

**Identifizierung von Effektoren der
Pheromon-MAPK-Kaskade
in *Ustilago maydis***

Dissertation

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Thomas Brefort
aus Hünxe

Marburg/Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann von Oktober 2001 bis Ende September 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: _____

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Teile dieser Arbeit werden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Brefort, T.; Müller, P.; und Kahmann, R. (2004) The HMG domain transcription factor Rop1 is a direct regulator of *prf1* in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, akzeptiert.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel “Identifizierung von Effektoren der Pheromon-MAPK-Kaskade in *Ustilago maydis*” selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

(Ort, Datum)

Thomas Brefort

ZUSAMMENFASSUNG

Die sexuelle Entwicklung von *Ustilago maydis*, dem Erreger des Maisbeulenbrandes, wird durch die Fusion zweier haploider Sporidien eingeleitet. Das aus der Zellfusion hervorgehende Dikaryon ist dann in der Lage die Maispflanze zu infizieren. Diese Entwicklungsprozesse werden durch die beiden Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Der biallelische *a*-Locus kodiert für ein Pheromon-Pheromonrezeptorsystem, das die Zell-Zellerkennung und die anschließende Zellfusion gewährleistet. Der multiallelische *b*-Locus kodiert für zwei Homeodomänenproteine, bE und bW, die nur in bestimmten Kombinationen heterodimerisieren und weitere Entwicklungsschritte ermöglichen. Während der Zell-Zellerkennung induziert das Pheromonsignal die Ausbildung von Konjugationshyphen und die Transkription der *a*- und *b*-Paarungstypgene. Die Induktion der *a*- und *b*-Gene erfolgt über den Transkriptionsfaktor Prf1, der über den cAMP-Signalweg und das Pheromon-MAPK-Modul posttranskriptionell aktiviert wird. Das aktive MAPK-Modul induziert zusätzlich die Transkription von *prf1* und ist außerdem für die Ausbildung der Konjugationshyphen verantwortlich. Prf1 wird für die Konjugationshyphenbildung jedoch nicht benötigt. Diese Ergebnisse früherer Arbeiten deuteten auf die Existenz von weiteren unterhalb des MAPK-Moduls agierenden Regulatoren der Pheromonantwort hin.

In dieser Arbeit wurden mit Rop1 und Hmg3 zwei HMG-Domänen-Transkriptionsfaktoren identifiziert, die wie Prf1 zur sequenzspezifisch DNA-bindenden Klasse dieser Proteinfamilie gehören. Während *hmg3*-Deletionsmutanten zwar einen schwachen Zellfusions- und Pathogenitätsdefekt zeigten, jedoch nach Pheromonstimulation Konjugationshyphen bildeten und lediglich eine leicht reduzierte Expression des Pheromogens aufwiesen, führte die Deletion von *rop1* zum Verlust der Pheromon-induzierten Genexpression sowie der Konjugationshyphenbildung. Weitere Untersuchungen zeigten, dass *rop1* selbst in Stämmen, die eine konstitutiv aktive Variante der MAPKK Fuz7 exprimieren für die Transkription von *prf1* sowie die *a*- und *b*-Genexpression erforderlich ist. Dieser Ansatz ergab auch, dass *rop1* an der Ausbildung von Konjugationshyphen nur indirekt beteiligt ist. Desweiteren wurden die starken Zellfusions- und Filamentationsdefekte von $\Delta rop1$ -Stämmen durch die konstitutive Expression von *prf1* komplementiert, was darauf hindeutete, dass Rop1 einen entscheidenden Regulator der *prf1*-Expression darstellt. Gelretardationsexperimente ergaben dann, dass Rop1 *in vitro* spezifisch an den *prf1*-Promotor bindet und ermöglichten ferner die Identifizierung eines DNA-Bindemotivs, das sich in einer Reihe weiterer putativer Promotorregionen des *U. maydis* Genoms findet. In Northern-Analysen konnte gezeigt werden, dass das genetisch aktivierte MAPK-Modul die *rop1*-Expression über die MAPK Kpp2 induziert. Im Gegensatz dazu führte die genetische Aktivierung des cAMP-Signalweges zur Repression der *rop1*-Expression.

Überraschenderweise exprimierten *rop1*-Deletionsmutanten auf der Pflanzenoberfläche ausreichend *prf1*, um alle Entwicklungsstadien zu durchlaufen und volle Pathogenität zu entwickeln. Dies deutet auf die Existenz von zusätzlichen Regulatoren der *prf1*-Expression auf der Pflanze hin.

ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE

aa	Aminosäuren	NLS	„nuclear localization sequence“
Amp	Ampicillin	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Ara	Arabinose	ORF	„open reading frame“
bp	Basenpaar(e)	PAA	Polyacrylamid
C-terminal	carboxyterminal	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Cbx	Carboxin	PC	Phenol/Chloroform
CM	„complete medium“	PCR	„polymerase chain reaction“
c.p.m	„counts per minute“	PD	„potato dextrose“
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	PEG	Polyethylenglycol
DIC	„differential interference contrast“	Phleo	Phleomycin
DMF	Dimethylformamid	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethansulphonat)
DMSO	Dimethylsulfoxid	PKA	„protein kinase A“
DTT	Dithiothreitol	PRE	„pheromone response element“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT	„reverse transcription“ oder Raumtemperatur
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“	SDS	Natriumdodecylsulfat
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	TAE	Tris-Acetat + Na ₂ -EDTA
ERK	„extracellular regulated kinase“	TBE	Tris-Borat + Na ₂ -EDTA
GFP	„green fluorescent protein“	TE	Tris-Cl + Na ₂ -EDTA
Glc	Glucose	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
HMG	„high mobility group“	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
Hyg	Hygromycin	UARS	„ <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence“
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid	UAS	„upstream activating sequence“
kb	Kilobasenpaar	Ü/N	über Nacht
MAPK	„mitogen activated protein kinase“	Upm	Umdrehungen pro Minute
MAPKK	MAPK-Kinase	UV	ultraviolettes Licht
MAPKKK	MAPKK-Kinase	wt	Wildtyp
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat		
N-terminal	aminoterminal		
Nat	Nourseothricin		

sowie Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus für pathogene Pilze.....	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	2
1.3 Kontrolle der sexuellen Entwicklung durch die Paarungstyploci.....	4
1.4 Die Pheromonantwort in <i>U. maydis</i>	6
1.5 Signaltransduktion während der Zell-Zellerkennung und der pathogenen Entwicklung.....	6
1.6 Prf1, ein zentraler Regulator der Pheromonantwort in <i>U. maydis</i>	9
1.7 Transkriptionsfaktoren als Effektoren pilzlicher Pheromon-MAPK-Kaskaden	11
1.8 Fragestellung dieser Arbeit.....	13
2 ERGEBNISSE	14
2.1 Potenziell unterhalb der Pheromon-MAPK-Kaskade agierende Transkriptionsfaktoren.....	14
2.1.1 Das <i>Ustilago maydis</i> -Genom kodiert für acht Transkriptionsfaktoren der HMG-Box Familie	14
2.1.2 <i>hmg3</i> kodiert für ein sequenzspezifisch DNA-bindendes HMG-Domänen-Protein	16
2.1.3 Die Deletion von <i>hmg3</i> beeinträchtigt die Zellfusion	16
2.1.4 <i>hmg3</i> wird nicht zur Konjugationshyphenbildung benötigt.....	18
2.1.5 Die Pheromon-Induktion der <i>mfal</i> -Expression erfolgt unabhängig von <i>hmg3</i>	18
2.1.6 Δ <i>hmg3</i> -Mutanten zeigen eine leicht reduzierte Tumorbildung in Maispflanzen	19
2.1.7 <i>rop1</i> kodiert für ein drittes sequenzspezifisch DNA-bindendes HMG-Box-Protein	20
2.1.8 Die Deletion von <i>rop1</i> beeinträchtigt Prä- und Postfusionsprozesse.....	22
2.1.9 Rop1 ist essenziell für die Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation	23
2.1.10 Die Expression der <i>a</i> - und <i>b</i> -Paarungstypgene sowie von <i>prf1</i> erfordert <i>rop1</i>	23
2.1.11 Rop1 wird für die Ausbildung von Konjugationshyphen nicht benötigt.....	24
2.1.12 Rop1 agiert unterhalb der MAPKK Fuz7 als Regulator der transkriptionellen Pheromonantwort.....	27
2.1.13 Die konstitutive Expression von <i>prf1</i> komplementiert die Δ <i>rop1</i> -Phänotypen in Kreuzungen und bei der Konjugationshyphenbildung.....	28
2.1.14 Rop1 reguliert die <i>prf1</i> -Expression nicht über die 'upstream activating sequence'	29
2.1.15 Die HMG-Domäne von Rop1 bindet <i>in vitro</i> sequenzspezifisch an den <i>prf1</i> -Promotor	30
2.1.16 Die MAPK-Kaskade reguliert die <i>rop1</i> -Expression unabhängig von <i>prf1</i>	34
2.1.17 Ein aktiver cAMP-Signalweg reprimiert die <i>rop1</i> -Expression	37

2.1.18	<i>rop1</i> -Deletionsmutanten sind in der Lage, Maispflanzen effizient zu infizieren	38
2.1.19	Auf der Pflanze erfolgt das Durchlaufen der Entwicklungsstadien und die Expression des <i>P_{prf1}:egfp</i> -Reporters in Abwesenheit von <i>rop1</i>	39
2.1.20	Die Überexpression von <i>rop1</i> hat ebenfalls keinen Einfluß auf die Pathogenität	41
2.2	Genetischer Ansatz zur Identifizierung von Zielgenen des morphologischen Zweiges der Pheromon-MAPK-Kaskade	42
2.2.1	Konstruktion eines zur Identifizierung von Komponenten der Konjugationshyphenbildung geeigneten Ausgangsstammes	42
2.2.2	Isolierung nicht-filamentöser Mutanten	44
2.2.3	Charakterisierung der 262 nicht-filamentösen UV-Mutanten.....	44
2.2.4	Konjugationshyphenbildung und <i>P_{mfa1}:egfp</i> -Expression von 13 ausgewählten Mutanten.....	45
2.2.5	Die 13 ausgewählten Konjugationshyphen-defizienten Mutanten zeigen nach Fuz7DD-Induktion keine Expression bekannter Zielgene der MAPK-Kaskade	47
2.2.6	Alle 13 ausgewählten Mutanten tragen Mutationen im <i>kpp2</i> -Gen	48
3	DISKUSSION	49
3.1	HMG-Domänen-Proteine als Regulatoren der sexuellen Entwicklung.....	49
3.2	Rop1, ein kritischer Regulator der <i>prf1</i> -Expression	50
3.3	Rop1 bindet an spezifische DNA-Elemente im <i>prf1</i> -Promotor.....	51
3.4	MAPK-Kaskade und cAMP-Signalweg wirken antagonistisch auf die <i>rop1</i> -Genexpression.....	54
3.5	Umweltreize auf der Pflanzenoberfläche - Rop1 wird für die <i>prf1</i> -Expression und die sexuelle Entwicklung auf der Pflanze nicht benötigt	55
3.6	Modellvorstellung zur komplexen Regulation des <i>prf1</i> -Promotors	56
3.7	Wie wird der morphologische Zweig der Pheromonantwort reguliert?	59
3.8	Warum führte der genetische `Screen´ auf Konjugationshyphen-spezifische Zielgene des MAPK-Moduls ausschließlich zur Identifizierung von <i>kpp2</i> -Mutanten?	61
3.9	Ausblick	64
4	MATERIAL UND METHODEN	65
4.1	Materialien und Bezugsquellen	65
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits.....	65
4.1.2	Oligonukleotide	66
4.1.3	Stämme	69
4.1.4	Ausgangsplasmide.....	70
4.1.5	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide	72
4.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden.....	75
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	75
4.2.2	<i>Ustilago maydis</i>	75
4.3	Molekularbiologische Standardmethoden.....	80

4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	80
4.3.2	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	81
4.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse.....	83
4.3.4	PCR-Techniken	84
4.4	Biochemische Methoden	86
4.4.1	SDS-Gelelektrophorese von Proteinen.....	86
4.4.2	Transfer von Proteinen (Western-Blot)	86
4.4.3	Nachweis von immobilisierten Proteinen.....	86
4.4.4	Überexpression und Reinigung von (His) ₆ -Fusionsproteinen aus E. coli	87
4.4.5	Gelretardations-Analyse.....	88
5	LITERATURVERZEICHNIS	89
6	ANHANG.....	97

1 EINLEITUNG

1.1 *Ustilago maydis* als Modellorganismus für pathogene Pilze

Der phytopathogene Basidiomycet *Ustilago maydis* wird systematisch in die Familie der *Ustilaginaceae* eingeordnet. Dieser Familie von Pilzen gehören eine Vielzahl biotropher Pflanzenschädlinge an, die Blütenpflanzen aus mehr als 75 Familien befallen können (Banuett, 2002), darunter auch wirtschaftlich bedeutende Arten wie Weizen, Hafer und Mais (Fischer und Holton, 1957). Die einzelnen Mitglieder dieser Familie zeichnen sich jedoch in der Regel durch ein sehr enges individuelles Wirtsspektrum aus. Der biotrophe Pflanzenschädling *U. maydis* infiziert ausschließlich *Zea mays* (Mais) und die ursprünglichere in Mittelamerika beheimatete nahe verwandte Art *Euchlena mexicana* (Teosinte). Die Infektion mit *U. maydis* kulminiert in der Bildung charakteristischer mit Teliosporen gefüllter Tumoren an allen oberirdischen Pflanzenteilen (Christensen, 1963). Die schwarzen Teliosporen verleihen befallenen Maispflanzen ein "verbranntes" Aussehen. So kamen die Namen Maisbeulenbrand und Brandpilz für die verursachten Symptome bzw. den pilzlichen Erreger (lat. *ustilare* = verbrennen) zustande. Während *U. maydis* in Europa und Nordamerika als Maisschädling klassifiziert wird, gelten die mit Pilzmycel und Teliosporen gefüllten Pflanzentumore in Mittel- und Südamerika als Delikatesse und werden unter dem Namen 'Huitlacoche' vermarktet.

U. maydis ist ein fakultativ biotropher Pilz, der sich während der haploiden Phase seines Lebenszyklus außerhalb der Pflanze auf einfachen Nährmedien kultivieren läßt. In dieser Phase ist *U. maydis* einer Vielzahl von biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich. Insbesondere sind revers genetische Ansätze möglich, da *U. maydis* über ein sehr effizientes homologes Rekombinationssystem verfügt. Mittlerweile erlauben frei-replizierende und integrative Plasmide die Komplementation von Mutationen. Die effiziente homologe Rekombination ermöglicht die gezielte Geninaktivierung oder Konstruktion von Reporterfusionen, und regulierbare Promotoren erleichtern die funktionelle Charakterisierung von Genen (Banuett, 2002; Kahmann *et al.*, 2000). Die funktionelle Charakterisierung von Genen wird darüber hinaus durch ein aus frei kombinierbaren Kassetten mit konstitutiven oder regulierbaren Promotoren, vier verschiedenen Resistenzmarkern, dem *gfp*-Reporter gen und diversen 'tags' bestehendes System erleichtert (Brachmann *et al.*, 2004). Die detaillierte Analyse der *U. maydis*-Entwicklung während des Infektionsprozesses und der biotrophen Phase ist aufgrund der

leichten Kultivierbarkeit der Wirtspflanze Mais und des kurzen Lebenszyklus von *U. maydis* ebenfalls durchführbar.

1.2 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Bei *U. maydis* ist die Vollendung des sexuellen Lebenszyklus untrennbar mit der pathogenen, biotrophen Entwicklung verknüpft. Der Zyklus wird den Kernphasen des Pilzes entsprechend in drei Stadien unterteilt (Abb. 1). (1) Die apathogenen haploiden Basidiosporen, auch Sporidien genannt, vermehren sich durch Knospung und wachsen saprophytisch. (2) Aus der Fusion zweier kompatibler haploider Sporidien geht das filamentös wachsende Dikaryon hervor, welches die pathogene Form des Pilzes darstellt. (3) Nach erfolgreicher Infektion der Pflanze kommt es zur Bildung von Tumoren, wo schließlich die Karyogamie und Ausbildung der runden diploiden Teliosporen stattfindet.

Initiale Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion ist die gegenseitige Erkennung zweier kompatibler Sporidien (Abb. 1A und B). Die Kompatibilität ist gegeben, wenn die Sporidien unterschiedliche Allele in zwei Paarungstyploci tragen (Banuett, 2002; Kahmann *et al.*, 2000). Die gegenseitige Wahrnehmung führt zur Bildung von Konjugationshyphen, die gerichtet aufeinander zuwachsen und schließlich an ihren Spitzen fusionieren (Abb. 1A und B; Snetselaar, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996). Durch diese Zellfusion entsteht das dikaryotische Filament (Abb. 1B). Zellerkennung, Fusion und Dikaryenbildung können auch auf künstlichen Medien beobachtet werden. Dabei erscheinen die dikaryotischen Hyphen, die in regelmäßigen Abständen in ihrem distalen Bereich leere Abschnitte hinterlassen, auf aktivkohlehaltigen Agarplatten als weißes Luftmycel, das sich von den glatten Kolonien haploider Sporidien deutlich unterscheidet (Pulhalla, 1968; Rowell, 1955). Das Durchlaufen aller weiteren Entwicklungsschritte erfolgt jedoch erst bei der Interaktion mit der Wirtspflanze. Auf der Pflanzenoberfläche bildet das Dikaryon an geeigneter Stelle eine Infektionsstruktur aus, die Ähnlichkeiten mit den Appressorien anderer phytopathogener Pilze aufweist (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Bisher ist jedoch nicht bekannt, welche Pflanzensignale oder Oberflächenstrukturen die Appressorienbildung induzieren. Nach einer erfolgreichen Penetration wächst das filamentöse Dikaryon zunächst vorwiegend intrazellulär, jedoch ohne die Plasmamembran der Pflanzenzellen zu zerstören (Banuett und Herskowitz, 1994b; Snetselaar und Mims, 1994). Die infizierten Pflanzen reagieren darauf mit der Bildung von Chlorosen und Anthocyan, zeigen aber ansonsten keine offensichtliche Abwehrreaktion. Mit fortschreitender Infektion beginnen sich die Dikaryen zu teilen und etablieren ein Geflecht aus dikaryotischem Mycel (Abb. 1A; Banuett und Herskowitz, 1994b). Dies geht mit der Induktion der ersten Pflanzentumore etwa fünf Tage

nach der Infektion einher. In diesen Tumoren, die sich am Stamm, an den Blättern und an den Blüten bilden können, kommt es zur massiven Proliferation des filamentösen Mycels (Abb. 1A und C; Christensen, 1963; Banuett und Herskowitz, 1994b). Daraufhin erfolgt eine Fragmentierung der dikaryotischen Filamente zu sporogenen Hyphen, die nach der Karyogamie schließlich zu den diploiden Teliosporen ausdifferenzieren (Abb. 1B; Banuett und Herskowitz, 1996). Die reifen, von einer schwarz pigmentierten und ornamentierten Sporenhülle geschützten Teliosporen bilden den Hauptanteil reifer Tumoren (Abb. 1B und C).

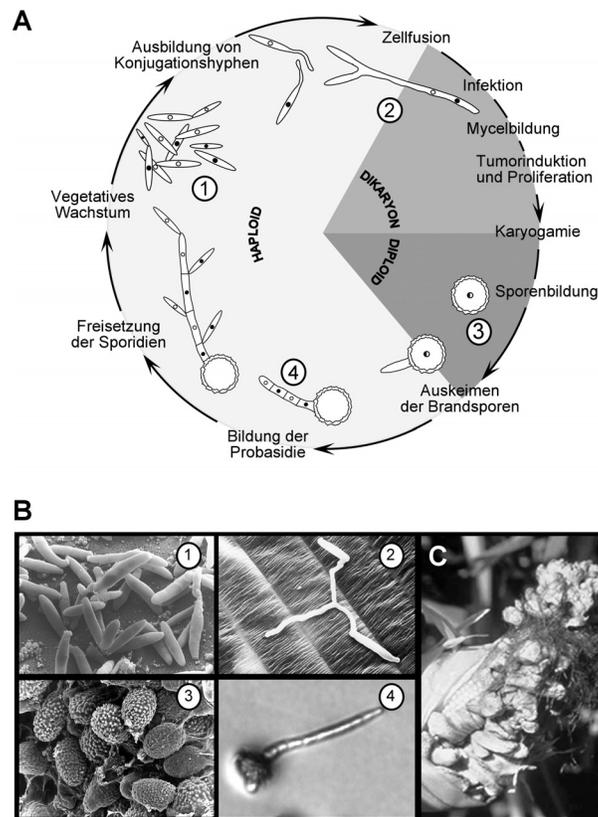


Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*. A) Schematische Darstellung des Lebenszyklus, Einzelheiten siehe Text. Die Zahlen beziehen sich auf die in B) dargestellten Stadien. B) Rasterelektronen- und Lichtmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Zellen. (1) Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ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

Beim Aufbrechen der Tumore werden die schwarzen Teliosporen freigesetzt und vermutlich über Wind und Regen verbreitet. Schließlich keimen die diploiden Teliosporen bei günstigen Bedingungen zu Probasidien aus, von denen sich nach der Meiose die haploiden Sporidien abschnüren (Abb. 1A und B; Christensen, 1963). Die Vollendung des Lebenszyklus erfordert

also mehrere diskrete morphologische Differenzierungsprozesse (Banuett, 2002; Kahmann *et al.*, 2000).

