirme der Kassetten im Phosphorimager eingelese und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

Hybridisierungspuffer:

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
50 mM PIPES  
100 mM NaCl  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
5% (w/v) SDS  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Waschpuffer:

1x SSC  
0,1% (w/v) SDS  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### 4.3.2.5 Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern-Analysen

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP hergestellt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Bei durch PCR-Amplifikation hergestellten DNA-Fragmenten

wurde von DNA der *U. maydis* Stämme FB1 oder 521 ausgegangen.

Hierbei verwendete DNA-Fragmente:

*pig7*:

ein 400 bp *KpnI/NarI*-Fragment, ausgeschnitten aus dem PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden OHE1fwd und OHE1rev amplifiziert wurde.

*np14*:

ein 1,8 kb PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden OHE3fwd und OHE4rev amplifiziert wurde.

*mfal*:

ein 675 bp *EcoRV*-Fragment aus pSP4,2EcoRV

*pral*:

ein 845 bp PCR-Fragment aus pCR-Sma

*ppi*:

ein 110 bp *SalI/PstI*-Fragment aus pppi1

*adr1*:

ein 1,2 kb *NcoI/XhoI*-Fragment aus pMF35

*fer1*:

ein 1 kb PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden FL67 und FL68 amplifiziert wurde.

*fer2*:

ein 550 bp PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden FL13 und FL14 amplifiziert wurde.

*fer4*:

ein 650 bp PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden FL61 und FL62 amplifiziert wurde.

*fer5*:

ein 650 bp PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden FL63 und FL64 amplifiziert wurde.

*fer6*:

ein 1 kb PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden FL31 und FL32 amplifiziert wurde.

*fer7*:

ein 1 kb PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden FL33 und FL34 amplifiziert wurde.

*fer8*:

ein 800 bp PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden FL65 und FL66 amplifiziert wurde.

*sid1*:

ein 800 bp PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden FL5 und FL6 amplifiziert wurde.

### 4.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse

#### 4.3.3.1 Sequenzierung von DNA

Die DNA wurde vor der Sequenzierung mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt und entweder mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert oder zur Durchführung der Sequenzierung an die Abteilung „ADIS“ des Max Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln geschickt.

Bei der Sequenzreaktion mit ABI 377 Sequenzierautomat wurde mit 35 Zyklen und

unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach (Sanger *et al.*, 1977): In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die

Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert werden. Rohdaten extern sequenzierter DNA wurden mit dem Programm Sequencher auf einem Apple Macintosh ausgewertet.

#### 4.3.3.2 Sequenz- und Strukturanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

**SequenceNavigator 1.0.1** (ABI) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

**Sequencher 4.1.2** (Gene Codes Corporation) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; zum Zeichnen von genetischen Karten.

**Clonemanager 6** (Sci Ed Central) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; zum Zeichnen von genetischen Karten.

**DNA-Strider 1.3** (Marck, 1988; Douglas, 1995) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.

**Blast 2** (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

**Smart** (Schultz *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

**Pfam** (Sonnhammer *et al.*, 1998; Bateman *et al.*, 2002; Bateman, 2004) zur Identifikation konservierter Motive in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

**Psort 2** (Nakai und Kanehisa, 1992; Nakai und Horton, 1999) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

**ClustalW** und **ClustalX** (Thompson *et al.*, 1994; Eddy, 1995; Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

**Genedoc 2..5.000** (Nicholas, 1997) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments.

**SeqVu 1.0.1** (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments.

#### 4.3.4 PCR-Techniken

##### 4.3.4.1 Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach (Innis *et al.*, 1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M, dNTPs in einer Endkonzentration von 200  $\mu$ M (d. h. je 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig

wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit einem „Hot-Start“ durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

Denaturierung bei 94°C für 2 min, Zugabe von 1 U *Taq* DNA-Polymerase ("Hot-Start"), Denaturierung bei 94°C für 1 min, 30 Zyklen

mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 65°C und 1,5 min Elongation bei 72°C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 5 min bei 72°C. Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate mussten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Bei schwierigen Ansätzen wurde außerdem die Konzentration der Mg<sup>2+</sup>-Ionen optimiert (die wichtigsten Parameter einer PCR-Reaktion sind die Temperatur, bei der die Oligonukleotide binden und die Konzentration von Mg<sup>2+</sup>-Ionen). PCR-Ansätze mit *Pfu* DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer. Es wurden die PCR-Geräte PTC-100 (MJ Research), PTC-200 (MJ Research) und Robocycler Gradient96 (Stratagene) verwendet.

PCR-Puffer (*Taq* DNA-Polymerase):

- 10 mM Tris-Cl, pH 8,3
- 50 mM KCl
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

PCR-Puffer (*Pfu* DNA-Polymerase):

- 20 mM Tris-Cl, pH 8,8
- 10 mM KCl
- 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 2 mM MgSO<sub>4</sub>
- 1% (v/v) Triton X-100
- 1 mg/ml BSA
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### 4.3.4.2 Ganz-Zell-PCR aus *E. coli*-Zellen

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *E. coli*-Zellen durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert und davon jeweils 1,5 µl zu einem 50 µl Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10 min), um ein Platzen der *E. coli*-Zellen zu erreichen. Für den

Nachweis der Insertion von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR-Topo wurden die Oligonukleotide UNI24 und REV24.