1.3 Kontrolle der sexuellen Entwicklung durch die Paarungstyploci

Die Progression durch die verschiedenen Stadien des Lebenszyklus wird in *U. maydis* durch zwei ungekoppelte Paarungstyploci, *a* und *b*, gesteuert. Das vollständige Durchlaufen aller Entwicklungsschritte kann nur erfolgen, wenn die Fusionspartner sich sowohl in ihren *a*- als auch in ihren *b*-Allelen unterscheiden (Holliday, 1961; Pulhalla, 1968; Rowell und DeVay, 1954). Eine solche Kombination von zwei Sporidien wird als kompatibel bezeichnet. Der *a*-Locus kommt in den zwei Allelen *a1* und *a2* vor, während für den *b*-Locus mindestens 33 Allele bekannt sind (Kahmann *et al.*, 1995; Rowell und DeVay, 1954). Die Paarungstyploci übernehmen diskrete Aufgaben beim Durchlaufen des Lebenszyklus. Der *a*-Locus kontrolliert die Fusion der Sporidien, während der *b*-Locus für die anschließende pathogene Entwicklung verantwortlich ist, und die Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons durch das koordinierte Zusammenspiel beider Loci gewährleistet wird (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1961; Pulhalla, 1968).

Die beiden Allele des *a*-Locus umfassen 4,5 kb (*a1*) bzw. 8,0 kb (*a2*) nicht-homologe Sequenzabschnitte, die von homologen DNA-Bereichen flankiert werden (Abb. 2; Bölker *et al.*, 1992; Froeliger und Leong, 1991). In Übereinstimmung mit einer Funktion bei der Zellfusion kodiert der *a*-Locus die Komponenten eines Zell-Zellerkennungssystems, welches die Diskriminierung zwischen *a1*- und *a2*-Sporidien erlaubt. Beide *a*-Loci tragen die Gene für ein Pheromonpräeptid Mfa (mating factor a) und einen Pheromonrezeptor Pra (pheromone receptor a) (Abb. 2; Bölker *et al.*, 1992). Der *a2*-Locus enthält

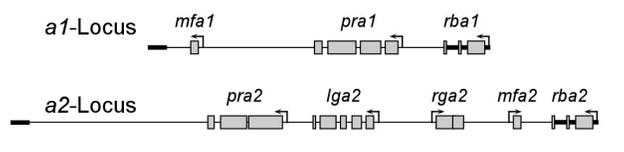


Abbildung 2: Der *a*-Locus kodiert für ein Pheromon-Pheromonrezeptorsystem. Schematische Darstellung des *a1*- und des *a2*-Locus. Auf der rechten Seite sind zusätzlich die außerhalb der *a*-Loci liegenden Gene *rba1* bzw. *rba2* angedeutet. Der *a1*- und der *a2*-Locus sind von homologen DNA-Flanken begrenzt (dicke Linie), die Rechtecke stehen für kodierende Bereiche.

zusätzlich zwei Gene unbekannter Funktion, *rga2* und *lga2* (Abb. 2; Urban *et al.*, 1996b). Die gegenseitige Erkennung kompatibler Sporidien wird durch die unterschiedliche Spezifität der Pheromone und ihrer Rezeptoren gewährleistet.

So aktiviert das *a2*-kodierte Pheromon Mfa2 ausschließlich den von kompatiblen *a1*-Sporidien exprimierten Pheromonrezeptor Pra1, während das *a1*-kodierte Pheromon Mfa1 den Pra2-Rezeptor bindet.

Jedes Allel des *b*-Locus trägt zwei divergent transkribierte Gene *bE* (*bEast*) und *bW* (*bWest*) (Abb. 3; Gillissen *et al.*, 1992). Die pathogene Entwicklung erfolgt nur dann, wenn nach der Fusion kompatibler Sporidien sowohl ein *bE*-Gen (z. B. *bE1*) als auch ein *bW*-Gen eines anderen *b*-Allels (*bW*≠1) vorliegen (Abb. 3). Die beiden von einem *b*-Allel kodierten

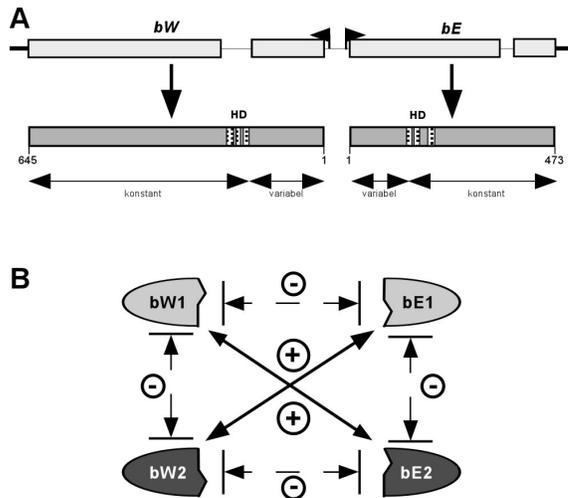


Abbildung 3: A) Der *b*-Locus kodiert für zwei Homeodomänen-Proteine *bW* und *bE*. In der schematischen Darstellung stehen die Rechtecke für kodierende Bereiche. Die Homeodomänen in *bW* und *bE* sind mit HD gekennzeichnet. Die Länge der Proteine ist in Aminosäuren angegeben. B) Allel-spezifische Dimerisierung der *b*-Proteine. *bW*- und *bE*-Proteine dimerisieren nur dann miteinander, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen.

Proteine *bE* und *bW* weisen untereinander nur eine geringe Homologie auf, zeigen jedoch einen sehr ähnlichen Aufbau. Der N-terminale Teil der Proteine wird als variable Region bezeichnet, da dieser Abschnitt sich in allen kompatiblen Allelen unterscheidet, während der C-terminale Bereich in allen *bE*- bzw. *bW*-Proteinen nahezu identisch ist, und somit als konstante Region bezeichnet wird (Abb. 3; Kronstad und Leong, 1990). Im Übergang zu der konstanten Region enthalten sowohl die *bE*- als auch die *bW*-Proteine eine Homeodomäne. Diese in Transkriptionsfaktoren zahlreicher Eukaryoten zu findende Domäne stellt ein 'helix-turn-helix'-DNA-Bindemotiv dar. Ein aktiver Transkriptions-

faktor entsteht dabei durch eine Dimerisierung von *bE*- und *bW*-Proteinen. Diese Heterodimerisierung über die variablen Regionen der *b*-Proteine ist jedoch ausschließlich zwischen von verschiedenen Allelen stammenden *bE*- und *bW*-Proteinen möglich (Abb. 3; Kämper *et al.*, 1995). Das aktive *bE/bW*-Heterodimer reguliert schließlich direkt und indirekt die Expression einer Vielzahl von Genen (Brachmann *et al.*, 2001; Romeis *et al.*, 2000; M. Scherer und J. Kämper, pers. Mitteilungen). Die Anwesenheit eines kompatiblen *bE1/bW2* Genpaares, wie z. B. in dem konstruierten haploiden Stamm CL13, ist für die pathogene Entwicklung ausreichend; eine vorherige Zellfusion ist in diesem Fall nicht erforderlich (Bölker *et al.*, 1995a). Man spricht daher von haploid-solopathogenen Stämmen.

1.4 Die Pheromonantwort in *U. maydis*

In *U. maydis* leitet die Perzeption des Pheromonsignals die initialen Schritte der sexuellen Entwicklung ein, wie die Erkennung und Fusion kompatibler Sporidien und die anschließende Etablierung des pathogenen Dikaryons. Die damit einhergehenden morphologischen und transkriptionellen Veränderungen werden zusammenfassend als Pheromonantwort bezeichnet.

Der morphologische Zweig der Pheromonantwort umfasst in erster Linie die Bildung von gerichtet auf eine Pheromonquelle zuwachsenden Konjugationshyphen. Ihre Entwicklung ist charakterisiert durch den Wechsel von dem bipolaren Knospungsmuster der unstimulierten Zellen zum monopolen, filamentösen Wachstum der Konjugationshyphen (Snetselaar *et al.*, 1996). Desweiteren induziert das Pheromonsignal einen Zellzyklusarrest in der postreplikativen G₂-Phase (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Die Fusion der Konjugationshyphen von zwei kompatiblen Sporidien führt zur Bildung des filamentösen Dikaryons (Banuett und Herskowitz, 1994b), dessen Aufrechterhaltung durch die autokrine Pheromonstimulation und ein aktives b-Heterodimer gewährleistet wird (Banuett und Herskowitz, 1989).

Die transkriptionelle Antwort umfasst die Pheromon-induzierte Expression der Gene im *a*- und *b*-Locus (Urban *et al.*, 1996b). Die induzierte Expression des Pheromons Mfa bewirkt dabei eine gesteigerte Stimulation des Kreuzungspartners, während die erhöhte Expression des Pheromonrezeptors Pra die Perzeption des Pheromonsignals verstärkt. Diese positive Rückkopplung ermöglicht vermutlich auch über größere Distanzen das gerichtete aufeinander Zuwachsen der Konjugationshyphen (Snetselaar *et al.*, 1996). Die Pheromon-induzierte Transkription der *b*-Gene sorgt bereits vor der Zellfusion für ausreichende Mengen der b-Proteine (Urban *et al.*, 1996b), so dass sich unmittelbar nach der Fusion die aktiven bE/bW-Heterodimere bilden. Die autokrine Pheromonstimulation des entstandenen Dikaryon gewährleistet die Expression der aktiven bE/bW-Heterodimere (Urban *et al.*, 1996b).

1.5 Signaltransduktion während der Zell-Zellerkennung und der pathogenen Entwicklung

Die Pheromonantwort erfolgt über zwei konservierte Signaltransduktionswege: eine cAMP-Signalkaskade und ein MAP-Kinase-Modul.

Die Hauptkomponenten des cAMP-Signalwegs sind die α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins Gpa3 (Müller *et al.*, 2003; Regenfelder *et al.*, 1997), die Adenylatzyklase Uac1 und eine cAMP-aktivierte Proteinkinase A (PKA), die sich aus der regulatorischen (Ubc1) und der katalytischen Untereinheit Adr1 zusammensetzt (Gold *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998). Die Adenylatzyklase Uac1 wird von Gpa3 aktiviert, der daraufhin ansteigende intrazelluläre cAMP-Spiegel führt zur Dissoziation der regulatorischen Untereinheit Ubc1 der

PKA, wodurch die freigesetzte katalytische Untereinheit Adr1 aktiv wird (Abb. 4). Das Signal, das diese Kaskade aktiviert, ist nicht bekannt. Das Pheromonsignal scheint jedoch zumindest eine transiente Aktivierung dieses Signalweges zu bewirken (Abb. 4), da die Deletionen von *gpa3*, *uac1* oder *adr1* Defekte in der Pheromon-induzierten *a*-Genexpression und eine Reduktion der Paarungskompetenz zeigen (Müller *et al.*, 2003b; Regenfelder *et al.*, 1997, Dürrenberger *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 1998; Gold *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu führt eine Aktivierung der Kaskade, die durch die Zugabe von exogenem cAMP, die Expression des dominant aktiven *gpa3*_{Q206L}-Allels oder die Deletion der regulatorischen Untereinheit Ubc1 der Proteinkinase A simuliert werden kann, zur starken Induktion der Pheromongenexpression (Hartmann *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1999; Regenfelder *et al.*, 1997). Diese Mutationen lösen jedoch keine Konjugationshyphenbildung aus, sondern beeinträchtigen im Gegenteil die Effizienz der Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation (Müller, 2003). Desweiteren erfolgt die Konjugationshyphenbildung auch in *gpa3*-Deletionsmutanten in denen eine Weiterleitung des Pheromonsignals über den cAMP-Signalweg nicht mehr möglich ist (Müller, 2003). Der cAMP-Signalweg ist also für die transkriptionelle Pheromonantwort, nicht jedoch für die Konjugationshyphenbildung essenziell.

Neben dem cAMP-Signalweg ist ein konserviertes MAP-Kinase-Modul für die Weiterleitung des Pheromonsignals entscheidend (Abb. 4). Das unterhalb des Pheromonrezeptors Pra agierende MAP-Kinase-Modul setzt sich aus der MAPKK-Kinase Kpp4, der MAPK-Kinase Fuz7 und der MAP-Kinase Kpp2 zusammen (Abb. 4; Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999 und 2003). In Bezug auf die Zellmorphologie wirken der cAMP-Signalweg und das MAP-Kinasemodul antagonistisch. So wurden neben der regulatorischen Untereinheit der PKA, *Ubc1* (*Ustilago bypassing cyclase*'), auch alle Komponenten der MAPK-Kaskade in einem Ansatz zur Identifizierung von Suppressoren des filamentösen Phänotyps von *uac1*-Deletionsmutanten gefunden (Kpp4/Ubc4; Fuz7/Ubc5 und Kpp2/Ubc3) (Mayorga und Gold, 1999; Andrews *et al.*, 2000). Sowohl *kpp4*- als auch *fuz7*-Deletionsmutanten zeigen in Kreuzungen einen weitgehenden Verlust der Dikaryenbildung und sind nicht in der Lage Pflanzen zu infizieren (Banuett und Herskowitz, 1994a; Andrews *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2003). Die Deletion des MAP-Kinasegens *kpp2* bewirkt hingegen nur eine Attenuation der Pathogenität (Müller *et al.*, 1999 und 2003; Mayorga und Gold, 1999). Die in *kpp2*-Deletionsmutanten lediglich reduzierte Pathogenität erklärt sich aus teilweise redundanten Funktionen der beiden MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 bei der Ausbildung der Infektionsstrukturen (Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003). Durch detaillierte Untersuchungen mit nicht-phosphorylierbaren Versionen von

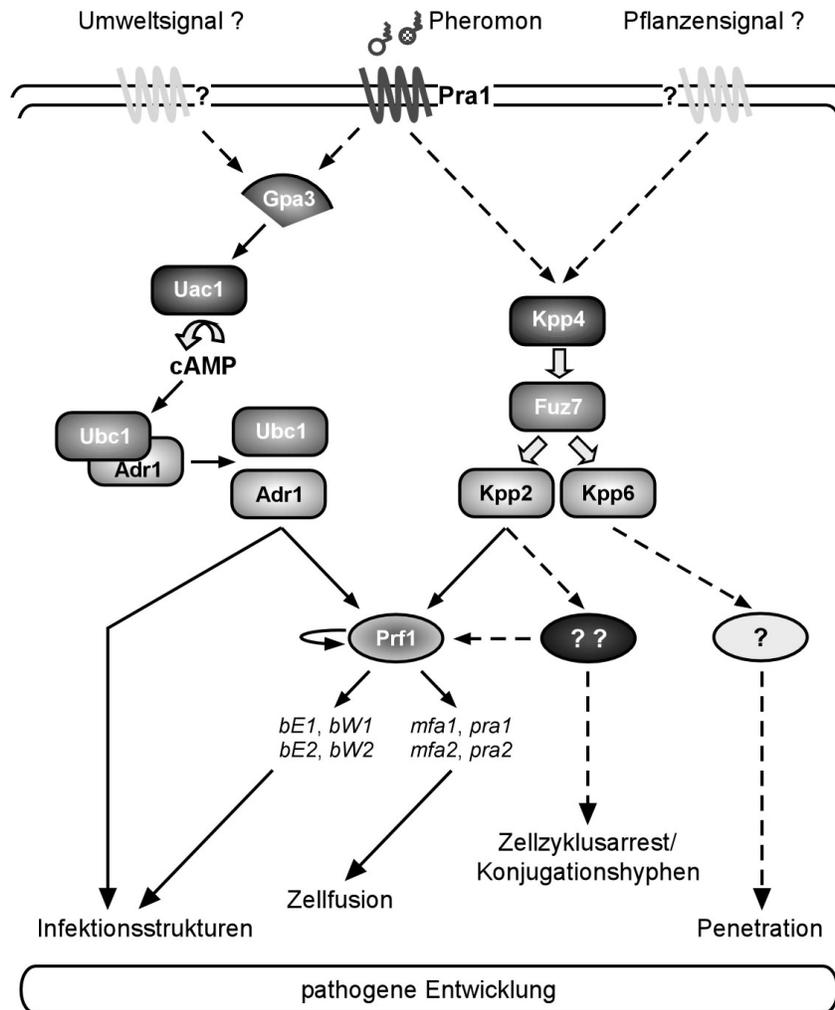


Abbildung 4: Signalweiterleitung während der Pheromonantwort und der pathogenen Entwicklung.

Die Pheromonstimulation führt zu einer Aktivierung von Prf1. Prf1 induziert die Expression der *a*- und *b*-Locus Gene sowie, autoregulatorisch, die des *prf1*-Gens. Die $G\alpha$ -Untereinheit Gpa3 und der cAMP-Signalweg sind an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt (siehe Text). Außerdem könnten diese Komponenten Umweltsignale weiterleiten, die den Paarungsprozess beeinflussen. Das Kpp2-MAPK-Modul aktiviert nicht nur das Prf1-Protein, sondern induziert zusätzlich die *prf1*-Expression. Außerdem induziert das MAPK-Modul die Konjugationshyphenbildung. Demnach könnten ein oder mehrere weitere Transkriptionsfaktoren existieren, die die transkriptionelle *prf1*-Induktion sowie die Konjugationshyphenbildung kontrollieren. Während der pathogenen Entwicklung sorgen vermutlich Umwelt- und/oder Pflanzensignale für eine Aktivierung des MAPK-Moduls. Die MAPK Kpp2 vermittelt dabei über Prf1 die Expression aktiver *b*-Heterodimere. Zusätzlich ist Kpp2 für die Ausbildung von Infektionsstrukturen erforderlich, während die MAPK Kpp6 für die Penetration der Pflanzenoberfläche benötigt wird. Dabei könnte Kpp6 einen weiteren Transkriptionsfaktor kontrollieren. Unabhängig davon ist auch der cAMP-Signalweg für die pathogene Entwicklung notwendig. Pfeile stehen für aktivierende Einflüsse, wie Phosphorylierung und transkriptionelle Induktionen. Gestrichelte Pfeile stellen postulierte bzw. über bisher unbekannte Komponenten erfolgende Interaktionen dar.

Kpp6 (Kpp6AEF) und Kpp2 (Kpp2AEF) konnte gezeigt werden, dass Kpp2 zur Ausbildung der Appressorien benötigt wird, während Kpp6 zur anschließenden Penetration der Pflanzenoberfläche erforderlich ist (Abb. 4; Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003). *MST12*-Mutanten in *Magnaporthe grisea* zeigen einen vergleichbaren Phänotyp wie *kpp6AEF*-Mutanten in *U. maydis*. In *M. grisea* wird der von der MAP-Kinase Pmk1 kontrollierte Ste12-ähnliche Homeodomänen Transkriptionsfaktor Mst12 für die Regulation der Pflanzenpenetration, aber nicht für die Entwicklung der Appressorien benötigt (Park *et al.*, 2002). In *U. maydis* könnten die Penetration der Pflanzenoberfläche und das anschließende invasive Wachstum folglich ebenfalls durch einen Transkriptionsfaktor gesteuert werden, der von Kpp6 aber nicht von Kpp2 reguliert wird (Abb. 4). Die Expression konstitutiv aktiver Versionen der MAPKK-Kinase Kpp4 oder der MAPK-Kinase Fuz7 führt zur transkriptionellen Aktivierung der Paarungstypgene und zur Ausbildung von Konjugationshyphen; diese Effekte erfordern die Anwesenheit der MAP-Kinase Kpp2 (Abb. 4; Müller *et al.*, 2003). Für die Differenzierung zu Konjugationshyphen sind sowohl die Kinaseaktivität als auch eine intakte Phosphatakzeptorstelle (TEY) im 'T-Loop' von Kpp2 unentbehrlich, wohingegen die Kinaseaktivität für die Pheromon-induzierte Expression des Pheromons nicht essenziell ist (Müller *et al.*, 2003).

Während cAMP-Signalweg und MAP-Kinase-Modul auf die Morphologie vegetativ wachsender Zellen antagonistisch wirken, sind sie gemeinsam für die Regulation von Zellfusion und Pathogenität verantwortlich (Abb. 4). Dies erklärt sich unter anderem daraus, dass sowohl die Proteinkinase A (Ubc1/Adr1) als auch die MAP-Kinase Kpp2 die Aktivität des für die Expression der *a*- und *b*-Gene essenziellen Transkriptionsfaktors Prf1 regulieren (Abb. 4; Hartmann *et al.*, 1996 und 1999; Müller *et al.*, 1999 und 2003; Kaffarnik *et al.*, 2003).

1.6 Prf1, ein zentraler Regulator der Pheromonantwort in *U. maydis*

Der zur Familie der HMG ('*high mobility group*')-Domänen-Proteine gehörende Transkriptionsfaktor Prf1 ist für die basale und Pheromon-induzierte Transkription der *a*- und *b*-Gene essenziell (Abb. 4; Hartmann *et al.*, 1996). Aus diesem Grund können *prf1*-Deletionsmutanten ein Pheromonsignal nicht wahrnehmen und sind folglich auch nicht in der Lage mit Wildtypzellen zu fusionieren. Prf1 ist somit ein zentraler Regulator der Pheromonantwort. Die Prf1-vermittelte basale und Pheromon-induzierte Transkription der Paarungstypgene erfolgt über PRE-Boxen ('*pheromone response elements*') in den Promotoren der *a*- und *b*-Gene (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996a). Bei den *cis*-aktiven PREs handelt es sich um das neun Basenpaare umfassende Sequenzmotiv

ACAAAGGGA, das sich in zum Teil mehrfacher Wiederholung in den regulatorischen Regionen dieser Gene findet (Urban *et al.*, 1996a). Die sequenzspezifische Bindung von Prf1 an dieses Promotorelement erfolgt dabei über die konservierte HMG-DNA-Bindedomäne des Proteins (Hartmann *et al.*, 1996). Die Transkription von *prf1* unterliegt einer komplexen Kontrolle durch das Pheromonsignal und Umweltfaktoren. Neben zwei vermutlich eine Autoregulation vermittelnden PRE-Boxen umfasst der *prf1*-Promotor das regulatorische UAS-Element (*'upstream activatig sequence'*), welches die *prf1*-Expression in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot und der Kohlenstoffquelle reguliert (Hartmann *et al.*, 1999). Der Verlust dieser transkriptionellen Regulation führt, wie die Deletion von *prf1*, zur Sterilität. Zusätzlich wird die Aktivität des Prf1-Proteins über Phosphorylierungen an PKA- und MAPK-Phosphorylierungsstellen durch die beiden oben beschriebenen Signaltransduktionswege reguliert (Abb. 4; Kaffarnik *et al.*, 2003). Punktmutationen in den MAPK-Phosphorylierungsstellen führen zu einer stark verminderten Pheromon-Induzierbarkeit der *b*-Gene, zeigen jedoch eine normale Pheromon-induzierte *a*-Genexpression (Müller *et al.*, 1999; Kaffarnik *et al.*, 2003). Die bei einer genetischen Aktivierung des MAPK-Moduls induzierte *a*-Genexpression basiert folglich nicht auf einer Aktivierung/Phosphorylierung des Prf1-Proteins, sondern vielmehr auf einer erhöhten Transkription des *prf1*-Gens (Müller *et al.*, 1999 und 2003; Kaffarnik *et al.*, 2003). Vorstellbar ist die Existenz eines weiteren Transkriptionsfaktors als Zielprotein der MAP-Kinase Kpp2, der für die Induktion der *prf1*-Expression durch das MAPK-Modul verantwortlich ist (Abb. 4).

Obwohl Prf1 als zentraler Regulator der transkriptionelle Pheromonantwort für die sexuelle Entwicklung absolut erforderlich ist, wird *prf1* für die morphologische Antwort, die Konjugationshyphenbildung, nicht benötigt (Müller *et al.*, 2003). Wird in *prf1*-Deletionsstämmen der Pheromonrezeptor Pra konstitutiv exprimiert, reagieren die Zellen auf eine Pheromonstimulation mit der Ausbildung von Konjugationshyphen, weisen jedoch keine Expression der pheromoninduzierbaren *a*- und *b*-Gene auf (Müller *et al.*, 2003). Entsprechendes gilt auch für *prf1*-Deletionsstämme, in denen die Notwendigkeit der Perzeption eines Pheromonsignals durch eine genetische Aktivierung des MAPK-Moduls umgangen wird (Müller *et al.*, 2003). *prf1* ist also für die basale und Pheromon-induzierte Expression der Pheromon- und Rezeptorgene essenziell, reguliert aber nicht die ebenfalls Pheromon-induzierte Konjugationshyphenbildung (Abb. 4). Die MAP-Kinase Kpp2 muss demnach mindestens einen weiteren Faktor aktivieren, der für die Ausbildung der Konjugationshyphen verantwortlich ist (Abb. 4).

1.7 Transkriptionsfaktoren als Effektoren pilzlicher Pheromon-MAPK-Kaskaden

Konservierte MAPK-Signalwege spielen auch in anderen bekannten Pilzen eine zentrale Rolle bei der Integration des Pheromonsignals. Dabei erfordert die Umsetzung der Pheromonantwort häufig die Weiterleitung des Signals von einer aktivierten MAPK auf einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren, die als Effektoren der MAPK-Module transkriptionelle und morphologische Differenzierungsprozesse regulieren.

In *Saccharomyces cerevisiae* wird das aus Ste11p (MAPKKK), Ste7p (MAPKK) und Fus3p (MAPK) bestehende MAPK-Modul durch das Pheromonsignal aktiviert (Abb. 5; Gustin *et al.*, 1998 und darin enthaltenen Referenzen). Daraufhin kommt es neben der Ausbildung von sogenannten 'Shmoos', die auf den Partner zuwachsen, zu einem Zellzyklusarrest sowie zur erhöhten Expression von Genen, die für die Zellfusion benötigt werden (Gustin *et al.*, 1998; Leberer *et al.*, 1997 und darin enthaltenen Referenzen). Die aktivierte MAPK Fus3p phosphoryliert die beiden Proteine Rst1p (Dig1p) und Rst2p (Dig2) sowie Far1p. Phosphoryliertes Far1p induziert den Zellzyklusarrest und wird für das gerichtete Wachstum der Shmoos benötigt (Abb. 5; Elion, 2000 und darin enthaltene Referenzen). Die Phosphorylierung der Proteine Rst1p und Rst2p durch Fus3p führt zur Freisetzung des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors Ste12p. Der Transkriptionsfaktor Ste12p bindet, analog zu Prf1 in *U. maydis*, an PRE-Boxen und vermittelt die basale und Pheromon-induzierte Genexpression (Abb. 5; Hagen *et al.*, 1991). Befinden sich in einem Promotor mehrere PRE-Boxen, kann aktiviertes Ste12p als Homomultimer die Transkription induzieren, einzelne PRE-Boxen werden von Ste12p jedoch nur schwach gebunden, so dass zur transkriptionellen Aktivierung zusätzlich der akzessorische Transkriptionsfaktor Mcm1p benötigt wird (Dolan *et al.*, 1989; Yuan *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu Prf1 in *U. maydis* reguliert Ste12p in *S. cerevisiae* sowohl die transkriptionelle als auch die morphologische Pheromonantwort (Roberts *et al.*, 2000).

In *Schizosaccharomyces pombe* setzt sich das Pheromon-MAPK-Modul aus Byr2 (MAPKKK), Byr1 (MAPKK) und Spk1 (MAPK) zusammen (Abb. 5). Die Aktivierung der Kaskade durch ein Pheromonsignal resultiert in der Ausbildung kurzer Konjugationshyphen, hierüber erfolgt die Zellfusion und daraufhin werden unmittelbar Meiose und Sporulation durchlaufen (Banuett, 1998; Yamamoto, 1996 und darin enthaltene Referenzen). Der zentrale Transkriptionsfaktor Ste11 gehört, wie sein *U. maydis*-Homolog Prf1, zur Familie der sequenzspezifischen HMG-Domänen-Proteine und ist ebenfalls für die Expression der Paarungstypgene essenziell (Abb. 5). Ste11 induziert die Expression der zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren Mat1-Mc (in M-Zellen) bzw. Mat1-Pc (in P-Zellen) (Banuett, 1998). Die Interaktion von Ste11 mit dem HMG-Domänenprotein Mat1-Mc ermöglicht daraufhin die

Expression der Pheromon- und Pheromonrezeptorgene (Kjaerulff *et al.*, 1997; Dooijes *et al.*, 1993). In *S. pombe* erfordert die Pheromonantwort folglich die konzertierte Aktion der zwei sequenzspezifischen HMG-Domänen-Proteinen Ste11 und Mat1-Mc.

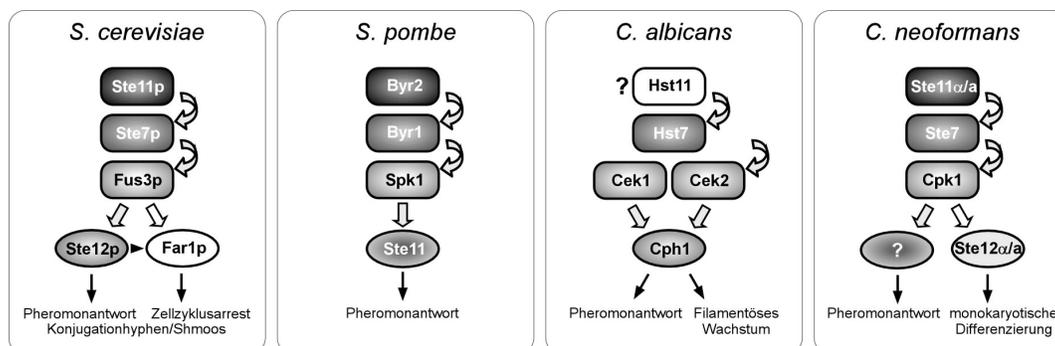


Abbildung 5: Transkriptionsfaktoren als Effektoren pilzlicher Pheromon-MAPK-Kaskaden. Dargestellt sind die Hauptkomponenten der Pheromon-MAPK-Module der angegebenen Asco- bzw. Basidiomyceten. Als Effektoren der aktivierten MAP-Kinasen sind Transkriptionsfaktoren entscheidend an der Integration des Pheromonsignals zu zellulären Antworten beteiligt. Die dargestellten Regulatoren gehören zwei unterschiedlich Proteinfamilien an: den Ste12p-ähnlichen Homeodomänen-Proteinen (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans*) oder der sequenzspezifischen Klasse der HMG-Domänen-Proteine (*S. pombe*). Für *S. cerevisiae* ist zusätzlich das Far1p Protein dargestellt, das Zellzyklus und morphologische Pheromonantwort koordiniert. Pfeile stehen für Phosphorylierung und/oder transkriptionelle Aktivierung. Erläuterungen siehe Text.

In dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* wurde erst kürzlich ein sexueller Zyklus nachgewiesen (Hull *et al.*, 2000; Hull und Johnson, 1999; Magee und Magee, 2000). Die MAPKK Hst7 und die beiden eng verwandten, funktionell redundanten MAPK Cek1 und Cek2 sind dabei für die Zellfusion erforderlich (Abb. 5; Chen *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2002). Unterhalb dieses Moduls reguliert der Ste12-ähnliche Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Cph1 die Expression von zu *S. cerevisiae* orthologen, Pheromon-induzierten Genen (Abb. 5; Chen *et al.*, 2002). Desweiteren ist Cph1 für die Zellfusion essenziell (Chen *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2002). Die Komponenten des MAPK-Moduls sowie der Ste12-ähnliche Transkriptionsfaktor Cph1 sind außerdem entscheidend an der Regulation des filamentösen Wachstum beteiligt (Abb. 5; Lengeler *et al.*, 2000 und darin enthaltene Referenzen).

In dem humanpathogenen Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* setzt sich die Pheromon-MAPK-Kaskade aus den zelltypspezifischen MAPKKK Ste11 α/a und wahrscheinlich den in beiden Zelltypen (α/a) vorkommenden Kinasen Ste7 (MAPKK) und Cpk1 (MAPK) zusammen (Abb. 5; Lengeler *et al.*, 2000; Hull und Heitmann, 2002 und darin enthaltene Referenzen). Dieses Modul hat neben seiner Rolle bei der Pheromonantwort auch eine wichtige Funktion bei der Pheromon-induzierbaren Differenzierung haploider α -Zellen,

die als 'monokaryotic fruiting' bezeichnet wird (Abb. 5). Ein zentraler Transkriptionsfaktor, der die Pheromonantwort direkt reguliert, ist in *C. neoformans* bisher nicht identifiziert worden (Abb. 5). Der Zelltyp-spezifischen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Ste12 α /a moduliert zwar die Fusionskompetenz haploider Zellen (Wickes *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2000, 2001 und 2004), wird jedoch weder für die Konjugationshyphenbildung noch für die Expression der Pheromogene benötigt (Chang *et al.*, 2003). Ste12 ist demnach in *C. neoformans* wahrscheinlich eher indirekt an der Pheromon-Signaltransduktion über das MAPK-Modul beteiligt.

In *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. neoformans* dienen also Transkriptionsfaktoren der Ste12-Familie als Effektoren der Pheromon-MAPK-Kaskaden, während diese Funktion in *S. pombe* (Ste11 und Mat1-Mc) und *U. maydis* (Prf1) von sequenzspezifisch DNA-bindenden HMG-Domänen-Proteinen ausgeübt wird. Die Ste12-Familie ist durch die konservierte Homeo-Box-DNA-Bindedomäne charakterisiert. In dem Basidiomyceten *C. neoformans* und sieben weiteren Pilzen enthalten die Ste12-homologen Proteine zusätzlich zwei C₂H₂-Zinkfinger (Liu *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2004). Die Zinkfingerdomäne fehlt jedoch den Ste12-Proteinen der ascomyceten Hefen *S. cerevisiae* (Ste12) und *C. albicans* (Cph1). Als zentrale Effektoren der Pheromon-MAPK-Module verschiedener Pilze fungieren also hauptsächlich Transkriptionsfaktoren aus zwei Proteinfamilien.

1.8 Fragestellung dieser Arbeit

In *U. maydis* kontrolliert das Kpp2-MAPK-Modul die transkriptionelle und morphologische Pheromonantwort. Dabei kommt es vermutlich unterhalb der MAPK Kpp2 zur Verzweigung des Signalweges. Während die transkriptionelle Antwort von dem sequenzspezifischen HMG-Domänen-Transkriptionsfaktor Prf1 reguliert wird, beeinflusst Prf1 den morphologischen Wechsel zur Konjugationshyphenbildung nur indirekt. Bisher ist kein Konjugationshyphen-spezifisches Zielgen von Kpp2 bekannt. Desweiteren ist unklar, wie die Pheromoninduktion der *prf1*-Transkription über die MAPK-Kaskade erreicht wird. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass neben Prf1 weitere Effektoren der MAPK-Kaskade an der Regulation der Pheromonantwort beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher weitere an der Pheromonantwort von *U. maydis* beteiligte Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Ein besonderes Interesse galt dabei unterhalb der Pheromon-MAPK-Kaskade agierenden Komponenten, insbesondere im Hinblick auf bisher unbekannte Regulatoren der *prf1*-unabhängige Konjugationshyphenbildung.

2 ERGEBNISSE

2.1 Potenziell unterhalb der Pheromon-MAPK-Kaskade agierende Transkriptionsfaktoren

Der zentrale HMG-Domänen-Transkriptionsfaktor Prf1 ist essenziell für die Pheromon-induzierte Genexpression und die pathogene Entwicklung, wird jedoch nicht für den morphologischen Wechsel zur Konjugationshyphenbildung benötigt (Müller *et al.*, 2003). Wie in der Einleitung näher beschrieben, wird das filamentöse Wachstum der pathogenen Pilze *C. neoformans* und *C. albicans* durch Ste12-ähnliche Homeodomänenproteine reguliert. Ein Ste12-ähnliches Protein könnte auch eine Rolle in der Hyphenbildung von *Ustilago* spielen. Bei der BLAST-gestützten Homologiesuche (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) in der vorliegenden *U. maydis*- Genomsequenz konnte jedoch kein Vertreter dieser Familie von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Eine andere Familie von konservierten Transkriptionsfaktoren, von denen eine Vielzahl entscheidende Funktionen bei der sexuellen Entwicklung von Pilzen spielen, stellt die Gruppe der HMG-Domänen-Proteine dar, zu der auch Prf1 gehört. Über eine Durchmusterung der Genomsequenz sollten weitere HMG-Box-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden und ggf. auf ihre Beteiligung an Entwicklungsprozessen, u. a. an der Bildung von Konjugationshyphen, untersucht werden.

2.1.1 Das *Ustilago maydis*-Genom kodiert für acht Transkriptionsfaktoren der HMG-Box Familie

Um weitere Vertreter der HMG-Box-Familie zu identifizieren wurden die hochkonservierten HMG-Box-DNA-Bindedomänen bekannter Vertreter dieser Transkriptionsfaktorfamilie zu einer Homologiesuche in der *U. maydis*-Genomsequenz genutzt. Dieser *in silico* Ansatz führte zu der Identifizierung von acht HMG-Boxen in der *Ustilago*-Genomsequenz. Die große Familie der HMG-Domänen-Proteine wird aufgrund der charakteristischen DNA-Bindedomänen in unspezifisch und spezifisch DNA-bindende Klassen unterteilt. Um die identifizierten HMG-Domänen einer dieser Klassen zuordnen zu können, wurden sie zusammen mit bereits beschriebenen HMG-Boxen aus anderen Pilz- und Hefespezies einer phylogenetischen Analyse nach dem 'Bootstrap'-Verfahren (Thompson *et al.*, 1994) unterzogen (Abb. 6A).

Die vergleichende Analyse ermöglichte die Zuordnung von sechs der identifizierten HMG-Boxen zu der unspezifisch DNA-bindenden Klasse (Abb. 6A). Darunter befindet sich auch das bereits untersuchte Dia1 (J. Kämper, pers. Mitteilung). Desweiteren werden zwei der

gefundenen HMG-Domänen des unspezifischen Typs von einem ORF kodiert (Abb. 6A; 48_420A und 48_420B), so dass das abgeleitete Protein zwei HMG-Domänen beinhaltet.

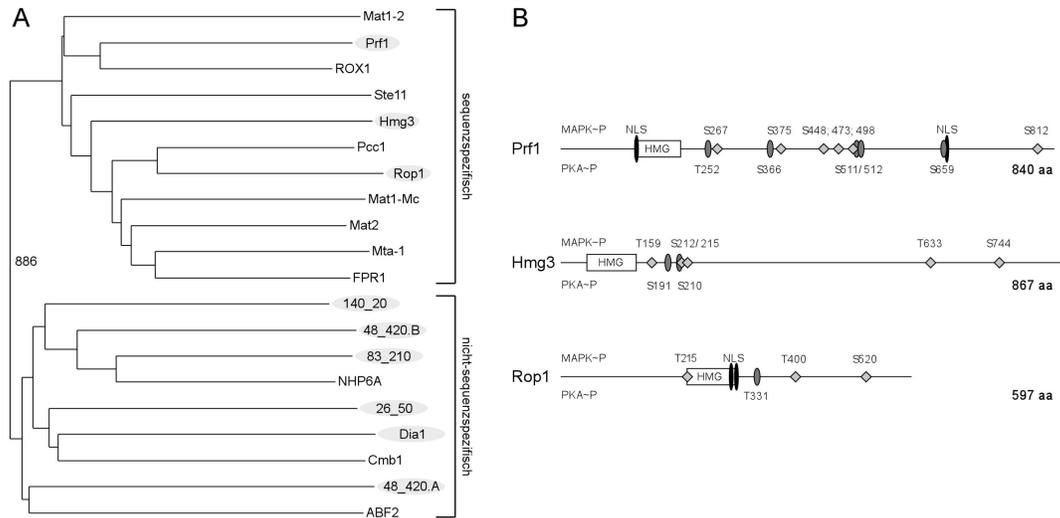


Abbildung 6: Das *U. maydis*-Genom kodiert für acht Transkriptionsfaktoren der HMG-Familie.

A) Ein phylogenetischer Vergleich der neun identifizierten vom *U. maydis*-Genom kodierten HMG-Domänen (grau hinterlegt) mit verschiedenen pilzlichen HMG-DNA-Bindedomänen. HMG-Domänen können, wie angegeben, in eine sequenzspezifisch und eine nicht-sequenzspezifisch DNA-bindende Gruppe unterteilt werden (siehe Text). Die Analyse wurde mit ClustalW 1.8 vorgenommen (Thompson *et al.*, 1997). **B) Schematische Darstellung der Proteinmerkmale von Rop1 und Hmg3 im Vergleich zu Prf1.** Die HMG-Domänen sind als beschriftete Rechtecke dargestellt. Die hellgrauen Rauten markieren MAPK-Phosphorylierungsstellen (MAPK-P), die dem Konsensus L/PXS/TP (Clark-Lewis *et al.*, 1991) entsprechen. Putative PKA-Phosphorylierungsstellen (PKA-P) sind durch dunkelgraue Ellipsen und potenzielle Kernlokalisationsequenzen (NLS; 'nuclear localisation signal') durch beschriftete Balken gekennzeichnet. Über bzw. unter den jeweiligen Proteinen sind die Aminosäurereste und -positionen der putativen Phosphorylierungsstellen (MAPK-P bzw. PKA-P) angegeben. Die Analyse auf potenzielle Erkennungssequenzen erfolgte über PrositeScan- (<http://psort.nibb.jp>) und PSORT-Suchmaschinen (<http://www.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>). **ad A)** Die in die unspezifischen DNA-bindende Gruppe fallenden *Ustilago*-Proteine sind über die angegebenen Annotationsnummern in der GENRE-Datenbank (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) zu finden (Dia1: 83_210). Weitere Annotationen: ABF2₄₃₋₁₁₁ (sp|Q02486), NHP6A₂₁₋₈₉ (sp|P11632) und ROX1₁₀₋₈₃ (sp|P25042) von *S. cerevisiae*; Cmb1₁₄₁₋₂₂₀ (sp|Q10241), Mat1-Mc₁₀₃₋₁₇₁ (sp|P10840) und Ste11₁₆₋₈₀ (sp|P36631) von *S. pombe*; FPR1₁₆₉₋₂₃₇ (sp|P35693) von *Podospora anserine*, Mat1-2₁₂₉₋₂₀₃ (pir|S34811) von *Cochliobulus heterostrophus*; Mat2 (dbj|BAA75905.1) von *Gibberella fujikuroi*; Mt a-1₁₁₆₋₁₈₄ (sp|P36981) von *Neurospora crassa*, Pcc1₂₄₋₉₈ (dbj|BAA33018.1) von *Coprinus cinereus* und Prf1₁₂₆₋₁₉₇ (gb|AAC32739); Hmg3₅₇₋₁₄₀ (gb|AY677183) und Rop1₂₁₅₋₂₉₅ (gb|AY677184) von *U. maydis*. Die tiefgestellten Ziffern geben die Aminosäurepositionen der untersuchten HMG-Domänen in den jeweiligen Proteinen an.