#### 4.3.4.3 Ganz-Zell-PCR aus *U. maydis*-Zellen

Dieselbe Technik kann man ebenfalls zur Untersuchung von *U. maydis*-Transformanten einsetzen. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanten erwiesen. Es sind jedoch einige Punkte zu beachten: (1) Das Zellmaterial sollte frisch sein, idealerweise als drei Tage alte Kolonie von einer PD-Platte. (2) Es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden, idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm. (3) Die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und nicht immer reproduzierbar, die Amplifikatlängen sollten daher zwischen 200 und 500 bp liegen. (4) Die Elongationszeiten müssen für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden. (5) Es kommt immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen. Aus diesem Grund wurden diese Analysen so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen Transformation kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Mit allen Klonen, die im Ansatz kein Amplifikat zeigten, wurde weitergearbeitet. Durch diese Vorgehensweise gehen potentiell richtige Transformanten, bei denen die PCR-Reaktion nicht funktioniert hat, nicht verloren. Die Ansätze wurden genauso durchgeführt wie im Fall der Ganz-Zell-PCR in *E. coli*. In der Regel wurden zwei bis drei PCR-Runden durchgeführt, wobei nach der Analyse die potentiell richtigen Klone jedes Mal wieder aus den Zellsuspensionen heraus auf PD-Platten neu vereinzelt wurden. Abschließend wurden die Transformanten durch Southern-Analyse bestätigt.

Es wurden folgende Kombinationen an Oligonukleotiden eingesetzt:

**ip-Locus:** OAN74/OAN75  
OAN74/OAN76  
OAN77/OAN78

**fuz7-Locus:** OHE38/OHE39

**C5um12-Locus:** OHE78/OHE79

**C15um268-Locus:**  
OHE90/OHE91

**W15um006-Locus:**  
OHE94/OHE95

**W50um220-Locus:**  
OHE100/OHE101

**W60um241-Locus:**  
OHE106/OHE107

**fer2-Locus:** OHE132/OHE133

## 4.4 Genomweite Expressionsanalyse von *U. maydis*

### 4.4.1 Herstellung der „Microarray-Targets“

Soweit nicht folgend beschrieben wurde bei der Herstellung der „Microarray-Targets“ dem *Gene-Chip Expression Analysis* -Protokoll der Firma Affymetrix gefolgt.

#### 4.4.1.1 Aufreinigung und Qualitätsüberprüfung von RNA

Für die Synthese von cDNA wurde zunächst Gesamt RNA mit dem TRIZOL<sup>®</sup> Reagent isoliert (siehe 4.3.1.3). Im Anschluß daran wurde die Konzentration photometrisch bei 260 nm im (Ultrospec 3000 pro, UV-Spektrometer; Amersham) abgeschätzt. Um die Qualität der RNA-Probe zu untersuchen wurde jeweils 1 µl mit Hilfe eines Bioanalysers 2100 (Agilent) auf einem RNA 6000 LabChip kapillargel-elektrophoretisch aufgetrennt.

Danach wurden 60 µg der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Zugleich wurde die RNA hierbei 15 min mit DNase behandelt. Der DNase-Verdau wurde auf der Säule mit Hilfe des RNase-Free DNase Set (Qiagen) durchgeführt. Danach wurde die

Qualität der RNA-Probe mit Hilfe eines Bioanalysers 2100 (Agilent) untersucht.

#### 4.4.1.2 Herstellung und Qualitätskontrolle von cDNA

Zur Herstellung von cDNA wurden jeweils 5-10 µg der aufgereinigten Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Synthese wurde das Superscript Choice System (Invitrogen) verwendet. Bei der Erststrangsynthese wurde das GeneChip<sup>®</sup> T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit (Affymetrix) eingesetzt. Die reverse Transkription wurde eine Stunde bei 50°C durchgeführt. Nach der Zweitstrangsynthese wurde die cDNA mit dem GeneChip Sample Cleanup Module (Qiagen) aufgereinigt und die Qualität der Proben mit Hilfe des Bioanalysers 2100 (Agilent) überprüft. Hierzu wurden 2,5 µl der cDNA auf einem DNA 7500 LabChip gemessen.

#### 4.4.1.3 cRNA-Synthese und Fragmentierung

Zur *in vitro* Transkription von cDNA und dem gleichzeitigen Einbau von biotinylierten Ribonukleotiden wurde das BioArray<sup>™</sup> HighYields<sup>™</sup> RNA Transcript Labeling Kit (ENZO) verwendet. In die Reaktion wurden

jeweils 5 µl der aufgereinigten cDNA eingesetzt. Nach der Synthese wurde die cRNA mit Hilfe des GeneChip Sample Cleanup Module (Qiagen) aufgereinigt. Im Anschluß daran wurde die Konzentration photometrisch bei 260 nm im (Ultrospec 3000 pro, UV-Spektrometer; Amersham) gemessen und die Qualität überprüft. Hierzu wurde jeweils 1 µl der cRNA mit Hilfe eines Bioanalisers 2100 auf einem RNA 6000 LabChip aufgetrennt (Agilent). Danach wurde jeweils 20 µg der cRNA-Proben in ca. 35-200 bp große Stücke fragmentiert (GeneChip Sample Cleanup Module, Qiagen). Anschließend wurde überprüft, ob die Proben vollständig fragmentiert waren: Jeweils 1 µl der Probe mit einem Bioanalyser 2100 auf einem RNA 6000 LabChip aufgetrennt (Agilent). Die Konzentration der fragmentierten cRNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die so hergestellten „Targets“ wurden mit den Mikroarrays hybridisiert.

#### 4.4.1.4 Array-Hybridisierung und Datenanalyse

##### Hybridisierung

Bei der Hybridisierung wurden 15 µg der fragmentierten cRNA nach den Angaben des *GeneChip Expression Analysis*-Protokoll für eukaryotische Target-Hybridisierung der Firma Affymetrix mit dem „MPI-UstilagoA“-Array für 16 Stunden hybridisiert. Anschließend wurde zur „Fluoreszenzfärbung“ der hybridisierten cRNA-Fragmente das EukGeWS2 Protokoll auf der GeneChip Fluidics Station 400 abgearbeitet (Affymetrix). Bei diesem Protokoll wird zunächst das überschüssige, ungebundene Target durch zahlreiche Einzelschritte abgewaschen. Anschließend werden die an den Microarray gebundenen cRNA-Fragmente über die Biotinreste mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert.

##### Datenanalyse

Nach Abschluss der Wasch- und Markierungsschritte wurden die Arrays mit Hilfe eines GeneArray Scanners (Agilent/Affymetrix) eingelesen. Das resultierende Bild wurde zunächst mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite 4.0 Software ausgewertet. Für die weitere Datenanalyse wurde das Programm dChip1.2 (Li und Wong, 2001) verwendet. Mit Hilfe dieses Programms wurde eine Normalisierung („Invariant set normalisation“; Li und Wong, 2001) aller Microarrays durchgeführt und anschließend die Signalstärke der einzelnen Probesets berechnet. Bei der vergleichenden Analyse der experimentellen Arrays mit den Kontrollarrays wurden Gene herausgefiltert die sich mindestens zweifach hochreguliert oder reprimiert verhielten (vergl. Li und Wong, 2001). Dieses Kriterium wurde bei Zeitkinetik-Experimenten für jeden einzelnen untersuchten Zeitpunkt angelegt. Replikate wurden gemittelt wobei bei der Berechnung der Expressions-signale ein Vertrauensintervall von 90% vorgegeben wurde (vergl. Li und Wong, 2001).

## 5. Literaturverzeichnis

- Aasland, R., Gibson, T.J. und Steward, A.F.** (1995). The PHD finger: implications for chromatin mediated transcriptional regulation. *Trends Biol. Sci.*, 56-59.
- Abramovitch, R.B., Yang, G. und Kronstad, J.W.** (2002). The *ukb1* gene encodes a putative protein kinase required for bud site selection and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **37**, 98-108.
- Agrios, G.N.** (1997). *Plant Pathology*. (San Diego: Academic Press, Inc.).
- Aichinger, C.** (2000). Identifizierung pflanzenabhängig-regulierter Gene in *Ustilago maydis*. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W. und Kahmann, R.** (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol Genet Genomics* **270**, 303-314.
- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R. und Heitman, J.** (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev* **11**, 3206-3217.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- An, Z., Mei, B., Yuan, W.M. und Leong, S.A.** (1997). The distal GATA sequences of the *sid1* promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with Urbs1, a GATA family transcription factor. *EMBO J.* **16**, 1742-1750.
- Andrews, D.L., Egan, J.D., Mayorga, M.E. und Gold, S.E.** (2000). The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 781-786.
- Askwith, C. und Kaplan, J.** (1997). An Oxidase-Permease-based Iron Transport System in *Schizosaccharomyces pombe* and Its Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 401-405.
- Ausubel, F.M., Brenz, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Strukl, K.** (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. (USA: John Wiley & Sons, Inc.).
- Baggett, J.J. und Wendland, B.** (2001). Clathrin function in yeast endocytosis. *Traffic* **2**, 297-302.
- 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.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 179-208.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1989). Different *a* alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5878-5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1994a). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**, 1367-1378.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1994b). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp. Mycology* **18**, 247-266.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Barrett, K.J., Gold, S.E. und Kronstad, J.W.** (1993). Identification and complementation of a mutation to constitutive filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol-Plant-Microbe-Interact* **6**, 274-283.

- Basse, C.W., Stumpferl, S. und Kahmann, R.** (2000). Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol Cell Biol* **20**, 329-339.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M. und Sonnhammer, E.L.** (2002). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **30**, 276-280.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C., Eddy, R.S.** (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**, D136-D141.
- Baur, M., Esch, R.K. und Errede, B.** (1997). Cooperative binding interactions required for function of the Ty1 sterile responsive element. *Mol Cell Biol* **17**, 4330-4337.
- Boehm, M. und Bonifacio, J.S.** (2002). Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene* **286**, 175-186.
- Boeke, J.D., LaCroute, F. und Fink, G.R.** (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**, 345-346.
- Bohlmann, R.** (1996). Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bölker, M., Böhnert, H.U., Braun, K.H., Görl, J. und Kahmann, R.** (1995). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- Bonnet, C.** (1754). Recherches sur l'usage des feuilles. Göttingen, 327-330.
- Borges-Walmsley, M.I. und Walmsley, A.R.** (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* **8**, 133-141.
- Bottin, A., Kämper, J. und Kahmann, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 342-352.
- Brachmann, A.** (1995). Suche nach frühen *b*-regulierten Genen in *Ustilago maydis* mit Hilfe der Methode des "Differential Display", Diplomarbeit, LMU München.
- Brachmann, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *U. maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J. und Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Muller, P. und Kahmann, R.** (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **22**, 2199-2210.
- Brachmann, A., Weizierl G, Kämper J and Kahmann R.** (2004). Genome-based strategy for generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. FGB submitted.
- Breitkreutz, A., Boucher, L., Breitkreutz, B.J., Sultan, M., Jurisica, I. und Tyers, M.** (2003). Phenotypic and transcriptional plasticity directed by a yeast mitogen-activated protein kinase network. *Genetics* **165**, 997-1015.
- Browne, B.L., McClendon, V. und Bedwell, D.M.** (1996). Mutations within the first LSGGQ motif of Ste6p cause defects in a-factor transport and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **178**, 1712-1719.
- Budde, A.D. und Leong, S.A.** (1989). Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* **108**, 125-133.
- Carniel, E.** (2001). The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes and Infection* **3**, 561-569.
- Chen, L. und Davis, N.G.** (2000). Recycling of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* **151**, 731-738.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc. Monogr.* **2**.



- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci U S A **69**, 2110-2114.
- Conlon, E.M., Liu, X.S., Lieb, J.D. und Liu, J.S.** (2003). Integrating regulatory motif discovery and genome-wide expression analysis. Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 3339-3344.
- Davey, J.** (1998). Fusion of a fission yeast. Yeast **14**, 1529-1566.
- Day, P.R., Anagnostakis, S.L. und Puhalla, J.E.** (1971). Pathogenicity resulting from mutation at the *b* locus of *Ustilago maydis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 533-535.
- De Backer, M.D. und Van Dijck, P.** (2003). Progress in functional genomics approaches to antifungal drug target discovery. Trends Microbiol **11**, 470-478.
- De Vries, L., Mousli, M., Wurmser, A. und Farquhar, M.G.** (1995). GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. Proc Natl Acad Sci U S A **92**, 11916-11920.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. und Brown, P.O.** (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science **278**, 680-686.
- DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B. und Sweigard, J.A.** (1999). *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. Plant Cell **11**, 2013-2030.
- Dohlman, H.G.** (2002). G proteins and pheromone signaling. Annu Rev Physiol **64**, 129-152.
- Dohlman, H.G., Apaniesk, D., Chen, Y., Song, J. und Nusskern, D.** (1995). Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol **15**, 3635-3643.
- Douglas, S.E.** (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. Mol Biotechnol **3**, 37-45.
- D'Souza, C.A., Alspaugh, J.A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G.M., Perfect, J.R. und Heitman, J.** (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Mol Cell Biol **21**, 3179-3191.
- Dürrenberger, F., Wong, K. und Kronstad, J.W.** (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 5684-5689.
- Dürrenberger, F., Laidlaw, R.D. und Kronstad, J.W.** (2001). The *hgl1* gene is required for dimorphism and teliospore formation in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. Mol Microbiol **41**, 337-348.
- Eddy, S.R.** (1995). Multiple alignment using hidden Markov models. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol **3**, 114-120.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Kämper, J., Müller, P. und Kahmann, R.** (2004). A high affinity iron permease is required for virulence in *U. maydis*. Plant Cell, resubmission encouraged.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. und Botstein, D.** (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 14863-14868.
- Eisendle, M., Oberegger, H., Zadra, I. und Haas, H.** (2003). The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (*sidA*) and a non-ribosomal peptide synthetase (*sidC*). Mol Microbiol **49**, 359-375.
- Errede, B. und Ammerer, G.** (1989). STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. Genes Dev **3**, 1349-1361.
- Fang, H.M. und Wang, Y.** (2002). Characterization of iron-binding motifs in *Candida albicans* high-affinity iron permease CaFtr1p by site-directed mutagenesis. Biochem J **368**, 641-647.
- Frishman, D., Albermann, K., Hani, J., Heumann, K., Metanomski, A., Zollner, A. und Mewes, H.-W.** (2001). Functional and structural genomics using PEDANT. Bioinformatics **17**, 44-57.
- Frishman, D., Mokrejs, M., Kosykh, D., Kastenmuller, G., Kolesov, G., Zubrzycki, I., Gruber, C., Geier, B., Kaps, A., Albermann, K., Volz, A., Wagner, C., Fellenberg, M., Heumann, K. und Mewes, H.W.** (2003). The PEDANT genome database. Nucleic Acids Res **31**, 207-211.

- Garcia-Muse, T., Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2004). Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci* **117**, 487-506.
- Garrido, E. und Perez-Martin, J.** (2003). The *crk1* gene encodes an Ime2-related protein that is required for morphogenesis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **47**, 729-743.
- Garrido, E., Voß, U., Müller, P., Kahmann, R. und Pérez-Martín, J.** (2004). The induction of the sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on *crk1*, a novel MAPK protein. to be submitted.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. und Brown, P.O.** (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**, 4241-4257.
- Georgatsou, E. und Alexandraki, D.** (1994). Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**, 3065-3073.
- Giaever, G. et al.** (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387-391.
- Gietz, R.D. und Sugino, A.** (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527-534.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. und Kronstad, J.** (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes. Dev.* **8**, 2805-2816.
- Gold, S.E., Brogdon, S.M., Mayorga, M.E. und Kronstad, J.W.** (1997). The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant-Cell* **9**, 1585-1594.
- Goodman, L.E., Judd, S.R., Farnsworth, C.C., Powers, S., Gelb, M.H., Glomset, J.A. und Tamanoi, F.** (1990). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in the farnesylation of Ras proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9665-9669.
- Guarro, J., GeneJ und Stchigel, A.M.** (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **12**, 454-500.
- Guthrie, C. und Fink, G.R.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. (Academic Press, Inc., San Diego).
- Haas, H.** (2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 316-330.
- Haas, H., Schoeser, M., Lesuisse, E., Ernst, J.F., Parson, W., Abt, B., Winkelmann, G. und Oberegger, H.** (2003). Characterization of the *Aspergillus nidulans* transporters for the siderophores enterobactin and triacetylufusarinine C. *Biochem J* **371**, 505-513.
- Han, Y., Liu, X., Benny, U., Kistler, H.C. und VanEtten, H.D.** (2001). Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *Plant J* **25**, 305-314.
- Hartmann, H.A.** (1997). Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **15**, 1632-1641.
- Hartmann, H.A., Krüger, J., Lottspeich, F. und Kahmann, R.** (1999). Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator *prf1*. *Plant Cell* **11**, 1293-1306.
- Haurie, V., Boucherie, H. und Sagliocco, F.** (2003). The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 45391-45396.