Diese Organisation trifft auch auf HMG-1 und HMG-2, die zwei namensgebenden Vertreter der unspezifisch DNA-bindenden Gruppe zu (Grosschedl *et al.*, 1994; Thomas, 2001). Im folgenden lag der Fokus jedoch auf sequenzspezifisch DNA-bindenden Vertretern der HMG-

Box-Familie, die sich durch eine einzelne HMG-Box auszeichnen. Neben Prf1 konnten zwei weitere sequenzspezifisch DNA-bindende Vertreter dieser Familie identifiziert werden, Hmg3 und Rop1 (Abb. 6B).

2.1.2 *hmg3* kodiert für ein sequenzspezifisch DNA-bindendes HMG-Domänen-Protein

Zu Beginn dieser Arbeit lag zunächst nur die von BayerCropScience erstellte genomische *U. maydis*-Sequenz vor. Diese enthielt jedoch keinen Hinweis auf ein drittes sequenzspezifisches HMG-Domänen-Protein neben Prf1 und Rop1. Erst die erneute Sequenzierung des *Ustilago*-Genoms durch das Broad Institut (2003) lieferte zusätzliche Sequenzinformation, deren *in silico* Analyse zu der Identifizierung des *hmg3*-Gens führte. Zur Bestätigung der *hmg3*-Sequenz wurde daraufhin ein genomischer Cosmid-Subklon isoliert, welcher das *hmg3*-Gen beinhaltet. Die Sequenzierung ergab, dass *hmg3* einen 2604 bp (Basenpaare) offenen Leserahmen (ORF, 'open reading frame') umfasst (GenBank Nummer: AY677183). Der Intron freie 2604 bp ORF kodiert folglich für ein Polypeptid von 867 Aminosäuren (aa, 'amino acids') Länge. Im Vergleich dazu enthält die über das Broad Institut öffentlich zugängliche Genomsequenz einen +1 Rasterschub an bp-Position 1466 des *hmg3*-ORFs, der dadurch eine Länge von nur 1716 bp aufweist. Dieser Unterschied könnte zum einen auf Fehler bei der Sequenzierung zurückzuführen sein, alternativ könnte es sich um Allele des *hmg3*-Gens handeln. Letzteres ist denkbar, da zur Sequenzierung des *U. maydis*-Genoms der Stamm 521 verwendet wurde, während in dieser Arbeit ein genomischer Cosmid-Subklon des Stammes FBD11 sequenziert wurde. Hierfür spricht auch, dass der N-terminale Teil, der u. a. die HMG-Domäne zwischen den Aminosäuren 57 und 143 umfaßt, in beiden Varianten identisch ist. Die HMG-Domäne zeigt mit 37,3% Sequenzidentität (60,2% Homologie) die größte Ähnlichkeit zu der des Mat2-Genprodukts aus *Gibberella fujikuroi* (Yun *et al.*, 2000). Die Funktion von Mat2 in *Gibberella* ist bisher jedoch nicht näher beschrieben. Das Hmg3-Protein enthält neben zwei potenziellen PKA-Phosphorylierungsstellen (<http://www.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>) (Abb. 6B), vier mögliche MAPK-Phosphorylierungsstellen, die dem von Clark-Lewis *et al.* (1991) beschriebenen Konsensus L/PXS/TP entsprechen (Abb. 6B).

2.1.3 Die Deletion von *hmg3* beeinträchtigt die Zellfusion

Um einen Einblick in die Funktion von *hmg3* während des Kreuzungsprozesses zu erhalten, wurden *hmg3*-Deletionsmutanten hergestellt. Zu diesem Zweck wurde der gesamte 5'-Bereich des *hmg3*-ORF (bp 1-1716) in den kompatiblen Wildtypstämmen FB1 (*al b1*) und FB2 (*a2*

b2) deletiert und durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt. Die resultierenden Deletionsmutanten FB1 Δ hmg3 und FB2 Δ hmg3 waren in Bezug auf ihr Wachstum nicht von den Ausgangsstämmen zu unterscheiden (nicht gezeigt). Im folgenden wurde die Paarungskompetenz der Deletionsmutanten auf aktivkohlehaltigen PD-Platten untersucht.

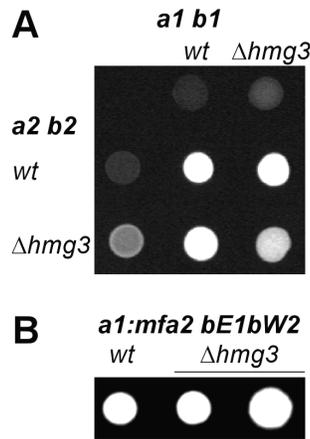


Abbildung 7: Kreuzungsverhalten und Filamentbildung von Δ hmg3-Mutanten. A) Die oben angegebenen Stämme sind FB1 (*a1 b1*; *wt*) und Derivate. Die links angegebenen Stämme sind FB2 (*a2 b2*; *wt*) und Derivate. Sie wurden entweder alleine (obere bzw. linke Reihe) oder in Mischung mit den kompatiblen Stämmen auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft und 48 h bei 28°C inkubiert. B) SG200 (*a1:mfa2 bE1bW2*) und oben angegebene Derivate wurden alleine auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft und nach 48 h bei 28°C photographiert.

aus dem *a2* Locus in den *a1*-Genort zur autokrinen Pheromonstimulation in der Lage. Diese Eigenschaften bewirken, dass der Stamm SG200 ohne vorherige Fusion mit einem Partner auf aktivkohlehaltigen Agarplatten filamentös wächst (Abb. 7B). Zwei unabhängige SG200 Δ hmg3-Mutanten wuchsen ebenfalls filamentös (Abb. 7B). Im Vergleich zum SG200-Wildtypstamm war die nach 10h zu beobachtende Filamentbildung jedoch leicht reduziert (nicht gezeigt). Nach nur vier weiteren Stunden Inkubation zeigten die Δ hmg3-Kolonien hingegen keinen Unterschied mehr zu denen des Wildtypstammes (Abb. 7B). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass *hmg3* Funktionen in der Präfusionsphase oder bei der Zellfusion selbst haben könnte.

Unter diesen Bedingungen erscheint das Dikaryon, das aus der Fusion zweier kompatibler Sporidien hervorgeht, als weißes Filament. Dementsprechend entwickelte eine Mischung aus FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) eine dicht mit weißem Filament überzogene Kolonie. Die Kreuzungen der *hmg3*-Deletionsmutanten mit dem jeweils kompatiblen Wildtypstamm wiesen eine kaum verminderte Ausbildung von Dikaryen auf. Kreuzte man die kompatiblen *hmg3*-Deletionsstämme miteinander, kam es zu einer eingeschränkten Bildung des dikaryotischen Filaments (Abb. 7A). Um zu untersuchen, ob dieser Δ hmg3-Phänotyp auf Postfusionsdefekte zurückzuführen ist, wurde *hmg3* in dem haploiden Stamm SG200 (*a1:mfa2 bE1bW2*) deletiert. Dieser Stamm kodiert für ein aktives bE1/bW2-Heterodimer und ist durch die Insertion des Pheromogens (*mfa2*)

2.1.4 *hmg3* wird nicht zur Konjugationshyphenbildung benötigt

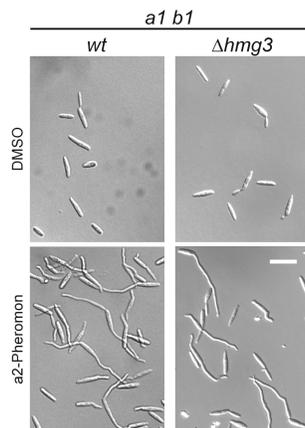


Abbildung 8: Konjugationshyphenbildung von $\Delta hmg3$ -Mutanten. Die oben angegebenen Stämme, FB1 (*wt*) und Derivate, wurden mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ synthetischem a2-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) 5 h bei 28°C bei leichtem Rotieren inkubiert. Der Größenstandard entspricht 20 μm und bezieht sich auf alle Bilder.

Einen entscheidenden Schritt der *a*-regulierten Präfusionsphase stellt die Ausbildung von Konjugationshyphen in Reaktion auf die Perzeption von kompatibelem Pheromon durch den Pheromonrezeptor dar. Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von *hmg3* an dieser morphologischen Antwort auf einen Pheromonstimulus wurden der Wildtypstamm FB1 sowie die entsprechende $\Delta hmg3$ -Mutante 5 h mit synthetischem a2-Pheromon behandelt. Diese Stimulation induzierte in FB1-Zellen die Bildung von Konjugationshyphen (Abb. 8). Die FB1 $\Delta hmg3$ -Zellen reagierten in gleicher Weise (Abb. 8). *hmg3* spielt folglich keine entscheidende Rolle bei der Bildung von Konjugationshyphen.

2.1.5 Die Pheromon-Induktion der *mfa1*-Expression erfolgt unabhängig von *hmg3*

Neben dem morphologischen Wechsel zur Konjugationshyphenbildung führt die Pheromonstimulation zu einer transkriptionellen Induktion der Paarungstypgene. Die Untersuchung der

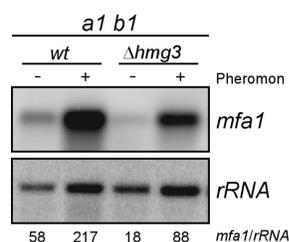


Abbildung 9: Analyse der *mfa1*-Expression in $\Delta hmg3$ -Mutanten. Die Stämme FB1 (*wt*) und FB1 $\Delta hmg3$ wurden 5 h mit DMSO (-) oder a2-Pheromon (+) behandelt. Für die Northern-Analyse wurden 6 μg Gesamt-RNA pro Spur geladen. Der Filter wurde mit den Sonden *mfa1* und *rRNA* (als Ladekontrolle) hybridisiert. Die Werte geben die auf die entsprechenden Ladekontrollen (*rRNA*) normalisierten *mfa1*-Signalstärken an.

Expressionsniveaus des Pheromongens *mfa1* vor und nach Pheromonstimulation des FB1-Wildtypstammes und der $\Delta hmg3$ -Mutante sollte Aufschluss über eine Beteiligung von *hmg3* an diesem Prozess geben. Hierfür wurde RNA aus den 5 h mit synthetischem a2-Pheromon bzw. mit DMSO behandelten Stämmen FB1 und FB1 $\Delta hmg3$ isoliert und die *mfa1*-Expression mittels Northern Analyse bestimmt (Abb. 9). Die detektierten *mfa1*-Signale wurden zusätzlich quanti-

fiziert und in Bezug auf das als Ladekontrolle dienende *rRNA*-Signal normalisiert (Abb. 9: *mfa1/rRNA*-Signalstärke). Wie erwartet, zeigte die *mfa1*-Expression im Wildtyp eine starke, 3,7-fache Pheromoninduktion. Eine vergleichbare Pheromoninduktion (4,9-fach) konnte auch in der *hmg3*-Deletionsmutante beobachtet werden (Abb. 9). Es fiel jedoch auf, dass in der Mutante sowohl das basale als auch das Pheromon-induzierte *mfa1*-Signal im Vergleich zu den entsprechenden Signalen des FB1-Stammes leicht reduziert war (Abb. 9). Die Quantifizierung der Signalstärken mit Hilfe des IMAGEQUANT Programms (Molecular Dynamics) quantifiziert.ergab, dass das basale sowie das Pheromon-induzierte *mfa1*-Expressionsniveau im $\Delta hmg3$ -Stamm etwa 3-fach reduziert ist (Abb. 9). Demzufolge ist *hmg3* nicht an der Pheromoninduktion des *mfa1*-Gens beteiligt, scheint aber einen leichten Einfluß auf die Basalexpression des Pheromogens zu haben.

2.1.6 $\Delta hmg3$ -Mutanten zeigen eine leicht reduzierte Tumorbildung in Maispflanzen

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von *hmg3* an der Regulation des Infektionsprozesses wurden Mischungen aus kompatiblen *hmg3*-Deletionsmutanten in junge Maispflanzen injiziert. Als Kontrolle dienten Infektionen mit den Wildtypstämmen FB1 und FB2. In zwei unabhängigen Infektionsstudien verursachte die Wildtypmischung in 92% bzw. 86% der infizierten Pflanzen die Bildung von Tumoren (Tabelle 1).

Tabelle 1: Pathogenität der *hmg3*-Deletionsmutanten

Inokulum	Infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumoren	Tumor-bildung
FB1 x FB2	35	30	86 %
FB1 $\Delta hmg3$ x FB2 $\Delta hmg3$	35	17	49 %
SG200	34	31	91 %
SG200 $\Delta hmg3$	30	26	87 %
FB1 x FB2	37	34	92 %
FB1 $\Delta hmg3$ x FB2 $\Delta hmg3$	70	52	74 %
SG200	31	30	97 %
SG200 $\Delta hmg3$	79	68	86 %

Die Infektionen mit den $\Delta hmg3$ -Mutanten induzierten hingegen im ersten Experiment in 74% und im zweiten nur in 49% der Pflanzen eine Tumorbildung (Tabelle 1). Die in zwei unabhängigen Experimenten beobachtete Reduktion der Pathogenität steht im Einklang mit der auf aktivkohlehaltigen Agarplatten beobachteten Attenuation der Fusionseffizienz kompatibler *hmg3*-Deletionsstämme (Abb. 7A). Parallel wurden Infektionen mit den

solopathogenen Stämmen SG200 (*al:mfa2 bE1bW2*) und SG200 Δ *hmg3* durchgeführt. Die Injektion des SG200-Wildtypstammes führte in 97% bzw. 91% der inokulierten Pflanzen zur Bildung von Tumoren (Tabelle 1), und die Injektion von SG200 Δ *hmg3* hatte in 86% bzw. 87% der infizierten Pflanzen eine Tumorbildung zur Folge (Tabelle 1). Auch wenn in diesem Fall kaum von einer signifikanten Reduktion der Pathogenität gesprochen werden kann, stehen die geringen Unterschiede zwischen SG200 und SG200 Δ *hmg3* mit den auf aktivkohlehaltigen Agarplatten beobachteten leichten Verzögerung in der Filamentbildung der SG200 Δ *hmg3*-Stämme (siehe Abschnitt 2.4) im Einklang. Bei der pathogenen Entwicklung spielt *hmg3* somit ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle.

2.1.7 *rop1* kodiert für ein drittes sequenzspezifisch DNA-bindendes HMG-Box-Protein

Die HMG-Domäne des zweiten in dieser Arbeit identifizierten potenziell sequenzspezifischen Transkriptionsfaktors, Rop1, zeigte mit 50% Sequenzidentität (62% Homologie) die größte Ähnlichkeit zu der DNA-Bindedomäne von Pcc1 aus *Coprinus cinereus* (Abb. 6). In *C. cinereus* führt eine Mutation im *pcc1*-Gen zu der Ausbildung sog. 'pseudoclamp connections' in haploiden Zellen (Murata *et al.*, 1998). Dieser Prozess erfordert in Wildtypzellen die Fusion kompatibler Partner bzw. die Expression eines aktiven A-Heterodimers. Pcc1 agiert demnach als Repressor der A-regulierten sexuellen Entwicklung. Außerhalb der konservierten HMG-DNA-Bindedomäne zeigt Rop1 keine Homologie zu anderen Proteinen.

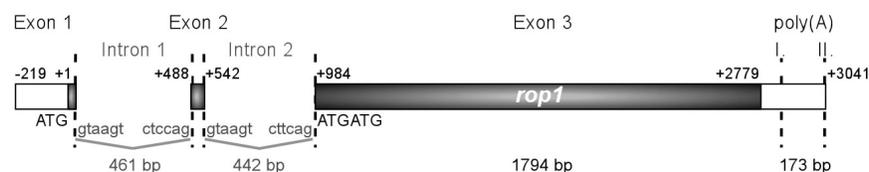


Abbildung 10: Schematische Darstellung der *rop1*-Genstruktur. Die drei Exons (1-3) sind als Rechtecke dargestellt, wobei die potenziell Protein kodierenden Abschnitte grau hinterlegt sind. Zusätzlich sind die drei potenziellen ATG-Startcodons eingezeichnet. Die zwei Introns (1 und 2) sind durch gewinkelte Linien gekennzeichnet, wobei die konservierte Basen der Intronengenren angegeben sind. Zwei alternative Polyadenylierungsstellen (poly(A) I. und II.) sind durch gestrichelte Linien markiert. Unterhalb angegebene Werte kennzeichnen die Längen der entsprechenden DNA-Abschnitte bzw. die bp-Positionen relativ zum 1. ATG-Startcodon.

Ein Vergleich der *rop1*-Regionen aus den beiden unabhängig generierten Genomsequenzen (BayerCropScience und Broad Institut) deckte deutliche Diskrepanzen im Bezug auf die jeweilige Annotation des *rop1*-ORFs auf. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass das

rop1-Gen in der Sequenz des Broad Instituts unmittelbar am 5'-Ende eines 'Contigs' liegt. Das in der BayerCropScience-Sequenz weiter stromaufwärts annotierte *rop1*-Startcodon ist in der Sequenz des Broad Instituts gar nicht enthalten. Zusätzlich unterscheiden sich die beiden Genomsequenzen im Bereich des putativen *rop1*-ORFs durch die An- bzw. Abwesenheit von zwei Thyminnukleotiden bzw. einem Guaninnukleotid. Um eine korrekte Annotation des *rop1*-Gens durchführen zu können, wurde daher aus einem das *rop1*-Gen tragenden genomischen BAC-Klon ein 7,7-kb-*SacII*-Subklon (pRop1-7,7S) generiert und sequenziert. Dabei zeigte sich, dass die von BayerCropScience generierte Sequenz fälschlicherweise ein zusätzliches Guaninnukleotid innerhalb des die HMG-Box kodierenden DNA-Abschnitts aufweist. Hingegen stimmte die BayerCropScience-Sequenz, nicht jedoch die Sequenz des Broad Instituts, für den 5'-Bereich von *rop1* mit den Resultaten der Sequenzierungen des 7,7-kb-*SacII*-Subklons überein. Zur weiteren Analyse des *rop1*-Gens wurde *rop1*-spezifische cDNA mittels PCR aus RACE-Ansätzen (siehe Abschnitt 2.17, Abb. 10) und aus einer λ gt10-cDNA-Bank (Bölker *et al.*, 1992) amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung der cDNA-Klone ergab, dass das *rop1*-Gen (GenBank Nummer: AY677184) zwei Introns von 462bp und 441bp Länge in seinem 5'-Bereich enthält (Abb. 10). Desweiteren enthält das *rop1*-Gen drei potenzielle ATG-Startcodons. Der längste offene Leserahmen umfaßt 2778bp (reife mRNA: 1875bp). Sollte die Translation der *rop1*-mRNA an diesem Startcodon beginnen, hätte das Rop1-Polypeptid eine Länge von 624 Aminosäuren. Das zweite und dritte mögliche ATG-Startcodon stellen, direkt aufeinander folgend, die ersten sechs Basen von Exon3 dar (Abb. 10). Dieser kürzere ORF hat eine Länge von 1797bp bzw. 1794bp. Eine vom zweiten Startcodon ausgehende Translation würde somit ein aus 597 Aminosäuren bestehendes Polypeptid liefern. Da die Expression des kürzeren 597 aa Proteins Defekte von Δ *rop1*-Mutanten komplementierte (siehe Abschnitt 2.9; Abb. 11A), wird im folgenden das zweite ATG-Startcodon als Translationsbeginn angenommen und als Position +1 definiert (Abb. 10). Dieser Nomenklatur folgend befindet sich die HMG-Domäne von Rop1 zwischen den Aminosäurepositionen 216-296 und nimmt damit eine im Vergleich zu Prf1 und Hmg3 ungewöhnliche, zentrale Position ein (Abb. 6B).

Desweiteren führte die Nutzung verschiedener Analyse-Algorithmen zu der Vorhersage einer potenziellen PKA-Phosphorylierungsstelle (<http://www.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>) (Abb. 6B) und zwei Kernlokalisierungssequenzen am C-terminalen Ende der HMG-Box (<http://www.psort.nibb.jp>) (Abb. 6B). Zusätzlich trägt das Rop1-Protein drei mögliche MAPK-Phosphorylierungsstellen, die dem von Clark-Lewis *et al.* (1991) beschriebenen Konsensus L/PXS/TP entsprechen (Abb. 6B).