- He, B., Chen, P., Chen, S.Y., Vancura, K.L., Michaelis, S. und Powers, S.** (1991). *RAM2*, an essential gene of yeast, and *RAM1* encode the two polypeptide components of the farnesyltransferase that prenylates a-factor and Ras proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11373-11377.
- Heiman, M.G. und Walter, P.** (2000). Prm1p, a pheromone-regulated multispanning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating. *J Cell Biol* **151**, 719-730.
- Heringa, J.** (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**, 341-364.
- Hoffman, C.S. und Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Hogan, L.H., Klein, B.S. und Levitz, S.M.** (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* **9**, 469-488.
- Holliday, R.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **2**, 204-230.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics*, R.C. King, ed (New York, USA: Plenum Press), pp. 575-595.
- Horak, C.E., Luscombe, N.M., Qian, J., Bertone, P., Piccirillo, S., Gerstein, M. und Snyder, M.** (2002). Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **16**, 3017-3033.
- Hrycyna, C.A., Sapperstein, S.K., Clarke, S. und Michaelis, S.** (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and RAS proteins. *EMBO J.* **10**, 1699-1709.
- Hsu, C.L. und Stevens, A.** (1993). Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Mol Cell Biol* **13**, 4826-4835.
- Hu, C.J., Bai, C., Zheng, X.D., Wang, Y.M. und Wang, Y.** (2002). Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **277**, 30598-30605.
- Hueck, C.J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. und White, T.J.** (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (San Diego, USA: Academic Press).
- Irie, T., Matsumura, H., Terauchi, R. und Saitoh, H.** (2003). Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) of *Magnaporthe grisea*: genes involved in appressorium formation. *Mol Genet Genomics* **270**, 181-189.
- Jacobson, E.S.** (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* **13**, 708-717.
- Jacobson, E.S. und Hong, J.D.** (1997). Redox buffering by melanin and Fe(II) in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* **179**, 5340-5346.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. und Pavletich, N.P.** (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-320.
- Kaffarnik, F., Muller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R. und Feldbrugge, M.** (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **22**, 5817-5826.
- Kahmann, R. und Basse, C.** (1999). REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. *Eur J Plant Pathol* **105**, 221-229.
- Kahmann, R., G., S., Basse, C., Feldbrügge, M. und Kämper, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In *Fungal Pathology*, J.W. Kronstad, ed (Dodrecht: Kluwer Academic Publishers).
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kirkman-Correia, C., Stroke, I.L. und Fields, S.** (1993). Functional domains of the yeast STE12 protein, a pheromone-responsive transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **13**, 3765-3772.
- Kosman, D.J.** (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* **47**, 1185-1197.

- Kronstad, J.W. und Leong, S.A.** (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev.* **4**, 1384-1395.
- Krüger, J.** (1999). Der cAMP-Weg und sein Einfluß auf Pheromonsignaltransduktion und Pathogenität in *Ustilago maydis*. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Krüger, J., Aichinger, C., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1997). A MADS-box homologue in *Ustilago maydis* regulates the expression of pheromone-inducible genes but is nonessential. *Genetics* . Dec **147**, 1643-1652.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A. und Kahmann, R.** (1998). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**, 193-198.
- Krüger, J., Loubradou, G., Wanner, G., Regenfelder, E., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (2000). Activation of the cAMP pathway in *Ustilago maydis* reduces fungal proliferation and teliospore formation in plant tumors. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1034-1040.
- Kuchler, K., Sterne, R.E. und Thorner, J.** (1989). *Saccharomyces cerevisiae* *STE6* gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.* **8**, 3973-3984.
- Lee, N. und Kronstad, J.W.** (2002). *ras2* Controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **1**, 954-966.
- Lee, N., D'Souza, C.A. und Kronstad, J.W.** (2003). Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 399-427.
- Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Wu, C., Chenevert, J., Clark, K., Whiteway, M., Thomas, D.Y. und Leberer, E.** (1995). Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* **270**, 1210-1213.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K., Schliwa, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **16**, 3464-3473.
- Leroux, P.** (2003). [Modes of action of agrochemicals against plant pathogenic organisms]. *C R Biol* **326**, 9-21.
- Lesuisse, E., Simon-Casteras, M. und Labbe, P.** (1998). Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the *SIT1* gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology* **144** ( Pt **12**), 3455-3462.
- Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N.J., Doerks, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, R.R., Ponting, C.P. und Bork, P.** (2002). Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res* **30**, 242-244.
- Li, C. und Wong, W.H.** (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 31-36.
- Li, C. und Hung Wong, W.** (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0032.
- Liu, X.S., Brutlag, D.L. und Liu, J.S.** (2002). An algorithm for finding protein-DNA binding sites with applications to chromatin-immunoprecipitation microarray experiments. *Nat Biotechnol* **20**, 835-839.
- 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.
- Matzanke, B.F., Anemuller, S., Schunemann, V., Trautwein, A.X. und Hantke, K.** (2004). FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry* **43**, 1386-1392.
- Mayorga, M.E. und Gold, S.E.** (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol. Microbiol.* **34**, 485-497.
- Mazoch, J., Tesarik, R., Sedlacek, V., Kucera, I. und Turanek, J.** (2004). Isolation and biochemical characterization of two soluble iron(III) reductases from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* **271**, 553-562.
- Measday, V., Moore, L., Ogas, J., Tyers, M. und Andrews, B.** (1994). The PCL2 (ORFD)-PHO85 cyclin-dependent kinase complex: a cell cycle regulator in yeast. *Science* **266**, 1391-1395.