2.1.8 Die Deletion von *rop1* beeinträchtigt Prä- und Postfusionsprozesse

Um einen Einblick in die Funktion von *rop1* während des Kreuzungsprozesses zu erhalten, wurde der *rop1*-ORF in den kompatiblen Wildtypstämmen FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) deletiert und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Die resultierenden Deletionsmutanten FB1 Δ *rop1* und FB2 Δ *rop1* waren in Bezug auf ihr Wachstum und ihre Zellmorphologie nicht von den Ausgangsstämmen zu unterscheiden (nicht gezeigt). Im folgenden wurde die Paarungskompetenz der Deletionsmutanten auf aktivkohlehaltigen PD-Platten untersucht. Während die Kreuzung des FB1 Δ *rop1*-Stammes mit dem kompatiblen FB2-Wildtypstamm eine reduzierte Dikaryenbildung aufwies, zeigte die Mischung des FB1-Wildtyps mit der FB2 Δ *rop1*-Mutante kaum noch filamentöse Dikaryen (Abb. 11A). Diese Beobachtung deutet auf eine Rolle von *rop1* vor oder während der Zellfusion hin. Nach Mischung der kompatiblen *rop1*-Deletionsstämme konnten keine dikaryotischen Filamente mehr beobachtet werden (Abb. 11A). Um sicher zu stellen, dass dieser Defekt auf die Deletion des *rop1*-Gens zurückzuführen ist, wurde das Plasmid p123P_{otef}:*rop1* in singulärer Kopie in den *ip*-Locus des Stammes FB2 Δ *rop1* integriert. In p123P_{otef}:*rop1* liegt das *rop1*-Gen von bp-Position +1 bis 1797 in einer N-terminalen Fusion mit einem für sechs Histidinreste kodierenden Sequenzabschnitt unter der Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors vor. Die Integration dieses Plasmids in den FB2 Δ *rop1*-Stamm komplementierte den Kreuzungsdefekt (Abb. 11A). Dies beweist, dass der beobachtete Phänotyp auf der Deletion des *rop1*-Gens beruht. *rop1* spielt also eine Rolle bei der Fusion kompatibler Stämme. Um zu untersuchen, ob *rop1* zusätzlich zu seiner Beteiligung an Fusionsprozessen Funktionen bei der Ausbildung des *b*-abhängigen Filaments ausübt, wurde *rop1* in dem haploiden, solo-pathogenen Stamm SG200 (*a1:mfa2 bE1bW2*) deletiert. Im Gegensatz zum SG200-Wildtypstamm, der auf Aktivkohlehaltigen Agarplatten filamentös wächst, zeigten die zwei getesteten unabhängigen SG200 Δ *rop1*-Mutanten keinerlei Filamentbildung (Abb. 11B).

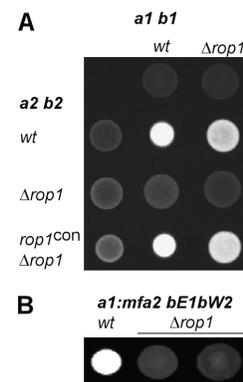


Abbildung 11: Kreuzungs- und Filamentationsdefekte von *rop1*-Deletionsmutanten. A) Die oben angegebenen Stämme sind FB1 (*a1 b1*; *wt*) und Derivate. Die links angegebenen Stämme sind FB2 (*a2 b2*, *wt*) und Derivate. Sie wurden entweder alleine (obere bzw. linke Reihe) oder in Mischung mit den kompatiblen Stämmen auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft. B) SG200 (*a1:mfa2 bE1bW2*; *wt*) und oben angegebene Derivate wurden alleine auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass *rop1* für die effiziente Fusion kompatibler Kreuzungspartner benötigt wird und zusätzlich eine essenzielle Rolle bei der Ausbildung des bE1/bW2-induzierten Filaments in SG200 spielt.

2.1.9 Rop1 ist essenziell für die Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation

Ein entscheidender Schritt der *a*-regulierten Präfusionsphase ist die Ausbildung von Konjugationshyphen in Reaktion auf die Perzeption von kompatibelem Pheromon. Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von *rop1* an dieser morphologischen Antwort auf einen Pheromonstimulus wurden der Wildtypstamm FB1, sowie die entsprechende $\Delta rop1$ -Mutante, 5h mit synthetischem a2-Pheromon behandelt. Diese Stimulation induzierte in 73% (346 von 473) der FB1-Zellen die Bildung von Konjugationshyphen (Abb. 12). Die FB1 $\Delta rop1$ -Zellen zeigten hingegen überhaupt keine Reaktion (0 Konjugationshyphen bei 842 Zellen) (Abb. 12). *rop1* ist folglich für die Ausbildung von Konjugationshyphen essenziell.

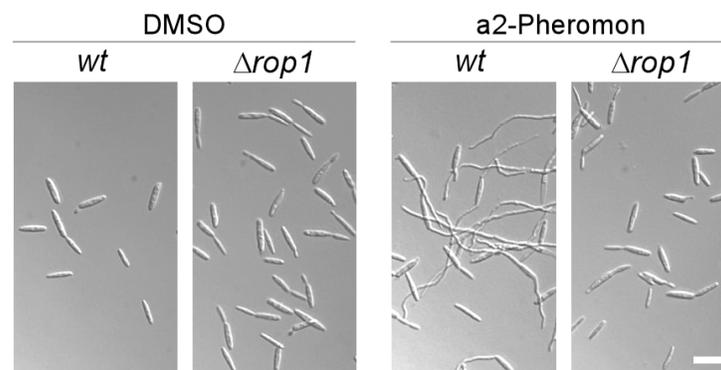


Abbildung 12: $\Delta rop1$ -Mutanten bilden keine Konjugationshyphen nach Pheromonstimulation. Die oben angegebenen Stämme, FB1 (*a1 b1*; *wt*) und FB1 $\Delta rop1$, wurden mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ synthetischem a2-Pheromon (rechts) oder entsprechender Menge DMSO (links) 5 h bei 28°C in PPN-Röhrchen unter leichtem Rotieren inkubiert. Der Größenstandard entspricht 20 μm und bezieht sich auf alle Bilder.

2.1.10 Die Expression der *a*- und *b*-Paarungstypgene sowie von *prf1* erfordert *rop1*

Neben dem morphologischen Wechsel zur Konjugationshyphenbildung führt die Pheromonstimulation zu der *prf1*-vermittelten transkriptionellen Induktion der *a*- und *b*-Paarungstypgene. Die Untersuchung des Expressionsniveaus dieser pheromon-responsiven Gene vor und nach Pheromonstimulation des FB1-Wildtypstammes und der $\Delta rop1$ -Mutante sollte Aufschluss über eine Beteiligung von *rop1* an diesem Prozess geben. Zu diesem Zweck wurde RNA aus pheromonstimulierten und unbehandelten Wildtyp- und $\Delta rop1$ -Zellen isoliert und Northern-Analysen unterzogen. Es zeigte sich, dass in unbehandelten $\Delta rop1$ -Zellen, im

Gegensatz zum Wildtyp, keinerlei Basalexpression der *a*-Paarungstypgene *prf1* und *mfa1* und des *prf1*-Gens erfolgt (Abb. 13; Spuren 1 und 2). Während die Stimulation mit synthetischem Pheromon im Wildtyp zu einer dramatischen Induktion der *prf1*-, *b*-, *mfa1*- und *pra1*-Expression führte (Abb. 13; Spuren 3 und 4), konnte in dem entsprechenden FB1 Δ rop1-

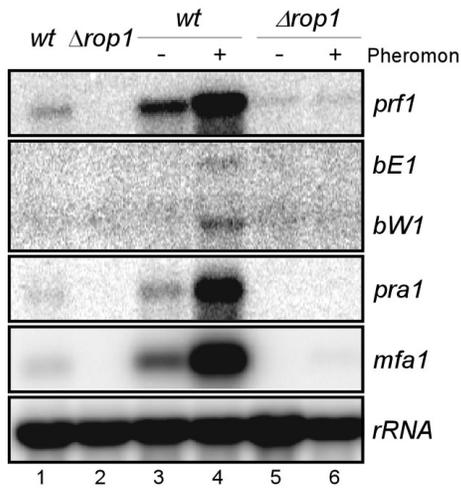


Abbildung 13: rop1 ist für die Expression der *a*- und *b*-Paarungstypgene essenziell. Die RNA wurde aus unbehandelten oder mit DMSO (-) bzw. synthetischem α 2-Pheromon (+) inkubierten FB1- (*wt*) und FB1 Δ rop1-Stämmen isoliert. Für die Northern-Analyse wurden davon pro Spur 12 μ g geladen. Der Filter wurde mit den rechts angegebenen Sonden hybridisiert (*rRNA* als Ladekontrolle).

Basalexpression (*mfa1*, *pra1*) aller untersuchten Gene in der Δ rop1-Mutante impliziert jedoch eine übergeordnete Rolle für *rop1*, z. B. als Regulator der *prf1*-Expression, da Prf1 sowohl die basale als auch die Pheromon-induzierte Transkription der *a*- und *b*-Gene reguliert (Hartmann *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 2003). Es wäre außerdem denkbar, dass Rop1 sowohl den transkriptionellen als auch den morphologischen Zweig der Pheromonantwort reguliert.

2.1.11 Rop1 wird für die Ausbildung von Konjugationshyphen nicht benötigt

Um die Beteiligung von *rop1* an der Regulation des morphologischen Wechsels zur Konjugationshyphenbildung näher zu untersuchen, wurden die Eigenschaften von Stämmen mit einer induzierbaren konstitutiv aktiven MAPKK Fuz7DD ausgenutzt (Müller *et al.*, 2003). Eine kontrollierte Expression des *fuzDD*-Allels wird durch die Verwendung des regulierbaren Promotors des Arabinasegens *crg1* (P_{crg1}) gewährleistet. Die Aktivität dieses

Stamm weder die basale noch eine Pheromon-induzierte Transkription der *mfa1*- und *pra1*- noch der *b*-Gene *bE1* und *bW1* nachgewiesen werden (Abb. 13; Spuren 5 und 6). Für *prf1* war eine, im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 13; Spur 3), drastisch reduzierte basale Transkriptmenge nachweisbar, die jedoch ebenfalls nicht Pheromon-induzierbar war (Abb. 13; Spuren 5 und 6). Das Ausbleiben der Expression dieser Gene erklärt die beschriebenen Prä- und Postfusionsdefekte (siehe Abschnitt 2.9, Abb. 11).

Allein die fehlende Expression des Pheromonrezeptorgens *pra* würde sowohl die ausbleibende transkriptionelle Induktion der Paarungstypgene als auch das Ausbleiben der Konjugationshyphenbildung erklären (siehe Abschnitt 2.10; Abb. 12), da Δ rop1-Zellen das Pheromonsignal nicht wahrnehmen können. Die dramatisch reduzierte (*prf1*) bis ausbleibende

Promotors wird in Anwesenheit von Glukose nahezu vollständig reprimiert, während Arabinose zu seiner Induktion führt (Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2001). Die Arabinose-induzierte *fuz7DD*-Expression führt zur Aktivierung der MAPK Kpp2 und nachfolgend zu der Ausbildung von Filamenten, welche alle Eigenschaften von Konjugationshyphen aufweisen (Müller *et al.*, 2003). Die Bildung dieser konjugationshyphen-ähnlichen Filamente erfolgt unabhängig von *prf1* und der Perzeption eines Pheromonsignals (Müller *et al.*, 2003). Damit bot die Konstruktion eines FB1 Δ rop1P_{crg1}:*fuz7DD*-Stammes ideale Voraussetzungen zur Untersuchung einer direkten Beteiligung von *rop1* an der Regulation des morphologischen Wechsels. In diesem Stamm sollten indirekte Einflüsse der *rop1*-Deletion, wie die ausbleibende Expression des

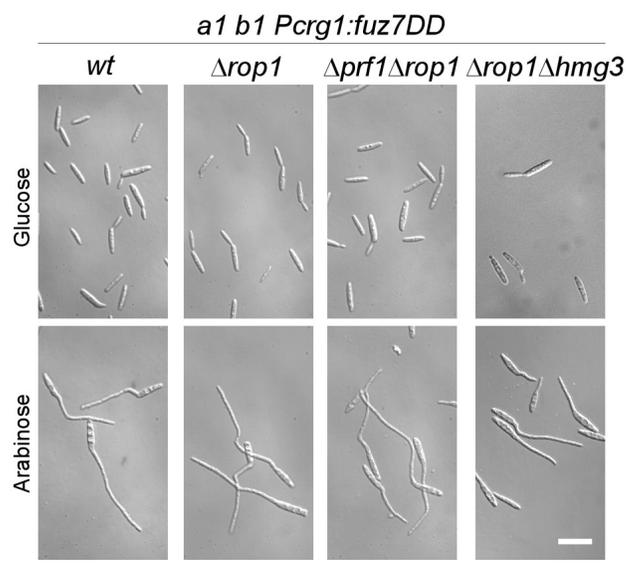


Abbildung 14: Konjugationshyphenbildung nach induzierter *fuz7DD*-Expression. Mikroskopische Aufnahmen von FB1P_{crg1}:*fuz7DD* (*wt*) und Derivaten mit den oben angegebenen Gendelektionen. Die Stämme wuchsen in Anwesenheit von Glukose (obere Reihe) und 5 h in Arabinose-haltigem Medium (untere Reihe). Alle Aufnahmen wurden mit derselben Vergrößerung aufgenommen und der Größenstandard entspricht 20 μ m.

Pheromonrezeptors (siehe Abschnitt 2.11; Abb. 13), keine Auswirkungen auf die Filamentbildung haben - es sei denn, Rop1 ist direkt an diesem Prozess beteiligt. Während sich alle P_{crg1}:*fuz7DD*-Derivate in Glukosehaltigem Medium durch Knospung vermehren (Abb. 14), bildete der FB1P_{crg1}:*fuz7DD*-Ausgangsstamm vier Stunden nach einem Transfer in Medium mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wie erwartet Konjugationshyphen-ähnliche Filamente aus (Abb. 14; Müller *et al.*, 2003). Der FB1 Δ rop1P_{crg1}:*fuz7DD*-Stamm reagierte auf die vierstündige Arabinoseinduktion des *fuz7DD*-Allels ebenfalls mit der charakteristischen Filamentbildung (Abb.

14). Somit ist *rop1* nicht an der unterhalb des aktiven MAPK-Moduls erfolgenden Regulation des morphologischen Wechsel beteiligt. Um die Möglichkeit redundanter Funktionen der drei in *U. maydis* identifizierten HMG-Box-Proteine, Prf1, Rop1 und Hmg3, bei der *Fuz7DD*-induzierten Filamentbildung zu untersuchen, wurden die entsprechenden FB1 Δ prf1 Δ rop1P_{crg1}:*fuz7DD*- und FB1 Δ rop1 Δ hmg3P_{crg1}:*fuz7DD*-Doppelmutanten hergestellt. Nach 4h Inkubation in Arabinose-haltigem Medium zeigten jedoch auch diese Stämme

die charakteristischen Hyphen (Abb. 14). Der morphologische Zweig der MAPK-Signalkaskade wird folglich weder von einem der drei HMG-Domänen-Transkriptionsfaktoren alleine noch von deren Zusammenspiel reguliert.

Somit besteht eine deutliche Diskrepanz zwischen der essenziellen Rolle von *rop1* für die Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation (Abb. 12) und dem *rop1*-unabhängigen morphologischen Wechsel nach *fuz7DD*-Induktion (Abb. 14). Da *rop1* jedoch u. a. für die basale und Pheromon-induzierte Expression des Pheromonrezeptorgens benötigt wird (Abb. 13), sind $\Delta rop1$ -Zellen möglicherweise gar nicht in der Lage, Pheromon in ihrer Umgebung wahrzunehmen. Sollte diese Insensitivität der $\Delta rop1$ -Stämme der Grund für die ausbleibende Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation sein, müßte die

konstitutive Expression des Pheromonrezeptors diesen Defekt aufheben. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde *rop1* in den bereits existierenden Stämmen FB2pra2 und FB2pra2 $\Delta prf1$ (Müller *et al.*, 2003) deletiert. Diese Stämme tragen im *ip*-Locus eine einfache Kopie des *pra2*-Pheromonrezeptorgens unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef*-Promotors (Spellig *et al.*, 1996). Die Stimulation mit synthetischen a1-Pheromon führte in den Stämmen FB2pra2 und FB2pra2 $\Delta prf1$ wie erwartet zur Bildung von Konjugationshyphen (Abb. 15; Müller *et al.*, 2003). Ebenso bildeten

die Stämme FB2pra2 $\Delta rop1$ und FB2pra2 $\Delta prf1\Delta rop1$ in Reaktion auf das synthetische a1-Pheromon Konjugationshyphen aus (Abb. 15). Somit ist Rop1 nicht direkt an der Regulation der morphologischen Antwort beteiligt, sondern beeinflußt sie indirekt über das Expressionsniveau des Pheromonrezeptors, wie auch für Prf1 beschrieben (Müller *et al.*, 2003). Möglicherweise überlappende Funktionen von Prf1 und Rop1 bei der Konjugationshyphenbildung wurden durch die Analyse der $\Delta prf1\Delta rop1$ -Doppelmutante ebenfalls ausgeschlossen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *rop1* weder die Fuz7DD-induzierte

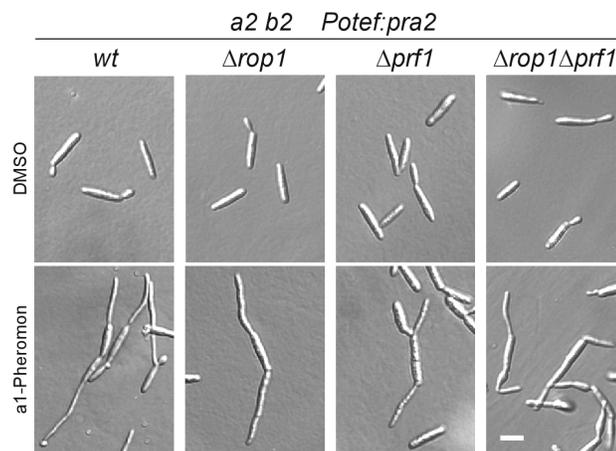


Abbildung 15: Konstitutive Expression des Pheromonrezeptors Pra2 in $\Delta rop1$ -Mutanten. FB2pra2^{con} (*a2 b2 P_{otef}:pra2*) und das $\Delta rop1$ -Derivat wurden mit 2,5 µg/ml synthetischem a1-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) 5 h bei 28°C bei leichtem Rotieren inkubiert. Die *pra2^{con}*-Stämme tragen eine ektopische Kopie des Pheromonrezeptorgens unter der Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Hyphenbildung noch die Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation direkt reguliert. Dieser Sachverhalt zusammen mit der beschriebenen Funktion von *rop1* bei der Expression der *a*- und *b*-Gene erinnert stark an den Phänotyp von *prf1*-Deletionsmutanten (Hartmann *et al.*, 1996).

2.1.12 Rop1 agiert unterhalb der MAPKK Fuz7 als Regulator der transkriptionellen Pheromonantwort

Da die Konjugationshyphenbildung eng mit der *prf1*-vermittelten Expression der Paarungstypgene (wie z. B. *mfa1*) verbunden ist und *rop1* zur Fuz7DD-induzierten morphologischen Antwort nicht benötigt wird (siehe Abschnitt 2.12; Abb. 14), stellte sich die Frage, ob das genetisch aktivierte MAPK-Modul auch die beschriebenen $\Delta rop1$ -Defekte bei der transkriptionellen Pheromonantwort (siehe Abschnitt 2.11; Abb. 13) kompensieren kann. Zur Klärung dieser Frage wurden die Expressionsniveaus von *prf1* und *mfa1* vor und nach Arabinoseinduktion von FB1P_{crg1}:fuz7DD, FB1 Δ kpp2P_{crg1}:fuz7DD, FB1 Δ prf1P_{crg1}:fuz7DD und FB1 Δ rop1P_{crg1}:fuz7DD durch Northern-Analysen ermittelt

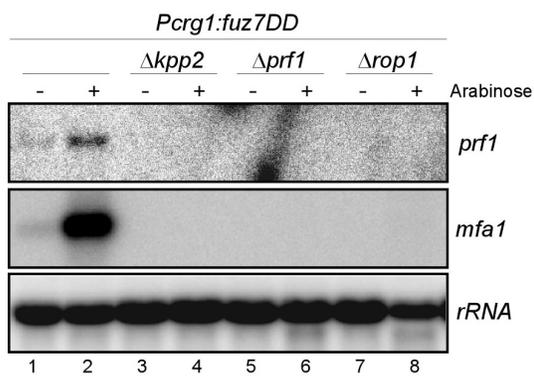


Abbildung 16: *rop1* wird für die *a*- und *b*-Genexpression nach *fuz7DD*-Induktion benötigt. FB1P_{crg1}:fuz7DD und Derivate mit den oben angegebenen Gendeletionen wuchsen 5 h in Anwesenheit von Glukose (-) oder Arabinose (+). Für die Northern-Analyse wurden pro Spur 10 μ g Gesamt-RNA geladen und der Filter mit den Sonden, die auf der rechten Seite angegeben sind, hybridisiert (*rRNA* als Ladekontrolle).

(Abb. 16). Dabei wurden die Ergebnisse von Müller *et al.* (2003) bestätigt, die gezeigt hatten, dass sowohl die MAPK Kpp2 als auch Prf1 für die basale und Fuz7DD-induzierte Expression von *prf1* und *mfa1* bzw. *mfa1* essenziell sind (Abb. 16, Spuren 1 bis 6). Desweiteren zeigte sich, dass *rop1* ebenfalls für die basale und Fuz7DD-induzierte Transkription von *prf1* und *mfa1* benötigt wird (Abb. 16, Spuren 7 und 8). Folglich agiert Rop1 bei der Regulation der transkriptionellen Pheromonantwort unterhalb der MAPKK Fuz7. Der negative Einfluß der *rop1*-Deletion auf die basale und induzierte Transkription von *prf1* und mehrerer *prf1*-

regulierter Gene (wie *mfa1*, *pra1* und *bE1/bW1*) (Abb. 13 und Abb. 16) deutet weiterhin stark darauf hin, dass Rop1 einen essenziellen Aktivator der *prf1*-Expression darstellen könnte.

2.1.13 Die konstitutive Expression von *prf1* komplementiert die $\Delta rop1$ -Phänotypen in Kreuzungen und bei der Konjugationshyphenbildung

Um die Annahme zu überprüfen, dass die beschriebenen $\Delta rop1$ -Phänotypen ihre Ursache in der unzureichenden Expression von *prf1* haben, wurde der native *prf1*-Promotor in *rop1*-Deletionsstämmen durch den konstitutiv aktiven *tef*-Promotor ersetzt. Im Plattenkreuzungstest mit kompatiblen Wildtyp- und $\Delta rop1$ -Partnern zeigten die konstitutiv *prf1* exprimierenden $\Delta rop1$ -Stämme, FB1 $\Delta rop1 prf1^{con}$ bzw. FB2 $\Delta rop1 prf1^{con}$, eine von den FB1- bzw. FB2-Wildtypstämmen nicht zu unterscheidende Filamentbildung. Insbesondere führte auch die Kreuzung von FB1 $\Delta rop1 prf1^{con}$ mit FB2 $\Delta rop1 prf1^{con}$ zu einer effizienten Dikaryenbildung (Abb. 17A), während die Mischung der $\Delta rop1$ -Ausgangsstämme, wie bereits beschriebenen, keinerlei Filamentbildung zeigte (Abb. 17A und Abschnitt 2.9; Abb. 11A). Die konstitutive Expression von *prf1* komplementiert also die durch die *rop1*-Deletion verursachten Kreuzungsdefekte. Desweiteren stellte die konstitutive Expression von *prf1* in *rop1*-Deletionsmutanten die Fähigkeit zur Konjugationshyphenbildung in Reaktion auf kompatibles Pheromon wieder her (Abb. 17B).

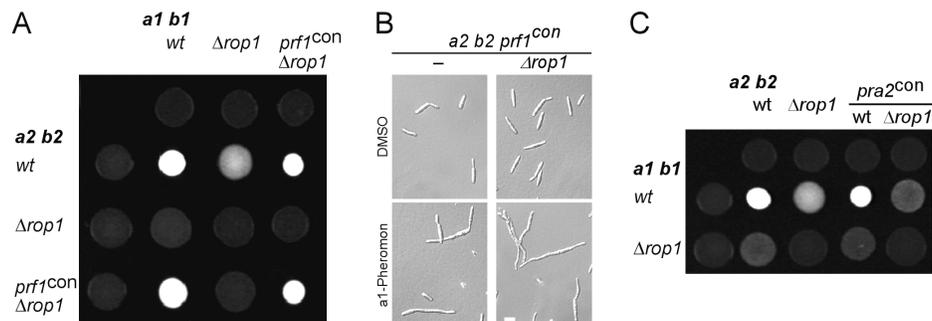


Abbildung 17: Die konstitutive Expression von *prf1* komplementiert die Phänotypen von *rop1*-Deletionsmutanten. A) und C) Die angegebenen Stämme wurden alleine (obere bzw. linke Reihe) oder in Mischung mit den kompatiblen Stämmen auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft. A) In *prf1^{con}*-Stämmen wurde der native *prf1*-Promotor durch den konstitutiven *tef*-Promotor ersetzt. C) Die *pra2^{con}*-Stämme tragen eine ektopische Kopie des Pheromonrezeptorgens unter der Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors. B) FB2 $prf1^{con}$ (*a2 b2 prf1^{con}*; -) und das $\Delta rop1$ -Derivat wurden mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ a1-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) 5 h inkubiert. Größenstandard: 10 μm .

Die konstitutive Expression des Pheromonrezeptorgens *pra2* im FB2 $\Delta rop1$ -Hintergrund stellte zwar die Konjugationshyphenbildung wieder her (siehe Abschnitt 2.12; Abb. 15), komplementierte jedoch nicht den Fusionsdefekt des FB2 $\Delta rop1$ -Stammes (Abb. 17C). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass *rop1* für eine ausreichende *prf1*-Expression während des Kreuzungsvorgangs benötigt wird.

Somit können alle beobachteten $\Delta rop1$ -Phänotypen auf die unzureichende bis ausbleibende *prf1*-Expression in den $\Delta rop1$ -Deletionsmutanten zurückgeführt werden. Rop1 fungiert also als direkter oder indirekter Aktivator der *prf1*-Expression.

2.1.14 Rop1 reguliert die *prf1*-Expression nicht über die 'upstream activating sequence'

Die Expression von *prf1* unterliegt einer komplexen Regulation. Zum einen wird sie vermutlich durch zwei sogenannte PRE-Boxen (Urban *et al.*, 1996a) im *prf1*-Promotor autoreguliert, während die distal im Promotor liegende UAS ('upstream activating sequence') eine umwelt- bzw. nährstoffabhängige Expression vermittelt (Hartmann *et al.*, 1999). Um eine *in vivo* Quantifizierung der *prf1*-Expression zu ermöglichen, wurde das *egfp*-Reporter gen ('enhanced green fluorescent protein') an den *prf1*-Promoter fusioniert und in einfacher Kopie in den *ip*-Locus von Wildtyp- und $\Delta rop1$ -Stämmen integriert. Die GFP-Fluoreszenz der resultierenden Stämme wurde nach der Stimulation mit kompatibelem Pheromon oder der Kontrollbehandlung mit dem DMSO-Lösungsmittel mikroskopisch und fluorimetrisch

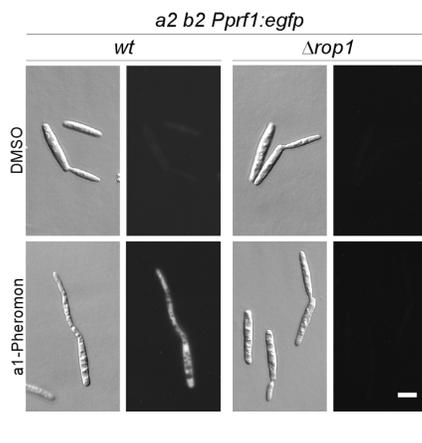


Abbildung 18: *rop1* wird für die basale und Pheromon-induzierte Expression des *Pprf1:egfp*-Reporters benötigt. DIC- (linke Spalte) sowie Epifluoreszenz- (rechte Spalte) Aufnahmen von $P_{prf1}:egfp$ (*a2 b2 Pprf1:gfp; wt*) und dem $\Delta rop1$ -Derivat, die 5 h mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ a1-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) inkubiert wurden. Größenstandard entspricht 4 μm .

bestimmt (Abb. 18 und Tabelle 2). Wildtypzellen zeigten eine schwache, aber deutlich sichtbare GFP-Basalexpression und bildeten nach Pheromonstimulation hellleuchtende Konjugationshyphen (Abb. 18). Die entsprechenden *rop1*-Deletionsmutanten bildeten hingegen erwartungsgemäß keine Konjugationshyphen aus und zeigten außerdem keine sichtbare GFP-Fluoreszenz (Abb. 18). Die fluorimetrische Quantifizierung der *Pprf1:gfp*-Reporterexpression offenbarte eine 13-fache Induktion in a1-Pheromon stimulierten FB2-Zellen und eine 36-fach induzierte *prf1*-Expression in a2-Pheromon behandelten FB1-Zellen (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu war in den $\Delta rop1$ -Stämmen bereits die Basalexpression des Reportergens im Vergleich zum Wildtypstamm 2-fach (FB2 $\Delta rop1$) bzw. 5-fach (FB1 $\Delta rop1$) reduziert (Tabelle 2). In keinem der beiden *rop1*-Deletions-

stämme induzierte die Stimulation mit kompatibelem Pheromon eine Erhöhung der *Pprf1:gfp*-Expression (Tabelle 2). Diese quantitativen Daten bestätigen die Northern-Ergebnisse zur *prf1*-Expression (siehe Abschnitt 2.11; Abb. 13).

Tabelle 2: UAS-Aktivität und Pheromon-Induzierbarkeit des *prf1*-Promotors in *Δrop1*-Stämmen

Stamm	Rel. Fluoreszenz ^a			
	DMSO	Pheromon	Glukose ^b	Maltose ^b
FB1P _{prf1} :egfp	1.00 (±0.03)	36.02 (±0.34)	n. d.	n. d.
FB1Δ _{rop1} P _{prf1} :egfp	0.19 (±0.03)	0.11 (±0.02)	n. d.	n. d.
FB2P _{prf1} :egfp	1.00 (±0.10)	13.28 (±0.09)	n. d.	n. d.
FB2Δ _{rop1} P _{prf1} :egfp	0.45 (±0.19)	0.40 (±0.06)	n. d.	n. d.
HA232	n. d.	n. d.	1.00 (±0.09)	0.13 (±0.02)
HA232Δ _{rop1}	n. d.	n. d.	0.98 (±0.07)	0.15 (±0.02)

^a Die relative Fluoreszenz gibt die auf die OD₆₀₀ normalisierte GFP-Fluoreszenz an. Die relative Fluoreszenz der in Glukose-haltigem Medium gewachsenen bzw. DMSO-behandelten Wildtyp-Stämme (HA232, FB1P_{prf1}:egfp, FB2P_{prf1}:egfp) wurden gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Durchschnittswerte (und Standardabweichungen) aus drei Messungen von jeweils drei unabhängigen Kulturen.

^b Nitrat Minimalmedium (NM) mit 1% Glukose oder 1% Maltose als Kohlenstoffquelle.

Zur Klärung der Frage, ob Rop1 die *prf1*-Expression über die im distalen Teil des *prf1*-Promotors liegende UAS reguliert, wurde *rop1* in dem Stamm HA232 deletiert. Dieser Stamm trägt das *gfp*-Reportergen in Fusion mit den *mfal*-Basalpromotor unter der Kontrolle von drei synthetischen UAS-Elementen (Hartmann *et al.*, 1999). Wie erwartet zeigte das P_{UAS}:*gfp*-Reportergen bei Wachstum des HA232-Ausgangsstammes in Minimalmedium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle nur 13±2% des Expressionsniveaus der in glukosehaltigem Medium gewachsenen HA232-Zellen (100±9%) (Tabelle 2 und Hartmann *et al.*, 1999). Der HA232Δ_{rop1}-Stamm zeigte die gleiche von der Kohlenstoffquelle abhängige Expression des Reportergens und auch die Stärke der GFP-Fluoreszenz (Glukose: 98±7%; Maltose: 15±2%; relativ zum Glukosewert von HA232) war mit den entsprechenden Werten des Ausgangsstammes nahezu identisch. Demnach reguliert Rop1 die Expression von *prf1* nicht über die UAS.

2.1.15 Die HMG-Domäne von Rop1 bindet *in vitro* sequenzspezifisch an den *prf1*-Promotor

Um die Möglichkeit einer direkten Regulation der *prf1*-Expression durch die Bindung von Rop1 an den *prf1*-Promotor zu untersuchen, wurden entsprechende Gelretardations-experimente durchgeführt (Abb. 19). Zu diesem Zweck wurde zunächst ein mittels PCR generiertes Fragment des *rop1*-Gens in den dafür vorgesehenen Leserahmen des Überexpressionsvektors pET15b kloniert (siehe Material und Methoden). Das so entstandene Plasmid pET15bHMG_{Rop1} enthält ein 0,9 kb Fragment, welches für die Rop1-HMG-Domäne inklusive flankierender Bereiche kodiert (Aminosäuren 100 bis 401; Rop1₁₀₀₋₄₀₁). Das zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits vorliegende pET15b-Derivat pET-Prf1₁₋₂₈₉ enthält hingegen ein 0,8 kb Fragment, welches für den die HMG-Domäne enthaltenden N-Terminus des Prf1-Proteins kodiert (Aminosäure 1 bis 289; Prf1₁₋₂₈₉) (Hartmann *et al.*, 1996). Der

Vektor pET15b ist so konzipiert, dass an das 5'-Ende des inserierten Fragments ein kurzer Sequenzabschnitt fusioniert wird, der für sechs Histidinreste kodiert. Dadurch wird eine einfache Aufreinigung der rekombinaten Proteine ermöglicht (siehe unten bzw. Material und Methoden). Die Transformation der Plasmide in den *E. coli*-Stamm Rosetta::DE3 [pRARE] erlaubte die IPTG-induzierbare heterologe Überexpression der 6xHis-Fusionsproteins (Rop1₁₀₀₋₄₀₁ bzw. Prf1₁₋₂₈₉). Die Verwendung der Volllängenproteine war leider nicht möglich, da die IPTG-induzierte Expression der Fusionsproteine unter allen getesteten Bedingungen zu nahezu ausschließlich unlöslichen Proteinen führte oder eine Expression kaum nachweisbar war (nicht gezeigt). Dieses Problem war für die Überexpression von Prf1-Volllängenprotein bereits beschrieben worden (Hartmann, 1997). Daher wurden die in ausreichenden Mengen löslich exprimierte HMG-Domänen von Rop1 bzw. Prf1 (Rop1₁₀₀₋₄₀₁ bzw. Prf1₁₋₂₈₉) durch eine Ni²⁺-Sephrose-Affinitätschromatographie gereinigt und im Folgenden auf ihre Affinität zu radioaktiv markierten Restriktionsfragmenten des *prfI*-Promotors getestet (zu Positionen und Längen der Fragmente siehe Abb. 19A). Dabei sollte Prf1₁₋₂₈₉ als Positivkontrolle dienen. Wie erwartet (Hartmann *et al.*, 1996), zeigte Prf1₁₋₂₈₉ eine starke Interaktion mit dem zwei PRE-Boxen (Konsensus: TCCCTTTGT) enthaltenden Fragment **d** (Abb. 19B; Spur 12) und eine schwache Affinität zu den Fragmenten **a** und **e** (Abb. 19B; Spuren 3 und 15). Letzteres kann durch die Anwesenheit von PRE-verwandten Elementen erklärt werden, die in einer (TCCCTgTGT; Fragment **a**) bzw. zwei Positionen (gCCCTTTGa; Fragment **e**) von der Konsensussequenz abweichen. Dass eine Abweichung von der PRE-Konsensussequenz an diesen Positionen nicht zum völligen Verlust der Interaktion mit der HMG-Domäne von Prf1 führt, wurde bereits von Hartmann *et al.* (1996) beschrieben. Um Bindestellen für Rop1 weiter einzugrenzen, wurden die Fragmente **a** und **d** durch Restriktion in jeweils zwei überlappende Fragmente zerteilt und wiederum in Gelretardationsexperimente eingesetzt (Abb. 19C). Erneut zeigte Prf1₁₋₂₈₉ ausschließlich eine signifikante Interaktion mit dem die PRE-Boxen enthaltenden Fragment **d1** (Abb. 19C, Spur 9). Unter identischen Bindungsbedingungen wurde eine starke Interaktion des gereinigten Rop1₁₀₀₋₄₀₁-Proteins mit den *prfI*-Promotorfragmenten **a** und **d** beobachtet (Abb. 19B, Spuren 2 und 11), während die Fragmente **b**, **c** und **e** nur eine sehr schwache Bindung zeigten (Abb. 19B, Spuren 5, 8 und 14). Zur Identifizierung der Rop1-Bindestellen ('*Rop1 recognition site*' [RRS]) wurden die von Rop1 hoch affin gebundenen Fragmente **a** und **d** in jeweils zwei überlappende Restriktionsfragmente zerschnitten und in Gelretardationsexperimente eingesetzt (Abb. 19C). Dieses Experiment demonstrierte die starke spezifische Interaktion von Rop1₁₀₀₋₄₀₁ mit den Fragmenten **a1** und **d2** (Abb. 19C, Spuren 2 und 11), während das PRE-enthaltende Fragment **d1** nur eine schwache Bindung an Rop1₁₀₀₋₄₀₁ zeigte (Abb. 19C,

Spur 8). Durch den Vergleich der DNA-Sequenzen von **a1** (ohne den mit **a2** überlappenden Bereich) und **d2** konnten drei nahezu identische Sequenzabschnitte von 11bp identifiziert werden (Konsensus: ATTGT[T/C][C/T]T[A/T]TC).

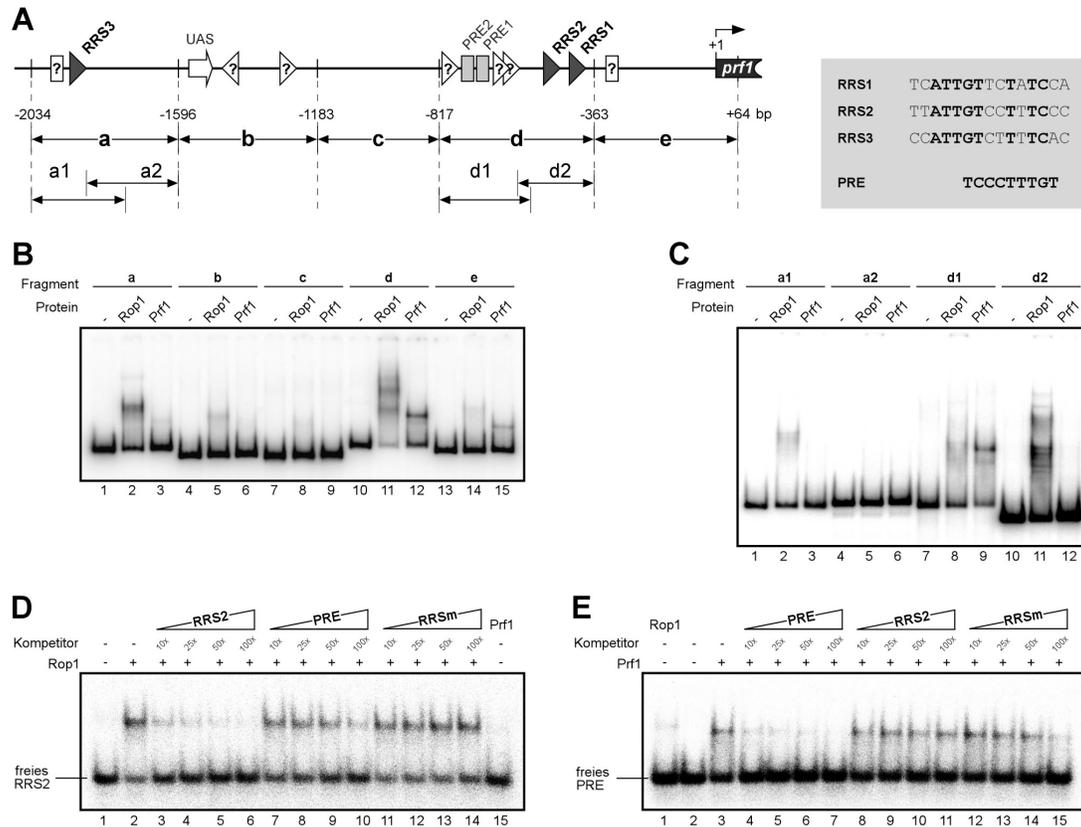


Abbildung 20: Die HMG-Domäne von Rop1 bindet sequenzspezifisch an den *prf1*-Promotor.