- Measday, V., Moore, L., Retnakaran, R., Lee, J., Donoviel, M., Neiman, A.M. und Andrews, B.** (1997). A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 1212-1223.
- Mei, B., Budde, A.D. und Leong, S.A.** (1993). *sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 903-907.
- Mewes, H.W., Hani, J., Pfeiffer, F. und Frishman, D.** (1998). MIPS: a database for protein sequences and complete genomes. *Nucleic Acids Res* **26**, 33-37.
- Mewes, H.W., Heumann, K., Kaps, A., Mayer, K., Pfeiffer, F., Stocker, S. und Frishman, D.** (1999). MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res* **27**, 44-48.
- Mosch, H.U., Kubler, E., Krappmann, S., Fink, G.R. und Braus, G.H.** (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**, 1325-1335.
- Muhrad, D., Decker, C.J. und Parker, R.** (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev* **8**, 855-866.
- Müller, E. und Loeffler, W.** (1992). Mykologie.
- Müller, P.** (2003). Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*: Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (1999). The MAP kinase *kpp2* regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-1017.
- Müller, P., Katzenberger, J.D., Loubradou, G. und Kahmann, R.** (2003a). Guanyl nucleotide exchange factor *Sql2* and *Ras2* regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 609-617.
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrugge, M. und Kahmann, R.** (2003b). Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell* **2**, 1187-1199.
- Müller, P., Leibbrandt, A., Cubasch, S., Teunissen, H., Aichinger, C. und Kahmann, R.** (2004). The Gβ-subunit encoding gene *bbp1* controls cAMP signalling in *U. maydis*. *Eukaryot Cell* **in press**.
- Nakai, K. und Kanehisa, M.** (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911.
- Nakai, K. und Horton, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- Nehls, U., Wiese, J., Guttenger, M. und Hampp, R.** (1998). Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 167-176.
- Nelissen, B., De Wachter, R. und Goffeau, A.** (1997). Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 113-134.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr., Deerfield, D.W.** (1997). GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS* **4:14 II**.
- Oehlen, L.J., McKinney, J.D. und Cross, F.R.** (1996). *Ste12* and *Mcm1* regulate cell cycle-dependent transcription of *FAR1*. *Mol Cell Biol* **16**, 2830-2837.
- Oerke, E.-C. und Steiner, U.** (2003). Wie funktionieren Fungizide. Bayer Kurier online.
- Oliver, R.P. und Schweizer, M.** (1999). *Molecular Fungal Biology*. (Cambridge: Cambridge University Press).
- Orth, A.B., Rzhetskaya, M., Pell, E.J. und Tien, M.** (1995). A serine (threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Appl-Environ-Microbiol* **61**, 2341-2345.
- Ozcan, S. und Johnston, M.** (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 554-569.

- Pan, X., Harashima, T. und Heitman, J.** (2000). Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **3**, 567-572.
- Park, G., Xue, C., Zheng, L., Lam, S. und Xu, J.R.** (2002). MST12 regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 183-192.
- Primig, M., Winkler, H. und Ammerer, G.** (1991). The DNA binding and oligomerization domain of MCM1 is sufficient for its interaction with other regulatory proteins. *EMBO J.* **10**, 4209-4218.
- Puhalla, J.E.** (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-474.
- Ramanan, N. und Wang, Y.** (2000). A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* **288**, 1062-1064.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *Embo Journal.* **16**, 1934-1942.
- Reith, W., Herrero-Sanchez, C., Kobr, M., Silacci, P., Berte, C., Barras, E., Fey, S. und Mach, B.** (1990). MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes Dev* **4**, 1528-1540.
- Roberts, C.J., Nelson, B., Marton, M.J., Stoughton, R., Meyer, M.R., Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H., Walker, W.L., Hughes, T.R., Tyers, M., Boone, C. und Friend, S.H.** (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**, 873-880.
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. und Fink, G.R.** (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5984-5988.
- Rodriguez, G.M. und Smith, I.** (2003). Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Mol Microbiol* **47**, 1485-1494.
- Rowell, J.B.** (1955). Functional role of compatibility factors and an *in vitro* test for sexual incompatibility with haploid lines of *Ustilago zea*. *Phytopathology* **45**, 370-374.
- Rowell, J.B. und DeVay, J.E.** (1954). Genetics of *Ustilago zea* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**, 356-362.
- Ruiz-Herrera, J., Leon-Ramirez, C., Cabrera-Ponce, J.L., Martinez-Espinoza, A.D. und 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.
- Sabbagh, W., Jr., Flatauer, L.J., Bardwell, A.J. und Bardwell, L.** (2001). Specificity of MAP kinase signalling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* **8**, 683-691.
- Samaj, J., Baluska, F. und Hirt, H.** (2004). From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *J Exp Bot* **55**, 189-198.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Schandel, K.A. und Jenness, D.D.** (1994). Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor. *Mol Cell Biol* **14**, 7245-7255.
- Schiestl, R.H. und Gietz, R.D.** (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**, 339-346.
- Schoch, C.L., Aist, J.R., Yoder, O.C. und Gillian Turgeon, B.** (2003). A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol* **39**, 1-15.
- Schryvers, A.B. und Stojiljkovic, I.** (1999). Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **32**, 1117-1123.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C.P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.

- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P. und Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 231-234.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R. (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Serikawa, K.A., Xu, X.L., MacKay, V.L., Law, G.L., Zong, Q., Zhao, L.P., Bumgarner, R. und Morris, D.R. (2003). The Transcriptome and Its Translation during Recovery from Cell Cycle Arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* **2**, 191-204.
- Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J., Garcia, E., Rolfes, R., Brown, P.O., Botstein, D. und Philpott, C.C. (2004). Transcriptional Remodeling in Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**.
- Snetselaar, K.M. (1993). Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Experimental Mycology* **17**, 345-355.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W. (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W. (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W. (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**, 347-355.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M. und Kahmann, R. (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 299-312.
- Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Birney, E., Bateman, A. und Durbin, R. (1998). Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. *Nucleic Acids Res* **26**, 320-322.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Sparla, F., Preger, V., Pupillo, P. und Trost, P. (1999). Characterization of a novel NADH-specific, FAD-containing, soluble reductase with ferric citrate reductase activity from maize seedlings. *Arch Biochem Biophys* **363**, 301-308.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 503-509.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. und 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. und Kahmann, R. (1994b). Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 191-197.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. und Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**, 3273-3297.
- Stearman, R., Yuan, D.S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R.D. und Dancis, A. (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**, 1552-1557.
- Steen, B.R., Lian, T., Zuyderduyn, S., MacDonald, W.K., Marra, M., Jones, S.J. und Kronstad, J.W. (2002). Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res* **12**, 1386-1400.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R. und McIntosh, J.R. (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111**, 2235-2246.
- Sundström, K.-R. (1964). Studies of the physiology, morphology and serology of exobasidium. *Bot. Upsal.* XVIII **3**.
- Szabo, Z., Tonnis, M., Kessler, H. und Feldbrugge, M. (2002). Structure-function analysis of lipopeptide pheromones from the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **268**, 362-370.

- Tanaka, A., Shiotani, H., Yamamoto, M. und Tsuge, T.** (1999). Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 691-702.
- Thevelein, J.M. und de Winde, J.H.** (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**, 904-918.
- Thevelein, J.M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J.H., Donation, M., Dumortier, F., Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Nauwelaers, D., Rolland, F., Teunissen, A., Van Dijck, P., Versele, M., Wera, S. und Winderickx, J.** (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb Technol* **26**, 819-825.
- Thomas, S.W., Glaring, M.A., Rasmussen, S.W., Kinane, J.T. und Oliver, R.P.** (2002). Transcript profiling in the barley mildew pathogen *Blumeria graminis* by serial analysis of gene expression (SAGE). *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 847-856.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Trueblood, C.E., Ohya, Y. und Rine, J.** (1993). Genetic evidence for in vivo cross-specificity of the CaaX-box protein prenyltransferases farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase-I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 4260-4275.
- Trueblood, C.E., Boyartchuk, V.L., Picologlou, E.A., Rozema, D., Poulter, C.D. und Rine, J.** (2000). The CaaX proteases, Afc1p and Rce1p, have overlapping but distinct substrate specificities. *Mol Cell Biol* **20**, 4381-4392.
- Tsuji, G., Fujii, S., Tsuge, S., Shiraishi, T. und Kubo, Y.** (2003). The *Colletotrichum lagenarium* *Ste12*-like gene *CST1* is essential for appressorium penetration. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 315-325.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3703-3709.
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 31-37.
- Vanden Bossche, H., Dromer, F., Improvisi, I., Lozano-Chiu, M., Rex, J.H. und Sanglard, D.** (1998). Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol* **36**, 119-128.
- Voisard, C., Wang, J., McEvoy, J.L., Xu, P. und Leong, S.A.** (1993). *urbs1*, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol-Cell-Biol* **13**, 7091-7100.
- Wang, J., Budde, A.D. und Leong, S.A.** (1989). Analysis of ferrichrome biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*: cloning of an ornithine-N5-oxygenase gene. *J Bacteriol* **171**, 2811-2818.
- Watson, N., Linder, M.E., Druey, K.M., Kehrl, J.H. und Blumer, K.J.** (1996). RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits. *Nature* **383**, 172-175.
- Weber, H.** (1993). Allgemeine Mykologie. (Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag).
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M.W. und 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.** (2001). Isolierung und Charakterisierung der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Winkelmann, G.** (2002). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* **30**, 691-696.
- Winzler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R.W. und *et al.* (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906.**



- Wittenberg, C., Sugimoto, K. und Reed, S.I.** (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell* **62**, 225-237.
- Xu, J.R. und Hamer, J.E.** (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev* **10**, 2696-2706.
- Xu, J.-R.** (2000). MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genetics and Biology* **31**, 137-152.
- Yuan, W.M., Gentil, G.D., Budde, A.D. und Leong, S.A.** (2001). Characterization of the *Ustilago maydis* *sid2* gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. *J Bacteriol* **183**, 4040-4051.
- Yun, C.W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P.O., Botstein, D., Kaplan, J. und Philpott, C.C.** (2000). Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J Biol Chem* **275**, 10709-10715.
- Yuzyuk, T., Foehr, M. und Amberg, D.C.** (2002). The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. *Mol Biol Cell* **13**, 2869-2880.
- Zarzov, P., Mazzoni, C. und Mann, C.** (1996). The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* **15**, 83-91.
- Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C.T., Hannett, N.M., Volkert, T.L., Fink, G.R. und Young, R.A.** (2003). Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**, 395-404.

## **6. Anhang**

### **6.1 Übersicht der Daten auf der beiliegenden CD**

#### **6.1.1 Sequenzdaten**

#### **6.1.2 Microarray-Daten (dChip Dateiformat)**

#### **6.1.3 Auswertung der Microarray-Experimente**

**Tabelle 7: Pheromon-induzierte Gene**

**Tabelle 8: Pheromon-reprimierte Gene**

**Tabelle 9: Kpp2-abhängig induzierte Gene**

**Tabelle 10: Kpp2-abhängig reprimierte Gene**

**Tabelle 11: Prf1-abhängig regulierte Gene**

**Tabelle 12: Prf1-unabhängig regulierte Gene**

**Tabelle 13: Adr1-regulierte Gene**

---

## Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meiner Mutter für ihre große Unterstützung während meiner ganzen Ausbildung und meinem lieben Vater, der immer bei mir war. Euer Verständnis, Interesse und Vorbild waren eine große Hilfe und Motivation.

Regine Kahmann danke ich sehr, für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen. Insbesondere möchte ich mich bei ihr für die stetige Förderung und die Korrektur der schriftlichen Arbeit bedanken. Nicht zuletzt danke ich ihr für die vielen konstruktiven Diskussionen und für die Freiheit eigene Ideen verwirklichen zu können.

Für die Übernahme der Zweitkorrektur möchte ich Renate Renkawitz-Pohl danken. In diesem Zusammenhang geht mein Dank auch an Michael Bölker und Reinhard Fischer für die freundliche Bereitschaft, der Promotionskommission anzugehören.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den Projekten möchte ich Franziska und Tobias danken, die ich während ihres Praktikums bzw. der Diplomarbeit anleiten durfte. Jörg und Mario möchte ich für die fundierte Einführung in die „Array-Technik“ und viele gute Gespräche danken. Philip M. danke ich für hilfreiche Diskussionen aber auch für den Einblick in die Faszination des Fußballs. Karin M. danke ich für ihre Unterstützung bei Projekten und eine gute Zusammenarbeit. Bei Helle möchte ich mich für Ihren Rat in Sachen „Hefe“ bedanken. Ein Dankeschön auch an Christoph, Gero, Feldi, Gerhard, Karin H. und Karl-Heinz, für gute Gespräche, Material und Anregungen.

Mein besonders herzlicher Dank geht an Kathrin, Isabella, Isabell, Jan F. und Philip B., für Eure Freundschaft und Unterstützung, Eure sympathische und entspannte Art, das Korrekturlesen und eine wirklich sehr gute Zeit, auch außerhalb des Labors. Isabella danke ich für eine lustige Zeit und die gute „Nachbarschaft“. Jan F. danke ich für seine Freundschaft und eine schöne Münchner „SFB-Zeit“. Kathrin und Isabel danke ich für ihre Unterstützung und ihre fröhliche Art. Philip B. gilt mein großer Dank für seine Hilfsbereitschaft, seine Zuverlässigkeit und seinen „Pfälzer“ Frohsinn. Außerdem möchte ich mich bei Isabella Jan, Jan und Thomas für die schöne Zeit in Kalifornien bedanken. Danke!



---

# Lebenslauf

<b>Personalien</b>		Heiko Dirk Eichhorn geboren am 20. September 1974 in Neustadt/Weinstr.
<b>Schulbildung</b>	1981 - 1985 1985 - 1994	Dr.-Albert-Finck Grundschule, Neustadt/Weinstr. Staatliches Leibniz Gymnasium, Neustadt/Weinstr. Abschluss: Abitur, Gesamtnote: 2,3
<b>Zivildienst</b>	1994 - 1995	Technischer Dienst, Landesverein für Innere Mission in der Pfalz
<b>Studium</b>	10/1995 - 09/1997  09/1997 - 07/1998  10/1998 - 10/1999  10/1999 - 09/2000	Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern Abschluss: Vordiplom, Gesamtnote: 1,2  Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der University of Manchester, Institute of Science and Technology, England Abschluss: 2 <sup>nd</sup> Year Honours Degree, Gesamtnote: "sehr gut"  Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern Abschluss: Diplom, Gesamtnote: 1,0 - mit Auszeichnung  Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie an der Universität Kaiserslautern (Prof. Dr. H. Kauss) Betreuer: PD Dr. Raimund Tenhaken Thema: „Klonierung und biochemische Charakterisierung des Gens für einen salicylsäure-induzierten ABC-Transporter aus <i>Glycine max</i> “
<b>Promotion</b>	01/2001 - 04/2004	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Betreuer: Prof. Dr. Regine Kahmann Thema: „Pathogenitätsrelevante Signalkaskaden in <i>Ustilago maydis</i> : Identifikation von Zielgenen“
<b>Sonstige Tätigkeiten</b>	1991 - 1993 07/1996 - 08/1996 07/1998 - 09/1998  10/2000 - 12/2000	Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt, Neustadt/Weinstr., Praktikant u.a. Bayer AG, Leverkusen, Hochschulpraktikant Forschungszentrum Jülich GmbH, studentische Hilfskraft  Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik und Mikrobiologie (Abt. Prof. Dr. R. Kahmann), Ludwig-Maximilians-Universität, München