A) Schematische Darstellung des *prf1*-Promotors. Das UAS-Element ist als offener Pfeil und die PRE-Boxen sind als hellgraue Rechtecke dargestellt. Die in Gelretardationsexperimenten (B-E) identifizierten Rop1-Bindestellen (RRS) sind durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet. Offene, mit Fragezeichen versehene Symbole markieren putative Bindestellen, die in ihrer Basenfolge von den RRS- bzw. PRE-Konsensussequenzen abweichen. Die Zahlen geben die bp-Positionen relativ zum ATG-Startcodon an. Die Lage der in Gelretardationsexperimenten verwendeten *prf1*-Promotorfragmente ist durch blockierte Pfeile gekennzeichnet. In dem grau hinterlegten Kasten sind die drei identifizierten RRS-Sequenzen angegeben. Zum Vergleich sind die PRE-Sequenz aufgelistet. **B)-E)** Gelretardationsexperimente mit den als (His₆)-Fusionsproteine exprimierten HMG-Domänen von Rop1 (Rop1₁₀₀₋₄₀₁) und Prf1 (Prf1₁₋₂₈₉) unter Verwendung der radioaktiv markierten *prf1*-Promotorfragmente **a - e** (**B**) bzw. **a1**; **a2** und **d1**; **d2** (**C**). **D)** Interaktion der Rop1 HMG-Domäne mit dem radioaktiv markierten RRS2-Oligonukleotid und Konkurrenz dieser Interaktion mit steigenden Konzentrationen (x-facher molarer Überschuss zur radioaktiven RRS2-Sonde) der oberhalb angegebenen unmarkierten Oligonukleotide. In Spur 15 wurde die Bindung der HMG-Domäne von Prf1 an das radioaktiv markierte RRS2-Oligonukleotid getestet. **E)** Interaktion der Prf1 HMG-Domäne mit dem radioaktiv markierten PRE-Oligonukleotid und Konkurrenz dieser Interaktion mit steigenden Konzentrationen (x-facher molarer Überschuss zur radioaktiven PRE-Sonde) der oberhalb angegebenen unmarkierten Oligonukleotide. In Spur 1 wurde die Bindung der HMG-Domäne von Rop1 an das radioaktiv markierte PRE-Oligonukleotid getestet.

Diese potenzielle Rop1-Bindestelle zeigte signifikante Ähnlichkeiten zu Bindestellen bekannter sequenzspezifischer HMG-Domänen-Proteine (Tabelle 4). Desweiteren ist dieses Motiv ausschließlich in den stark Rop1₁₀₀₋₄₀₁ bindenden Fragmenten **a** und **d** des *prf1*-Promotors zu finden (Abb. 19A, Fragmente **a** und **d**), während die schwach interagierenden Fragmente **b**, **c** und **e** in ein bis zwei Basenpaaren abweichende Varianten des RRS-Elements aufweisen (Abb. 19A, Dreiecke mit Fragezeichen). Damit stellte dieses 11bp-Motiv einen guten Kandidaten für eine Rop1-Bindestelle (RRS) dar. Um diese Annahme direkt zu überprüfen, wurden synthetische, doppelsträngige Oligonukleotide hergestellt, die jeweils eine der drei mutmaßlichen RRS-Sequenzen enthielten. In Gelretardationsexperimenten zeigte Rop1₁₀₀₋₄₀₁ eine hohe Affinität zu allen drei RRS-Oligonukleotiden, während Prf1₁₋₂₈₉ keine Bindung zeigte (Abb. 19D, Resultate für RRS2; Spuren 2 und 15). Um die Spezifität der beobachteten DNA-Protein-Interaktionen zu beweisen, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dabei wurden dem Bindungsansatz aus markiertem RRS2-Oligonukleotid und Rop1₁₀₀₋₄₀₁ bzw. aus markiertem PRE-Oligonukleotid und Prf1₁₋₂₈₉ jeweils ansteigende Konzentrationen von unmarkierten PRE- (TCCCTTTGT), RRS2- (ATTGTCCTTC) oder einem Oligonukleotid, in dem alle elf Basen des RRS-Motivs ausgetauscht wurden (RRSm; CGGTGGAGCGA), zugesetzt (Abb. 19D und E). Die Bildung des retardierten radioaktivmarkierten RRS2-Rop1₁₀₀₋₄₀₁-Komplexes wurde bereits mit einem zehnfachen molaren Überschuss des unmarkierten RRS2-Oligonukleotids gegenüber dem markierten RRS2-Oligonukleotid effizient verhindert (Abb. 19D, Spuren 3 bis 6), während ein hundertfacher molarer Überschuss des unmarkierten PRE-Oligonukleotids für eine signifikante Konkurrenz erforderlich war (Abb. 19D, Spuren 7-10). Wie für eine sequenzspezifische Bindung erwartet, zeigte auch die Zugabe des RRSm-Oligonukleotids, in dem alle elf zentralen, das RRS-Element konstituierenden Basen ausgetauscht wurden, keinerlei Einfluß auf die RRS2-Rop1₁₀₀₋₄₀₁-Interaktion (Abb. 19D, Spuren 11 bis 14). Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die HMG-Domäne von Rop1 *in vitro* sequenzspezifisch an die identifizierten RRS-Elemente bindet. Zusätzlich zeigte Rop1₁₀₀₋₄₀₁ eine sehr niedrige Affinität zu der verwandten PRE-Box (Abb. 19E, Spur 1), welche die beobachtete schwache Interaktion von Rop1₁₀₀₋₄₀₁ mit dem die PRE-Boxen enthaltenden *prf1*-Promotorfragment **d1** erklärt (Abb. 19C, Spur 8).

In Konkurrenzexperimenten mit Prf1₁₋₂₈₉ und radioaktiv markiertem PRE-Oligonukleotid interferierte nur das unmarkierte PRE-Oligonukleotid (Abb. 19E, Spuren 4 bis 7), nicht aber das RRS2- (Abb. 19E, Spuren 8 bis 11) oder das RRSm-Oligonukleotid (Abb. 19E, Spuren 12 bis 15) mit der Bindung an das markierte PRE-Oligonukleotid (Abb. 19E). Somit erkennen die HMG-Domänen von Rop1 und Prf1 unterschiedliche Bindestellen im *prf1*-Promotor.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das in $\Delta rop1$ -Mutanten beobachtete Ausbleiben der *prf1*-Transkription auf die fehlende Aktivierung des *prf1*-Promotors durch Rop1 zurückzuführen ist.

2.1.16 Die MAPK-Kaskade reguliert die *rop1*-Expression unabhängig von *prf1*

Die bisher präsentierten Daten haben gezeigt, dass *rop1* sowohl nach Pheromonstimulation als auch in Stämmen mit genetisch aktiviertem MAPK-Modul für die Transkription von *prf1* erforderlich ist (siehe Abschnitt 2.11, Abb. 13, und Abschnitt 2.13, Abb. 16), *rop1* also bei der transkriptionellen Pheromonantwort eine zentrale Rolle spielt. Damit stellte sich die Frage, welchen Einfluß die Pheromon-MAPK-Kaskade auf die Expression von *rop1* hat. Um die transkriptionelle Regulation des *rop1*-Gens zu untersuchen, wurden die in Abschnitt 2.13 beschriebenen Northern-Membranen mit RNA aus den FB1P_{crg1}:fuz7DD-Derivaten vor und nach Arabinoseinduktion (Abb. 20A) sowie die Northern-Filter mit RNA aus den in Abschnitt 2.11 beschriebenen Pheromonstimulationen der FB1-Derivate (Abb. 20B) zusätzlich mit einer *rop1*-spezifischen Sonde beprobt.

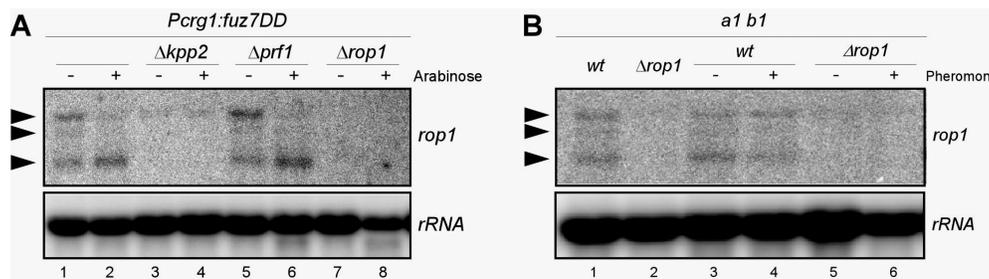


Abbildung 20: Einfluß des MAPK-Moduls auf die *rop1*-Genexpression. Für die Northern-Analysen wurden die in den Abbildungen 14 und 15 dargestellten Filter mit der *rop1*-Sonde hybridisiert. **A)** FB1P_{crg1}:fuz7DD und Derivate mit den oben angegebenen Gendelektionen wuchsen in Anwesenheit von Glukose (-) oder Arabinose (+). **B)** Die Stämme FB1 (*wt*) und FB1 $\Delta rop1$ wurden mit DMSO (-) oder $\alpha 2$ -Pheromon (+) behandelt. Als Kontrolle diente RNA aus den in CM-Glukose-Medium ohne Zusätze gewachsenen Stämmen. Pfeilspitzen kennzeichnen *rop1*-Transkripte.

Dabei zeigte sich, dass im nicht-induzierten Stamm FB1P_{crg1}:fuz7DD sowie im FB1-Wildtyp drei *rop1*-Transkripte verschiedener Größe exprimiert werden (Abb. 20A, Spuren 1 und 3; Abb. 20B, Spur1). Während die Pheromonstimulation des FB1-Stammes die *rop1*-Transkriptmengen und ihr Verhältnis nicht beeinflusste (Abb. 20B, Spuren 3 und 4), führte die Expression der konstitutiv aktiven MAPKK Fuz7DD zur selektiven Induktion des kürzesten Transkripts, was mit reduzierten Mengen der längeren Transkripte einher ging (Abb. 20B, Spuren 1 und 2). Desweiteren zeigte sich, dass die MAPK Kpp2 sowohl für die basale als auch für die Fuz7DD-induzierte Akkumulation aller *rop1*-Transkripte notwendig ist.

Insbesondere die basale und Fuz7DD-induzierte Expression des kürzesten Transkripts erwies sich als absolut *kpp2*-abhängig (Abb. 20B, Spuren 3 und 4). Im Gegensatz dazu beeinflusste die Deletion von *prf1* im FB1P_{crG1}:fuz7DD-Hintergrund weder die basalen *rop1*-Transkriptmengen noch die Mengenverhältnisse der drei Transkripte (Abb. 20B, Spur 5). Auch die Fuz7DD-induzierte Anreicherung des kürzesten *rop1*-Transkripts wurde durch die Deletion von *prf1* nicht beeinträchtigt (Abb. 20B, Spur 6). Somit ist *prf1* nicht an der transkriptionellen Regulation von *rop1* beteiligt. Hingegen spielt Kpp2 bei der basalen und Fuz7DD-kontrollierten Transkription von *rop1* eine wichtige Rolle.

Da das *rop1*-Gen in seinem 5'-Bereich zwei Introns von 461bp und 442bp enthält (siehe Abschnitt 2.8, Abb. 10), erschien es möglich, dass die längeren *rop1*-Transkripte nicht gespleißte bzw. unvollständig gespleißte Vorläufer oder Varianten der *rop1*-mRNA darstellen könnten. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden 5'- und 3'-RACE-Experimente durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente dabei die bereits für die Northern-Analysen aus den Stämmen FB1P_{crG1}:fuz7DD und FB1Δ*kpp2*P_{crG1}:fuz7DD (vor und nach Arabinose-induktion) präparierte RNA (Abb. 20A, Spuren 1 bis 4). Die Agarosegelelektrophorese und anschließende Sequenzierung der amplifizierten 5'-RACE Produkte offenbarte die Existenz von vier *rop1*-RNA-Varianten (Abb. 21A; t1 - t4). Tatsächlich enthielt das längste der amplifizierten Transkripte beide Introns, während das kürzeste keinerlei Intronsequenz mehr aufwies. Die beiden amplifizierten *rop1*-Transkripte intermediärer Länge enthielten hingegen jeweils nur eines der beiden Introns (Abb. 21A; t3 bzw. t2). Das dem ungespleißten Transkript entsprechende RACE-Produkt (Abb. 21A; t4) konnte im Arabinose-induzierten Stamm FB1P_{crG1}:fuz7DD nicht nachgewiesen werden, während es in der uninduzierten Probe dieses Stammes und in beiden Proben des Δ*kpp2* P_{crG1}:fuz7DD-Stammes auftrat (Abb. 21A). Damit zeigt das dem ungespleißten *rop1*-Transkript entsprechende 5'-RACE-Produkt die gleiche Regulation wie das längste in der Northern-Analyse detektierte *rop1*-Transkript (Abb. 20A, Spuren 1 bis 4). Die unter Verwendung von Oligo-(dT)-Primern durchgeführten 3'-RACE-Experimente mit den oben beschriebenen RNA-Proben lieferten nach der PCR-Amplifikation mit *rop1*-spezifischen Oligonukleotiden nur ein spezifisches Produkt, welches in den FB1Δ*kpp2*P_{crG1}:fuz7DD-Proben nicht nachweisbar war (Abb. 21B). Die Sequenzierung ergab, dass dieses PCR-Produkt keinerlei Intronsequenzen mehr enthält und somit dem vollständig gespleißten *rop1*-Transkript entspricht (Abb. 21B; t1). Damit zeigt das dem vollständig gespleißten *rop1*-Transkript entsprechende 3'-RACE-Produkt die gleiche *kpp2*-abhängige Regulation wie das kürzeste in der Northern-Analyse detektierte *rop1*-Transkript (Abb. 20A, Spuren 1 bis 4). Diese Koinzidenz macht es wahrscheinlich, dass es sich bei den in der Northern-Analyse nachgewiesenen Transkripten (Abb. 20A und B)

tatsächlich um gespleißte und ungespleißte *rop1*-RNA handelt. Das Fehlen der längeren *rop1*-Produkte in dem Oligo-(dT)-Ansatz deutet an, dass weder das ungespleißte (Abb. 21A; t4) noch die beiden unvollständig gespleißten *rop1*-Transkripte (Abb. 21A; t3 und t2) polyadenyliert werden.

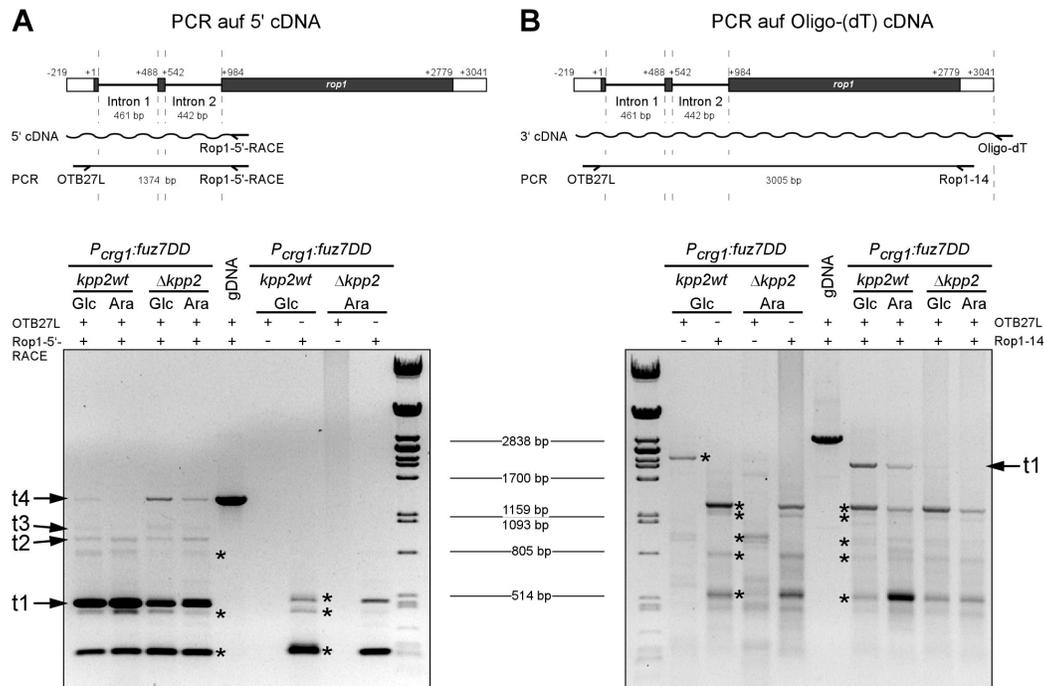


Abbildung 21: PCR-Amplifikation von *rop1*-cDNA-Varianten aus $\text{FB1P}_{\text{crg1}:fuz7DD}$ und $\text{FB1P}_{\text{crg1}:fuz7DD\Delta kpp2}$. In den schematischen Darstellungen der *rop1*-Genstruktur sind die drei Exons als Rechtecke dargestellt, wobei die potenziell Protein kodierenden Abschnitte grau hinterlegt sind. Die zwei Introns (1 und 2) sind als Linien eingezeichnet. Zahlen geben die Länge der Introns in Basenpaaren an. Oberhalb angegebene Werte kennzeichnen bp-Positionen relativ zum 1. ATG-Startcodon. Die gewellten Linien symbolisieren die als Matrize verwendete cDNA, gerade Linien stellen die PCR-Produkte dar, angegeben ist die Länge des mit genomischer DNA als Matrize erwarteten Amplifikats (=t4). Die relative Lage der verwendeten Oligonukleotide ist durch beschriftete Pfeile markiert. *rop1*-cDNA wurde ausgehend von Gesamt-RNA aus den in Glukose- (Glc) oder 5 h in Arabinose-haltigem Medium (Ara) gewachsenen Stämmen $\text{FB1P}_{\text{crg1}:fuz7DD}$ und $\text{FB1P}_{\text{crg1}:fuz7DD\Delta kpp2}$ synthetisiert (GeneRacer Kit; Invitrogen). Die erhaltene **A**) 5'-cDNA bzw. **B**) Oligo-(dT)-cDNA diente als Matrize in PCR-Reaktionen mit den angegebenen Oligonukleotidkombinationen (+/+). Als Kontrolle diente genomische *FB1* DNA als Matrize. Zusätzlich wurden die Oligonukleotide einzeln getestet (+/-). Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die mit t1-t4 beschrifteten Pfeile kennzeichnen verschiedene *rop1*-cDNA-Amplifikate, die sich durch die An- bzw. Abwesenheit der Intronsequenzen unterscheiden (t1: beide Intronsequenzen fehlen; t2: Intron1 fehlt; t3: Intron2 fehlt; t4: beide Intronsequenzen enthalten). Die Sternchen (*) markieren 'Einzelprime'-Produkte. Als Größenstandard diente *PstI*-verdaute λ -DNA.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die MAPK Kpp2 für die Expression von *rop1* benötigt wird und deuten außerdem auf eine Beteiligung von Kpp2 an der Prozessierung und Reifung der *rop1*-prä-mRNA hin.

2.1.17 Ein aktiver cAMP-Signalweg reprimiert die *rop1*-Expression

Da die *rop1*-Expression durch das MAPK-Modul reguliert wird und *rop1* bei der transkriptionellen Pheromonantwort eine zentrale Rolle spielt, stellte sich weiterhin die Frage, welchen Einfluß der neben der MAPK-Kaskade an der Regulation der transkriptionellen Pheromonantwort beteiligte cAMP-Signalweg (Müller *et al.*, 1999 und 2003; Krüger *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999; Kaffarnik *et al.*, 2003) auf die Expression von *rop1* hat. Dazu wurde die *rop1*-Expression in Stämmen mit genetisch aktiviertem bzw. inaktiviertem cAMP-Signalweg in Northern-Analysen untersucht (Abb. 22). Zu diesem Zweck wurde RNA aus den Stämmen FB1 Δ ubc1, FB1 Δ uac1 und FB1gpa3_{QL} isoliert. Als Kontrollen dienten der

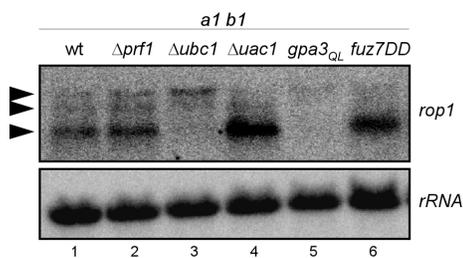


Abbildung 22: Ein aktivierter cAMP-Signalweg reprimiert die *rop1*-Expression. Für die Northern-Analyse wurden pro Spur 10 μ g Gesamt-RNA geladen und die Filter mit den Sonden *rop1* und *rRNA* (als Ladekontrolle) hybridisiert. Der Stamm FB1 (*wt*) und Derivate mit den oben angegebenen Genotypen wuchsen in CM-Glukose-Medium (Δ *uac1*: cAMP-Weg defekt; Δ *ubc1* und *gpa3_{QL}*: cAMP-Weg aktiviert). Zum Vergleich mit der *rop1*-Expression nach Aktivierung des MAPK-Moduls wurde außerdem RNA aus dem Arabinose-induzierten FB1P_{crG1}:*fuz7DD*-Stamm geladen.

nahezu keine *rop1*-Transkription mehr nachweisbar, während in *ubc1*-Deletionsmutanten ausschließlich die Expression des kürzesten *rop1*-Transkripts unterblieb (Abb. 22, Spuren 3 und 5). Im Gegensatz dazu hatte die genetische Inaktivierung des cAMP-Signalwegs durch die Deletion des Adenylatzyklasegens, *uac1*, eine starke selektive Induktion des kürzesten Transkripts zur Folge (Abb. 22, Spur 4). Diese selektive Induktion wurde auch nach der Aktivierung des MAPK-Moduls in dem Arabinose-induzierten FB1P_{crG1}:*fuz7DD*-Stamm beobachtet (Abb. 22, Spur 6 und Abb. 20, Spur 2). Die Entstehung des kürzesten *rop1*-Transkripts wird demnach von einem aktivierten cAMP-Signalweg verhindert, während eine Aktivierung des MAPK-Moduls induzierend wirkt. Die *rop1*-Expression unterliegt somit einer antagonistischen Regulation durch die MAPK-Kaskade und den cAMP-Signalweg.

Wildtyp- und der Δ *prf1*-Stamm, in denen alle drei *rop1*-Transkripte nachweisbar waren und die sich in den Expressionsniveaus der einzelnen Transkripte nicht voneinander unterscheiden (Abb. 22, Spuren 1 und 2). Es zeigte sich, dass die genetische Aktivierung des cAMP-Signalweg durch die Deletion der regulatorischen Untereinheit, Ubc1, der PKA oder durch das Einbringen des dominant-aktiven Allels der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins Gpa3_{QL} zu einer im Vergleich zum Wildtyp reduzierten *rop1*-Expression führte (Abb. 22, Spuren 1, 3 und 5). In dem FB1gpa3_{QL}-Stamm war

In Kombination mit dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Nachweis verschiedener, zum Teil unvollständig gespleißter *rop1*-Transkripte könnten diese Ergebnisse außerdem auf eine inhibitorische Wirkung des aktiven cAMP-Signalwegs auf die Prozessierung der *rop1*-prä-mRNA hindeuten.

2.1.18 *rop1*-Deletionsmutanten sind in der Lage, Maispflanzen effizient zu infizieren

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass *rop1* vom MAPK-Modul und vom cAMP-Weg reguliert wird und für die *prf1*-Expression essenziell ist und *rop1* damit sowohl für die transkriptionelle Pheromonantwort als auch für den Kreuzungsprozess auf Aktivkohleplatten benötigt wird. Da $\Delta prf1$ -Mutanten steril und apathogen sind (Hartmann *et al.*, 1996), sollten *rop1*-Deletionsmutanten, aufgrund der fehlenden *prf1*-Expression, zumindest eine attenuierte Pathogenität zeigen. Zur Untersuchung der Rolle von *rop1* während des Infektionsprozesses wurden Mischungen kompatibler *rop1*-Deletionsmutanten in junge Maispflanzen injiziert. Als Kontrolle diente eine Infektion mit den Wildtypstämmen FB1 und FB2, die in 94% der Pflanzen zur Tumorbildung führte (Tabelle 3). Nach der Infektion mit den entsprechenden *rop1*-Deletionsmutanten entwickelten ebenfalls 94% der Pflanzen Tumore (Tabelle 3). Die vollständige Unabhängigkeit der pathogenen Entwicklung von *rop1* wurde durch Infektionen mit Derivaten des solopathogenen Stammes SG200 (*a1:mfa2 bE1bW2*) bestätigt (Tabelle 3; SG200: 96%, SG200 $\Delta rop1$: 93%).

Tabelle 3: Pathogenität der *rop1*-Deletionsmutanten

Inokulum	Infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumoren	Tumorbildung
FB1 x FB2	31	29	94 %
FB1 $\Delta rop1$ x FB2 $\Delta rop1$	65	61	94 %
SG200	24	23	96 %
SG200 $\Delta rop1$	44	41	93 %
FB1 x FB2	19	17	89 %
FB1 $\Delta rop1$ x FB2 $\Delta rop1 rop1^{con}$	53	47	89 %

Damit ist *rop1* an der pathogenen Entwicklung überraschenderweise nicht beteiligt, obwohl es unter axenischen Bedingungen für die *prf1*-Expression und die *prf1*-abhängigen Entwicklungsschritte essenziell ist. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass *rop1* auf der Pflanze nicht für eine ausreichende *prf1*-Expression benötigt wird.

2.1.19 Auf der Pflanze erfolgt das Durchlaufen der Entwicklungsstadien und die Expression des *Pprf1:egfp*-Reporters in Abwesenheit von *rop1*

Um die wahrscheinlichste Annahme, dass *rop1*, im Gegensatz zu axenischen Bedingungen, auf der Pflanze nicht für die *prf1*-Expression benötigt wird, zu verifizieren, wurden die in Abschnitt 2.15 (Abb. 18 und Tabelle 2) bereits beschriebenen Wildtyp-*Pprf1:egfp*- und $\Delta rop1$ *Pprf1:egfp*-Stämme verwendet. Dies sollte die *in vivo* Analyse der *prf1*-Expression während diskreter Entwicklungsschritte ermöglichen. Mischungen der kompatiblen Wildtyp- bzw. $\Delta rop1$ -Stämme wurden in junge Maispflanzen injiziert oder zum Vergleich auf Aktivkohle-haltige Agarplatten getropft. Die auf der Blattoberfläche der infizierten Pflanzen befindlichen Wildtyp- bzw. $\Delta rop1$ -Mischungen wurden 16h bis 24h nach der Injektion mikroskopisch untersucht. Auf der Pflanzenoberfläche bildeten die $\Delta rop1$ -Derivate, wie die entsprechenden Wildtypstämme (Abb. 23A), Konjugationshyphen, die an den Spitzen fusionierten und schließlich dikaryotische Filamente und Appressorien hervorbrachten (Abb. 23B). Zusätzlich zeigten diese Entwicklungsstadien der $\Delta rop1$ -Derivate eine deutliche Expression des *prf1:egfp*-Reporters (Abb. 23B), die erwartungsgemäß auch bei den Wildtypstämmen zu beobachten war (Abb. 23A). Im Gegensatz dazu konnte auch nach 48h auf Aktivkohleplatten in den Mischungen der kompatiblen $\Delta rop1$ -Stämme mikroskopisch keine Fusionsereignisse oder Dikaryen gefunden werden und eine - falls überhaupt vorhandene - kaum wahrnehmbare GFP-Fluoreszenz war nur in einzelnen Fällen zu beobachten (Abb. 23C). Die Wildtypmischungen zeigten hingegen erwartungsgemäß auch unter diesen Bedingungen eine effiziente Dikaryenbildung und GFP-Fluoreszenz (Abb. 23C; obere Reihe bzw. untere Reihe). Zusätzlich wurde der Einfluß von hydrophoben Oberflächen bei gleichzeitiger Nährstofflimitation auf die Entwicklung von $\Delta rop1$ -Stämmen außerhalb der Pflanze untersucht. Dazu wurden Mischungen kompatibler Wildtyp- bzw. $\Delta rop1$ -Reporterstämme jeweils auch auf Parafilm und Petrischalen (ohne Nähragar) für 24h und 48h inkubiert und anschließend mikroskopiert. In allen Fällen bildeten die Wildtypmischungen bereits nach 24h grün fluoreszierende Dikaryen aus (Abb. 23C), während in den entsprechenden Mischungen der kompatiblen *rop1*-Deletionsstämme auch nach 48h keinerlei Dikaryen nachzuweisen waren (Abb. 23C, obere Reihe) und eine gerade noch sichtbare GFP-Fluoreszenz war nur in Einzelfällen zu beobachten (Abb. 23C, untere Reihe).

Diese Ergebnisse zeigen, dass *rop1* auf der Pflanzenoberfläche weder für eine ausreichende *prf1*-Expression noch für das Durchlaufen der frühen Entwicklungsschritte benötigt wird, während *rop1* außerhalb der Pflanzenumgebung sowohl für eine ausreichende *prf1*-Expression als auch damit verbunden für die erfolgreiche Dikaryenbildung essenziell ist.

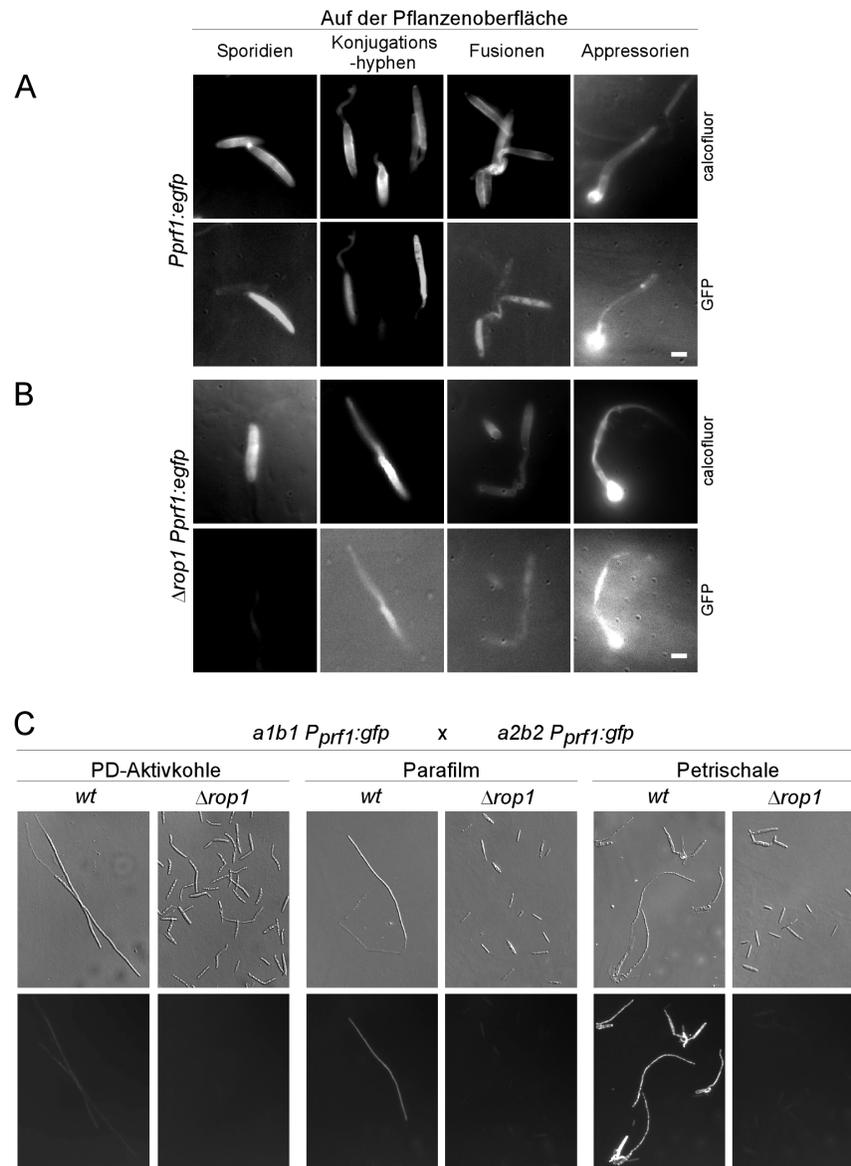


Abbildung 23: Entwicklungsstadien und *Pprf1:gfp*-Reportergenexpression in Mischungen kompatibler $\Delta rop1$ -Stämme: A) und B) auf der Pflanzenoberfläche. Die abgebildeten Epifluoreszenz-Aufnahmen zeigen Mischungen der kompatiblen Stämme $FB1P_{prf1:gfp}$ und $FB2P_{prf1:gfp}$ (*wt*) bzw. der kompatiblen $\Delta rop1P_{prf1:gfp}$ -Stämme ($\Delta rop1$), nach 24h auf der Pflanzenoberfläche. Die dargestellten Zellen befinden sich in den oben angegebenen Entwicklungsstadien. Wie auf der rechten Seite angedeutet, wurden die Zellen auf der Pflanzenoberfläche mit Calcofluor gefärbt und mittels Epifluoreszenz (DAPI-Filter) visualisiert (obere Reihen). Zur Darstellung der GFP-Fluoreszenz wurde der GFP-Filter verwendet (untere Reihen) **A)** *Pprf1:gfp*-Wildtyp-Mischungen. **B)** *Pprf1:gfp* $\Delta rop1$ -Mischungen. Bemerkenswert ist, dass die $\Delta rop1$ -Stämme alle Entwicklungsstadien durchlaufen und GFP-Fluoreszenz zeigen. **C) auf hydrophoben Oberflächen.** DIC- (obere Reihe) sowie Epifluoreszenz- (untere Reihe) Aufnahmen von den unter A) beschriebenen *wt*- bzw. $\Delta rop1$ -Mischungen. Die in H_2O_{bidest} gemischten *wt*- bzw. $\Delta rop1$ -Stämme wurden vor der Mikroskopie auf die jeweils angegebenen hydrophoben Oberflächen getropft und für 24-48h bei 28°C inkubiert.

2.1.20 Die Überexpression von *rop1* hat ebenfalls keinen Einfluß auf die Pathogenität

Um zu untersuchen, ob im Unterschied zu der Deletion von *rop1* dessen deregulierte Expression die pathogene Entwicklung beeinträchtigt, wurde eine einfache Kopie des *rop1*-Gens unter der Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors in den *ip*-Locus von FB2 Δ *rop1* integriert. Der resultierende FB2 Δ *rop1*^{con}-Stamm wurde zusammen mit dem kompatiblen Wildtypstamm FB1 in Maispflanzen injiziert. Als Kontrolle wurde eine Mischung der kompatiblen Wildtypstämme verwendet. Die Wildtypinfektionen induzierten in 89% der Pflanzen Tumore (Tabelle 3). Die Überexpression von *rop1* im *a2b2*-Partner führte zu keiner Beeinflußung der Tumorentwicklung (89%; Tabelle 3). Somit hat auch die Überexpression von *rop1* in einem der beiden Kreuzungspartner keinen Einfluß auf die Pathogenität.

2.2 Genetischer Ansatz zur Identifizierung von Zielgenen des morphologischen Zweiges der Pheromon-MAPK-Kaskade

Der verfolgte Kandidatengenansatz führte zwar zur Identifizierung von zwei weiteren sequenzspezifisch DNA-bindenden HMG-Domänen-Proteinen, Rop1 und Hmg3, jedoch nicht zu der Identifizierung des gesuchten Regulators der Konjugationshyphenbildung. Während Rop1 sich als essenzieller Aktivator der *prf1*-Expression in axenischer Kultur herausstellte und somit, wie *prf1* selbst, zumindest indirekt für die Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation benötigt wird, zeigten *hmg3*-Deletionsmutanten einen schwachen Zellfusionsdefekt der möglicherweise auf einer verminderten Expression des Pheromogens *mfa* beruht. *hmg3* ist jedoch nicht an der Ausbildung von Konjugationshyphen beteiligt. Somit ist nahezu ausgeschlossen, dass die morphologische Antwort auf die Aktivierung des Kpp2-MAPK-Moduls von einem sequenzspezifischen HMG-Domänen-Transkriptionsfaktor kontrolliert wird. Der gesuchte Regulator könnte jedoch einer anderen Proteinfamilie angehören. In *S. cerevisiae* wird der Pheromon-induzierte morphologische Wechsel durch eine Koordination von Zellzyklusarrest und gerichtetem Wachstum durch Far1p kontrolliert (Nern und Arkowitz, 1999; Cherkasova *et al.*, 1999). In der *Ustilago*-Genomsequenz konnte allerdings kein Gen mit Ähnlichkeit zu *far1* identifiziert werden.

Um eine weitestgehend unvoreingenommene Vorgehensweise zu gewährleisten, wurde daher ein genetischer Ansatz zur Identifizierung von konjugationshyphenspezifischen Zielgenen des Kpp2-MAPK-Moduls konzipiert.

2.2.1 Konstruktion eines zur Identifizierung von Komponenten der Konjugationshyphenbildung geeigneten Ausgangsstammes

Um unterhalb der Kpp2-MAPK-Kaskade agierende Komponenten der Konjugationshyphenbildung zu identifizieren, wurde von einem Stamm mit einem genetisch aktivierbaren MAPK-Modul ausgegangen. Die genetische Aktivierung der MAPK-Kaskade sollte über das bereits beschriebene konstitutiv aktive Allel der MAPKK Fuz7 (*fuz7DD*) unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg1*-Promotors erreicht werden. Durch UV-Mutagenese erzeugte Mutanten mit Defekten in konjugationshyphenrelevanten Komponenten sollten nicht mehr filamentös auf Arabinoseplatten wachsen und somit leicht von weiterhin filamentös wachsenden, Konjugationshyphen bildenden Stämmen zu unterscheiden sein. Bei der Konstruktion des FB1UV-Ausgangsstammes wurde von einer ektopischen Integration in den hierzu häufig genutzten *ip*-Locus abgesehen, da dies mit der Duplikation des *ip*-Allels (*ip^R* und *ip^S*) einhergeht und das integrierte *P_{crg1}:fuz7DD*-Konstrukt somit von direkten

Sequenzwiederholungen flankiert würde. Dies könnte bei einer UV-induzierten Rekombinationen zwischen dem *ipR*- und dem *ipS*-Allel den Verlust des Konstruktes bewirken und folglich zu nicht-filamentösen, falsch-positiven Kolonien führen. Zur Herstellung des Ausgangsstammes FB1UV (*a1 b1 P_{mfa1}[:gfp, nat^R, P_{crg1}:fuz7DD]mfa1*) für die UV-Mutagenese wurde das *P_{crg1}:fuz7DD*-Konstrukt stattdessen in den *mfa1*-Locus des

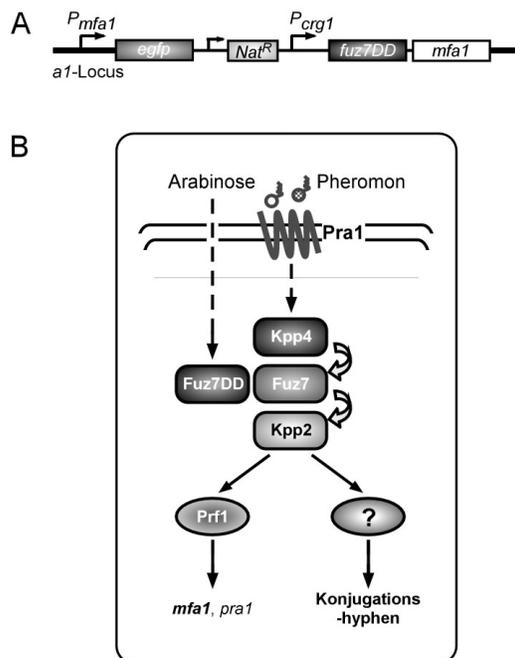


Abbildung 24: Eigenschaften des zur Identifizierung von Komponenten der Konjugationshyphenbildung konstruierten Stammes. **A)** Schematische Darstellung des *a1*-Locus des Ausgangsstammes. Gene sind als beschriftete Kästen dargestellt; Promotoren durch gewinkelte Pfeile. **B)** Modell zur Stimulation der Konjugationshyphenbildung durch die Arabinose-induzierte *fuz7DD*-Expression oder durch kompatibles Pheromon über die native MAPKK Fuz7. Die Funktionalität der MAPK Kpp2 ist durch die *prf1*-abhängige Expression des *P_{mfa1}:egfp*-Reporters überprüfbar.

Stammes FB1 (*a1 b1*) integriert. Um die Integrität der MAPK Kpp2 in nicht-filamentösen Mutanten leicht überprüfen zu können, enthielt das in den *mfa1*-Locus integrierte Konstrukt zusätzlich das *egfp*-Reportergen, welches nach der Integration unter der Kontrolle des nativen *mfa1*-Promotors stehen sollte (Abb. 24A). Dies sollte eine schnelle fluorimetrische Messung der *mfa1:gfp*-Expression von nicht-filamentösen UV-Mutanten ermöglichen. Da eine induzierte Expression des *mfa1:gfp*-Reporters in Arabinose-haltigem Medium sowohl die Expression des *fuz7DD*-Allels als auch die Funktionalität des *kpp2*-Gens erfordern sollte (Müller *et al.*, 2003), müßte das Fehlen von GFP-Fluoreszenz in nicht-filamentösen Mutanten auf Defekte in der *fuz7DD*-Expression oder im *fuz7DD*- oder *kpp2*-Gen hindeuten. Diese für die Zielsetzung uninteressanten Mutanten sollten somit effizient aussortiert werden können. Ein weiterer Vorteil der ektopischen Inte-

gration des *P_{crg1}:fuz7DD*-Konstruktes in den *mfa1*-Locus gegenüber dem homologen Austausch des nativen *fuz7*-Gens besteht darin, dass eine Wildtypkopie des *fuz7*-Gens unter der Kontrolle des nativen Promotors erhalten bleibt. Dies sollte zusätzlich die Bewertung der Konjugationshyphenbildung von Mutanten nach einer Stimulation mit synthetischem Pheromon ermöglichen (Abb. 24B). Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden im Rahmen eines Laborpraktikums in Zusammenarbeit mit Maurizio Di Stasio durchgeführt.

2.2.2 Isolierung nicht-filamentöser Mutanten

Der FB1UV-Ausgangsstammes zeigte im Hinblick auf die Kolonie- sowie die Zellmorphologie und die Expression des *mfal:gfp*-Reporters in Glukose- und Arabinosehaltigem Medium alle erwarteten Eigenschaften. In zwei unabhängige Mutageneserunden mit einer UV-Dosis von jeweils 40 mJ/cm² und abgeschätzten Überlebensraten von 7,9% (ca. 260.000 Mutanten) bzw. 1% (ca. 20.000 Mutanten) wurden insgesamt etwa 280.000 UV-Mutanten generiert. Bei Überlebensraten in diesem Bereich kann davon ausgegangen werden, dass die Wahrscheinlichkeit für Einzelmutationen hoch ist (Weinzierl, 2001; J. Kämper, pers. Mitteilung). Die nach 5 Tagen Wachstum auf CM-Arabinoseplatten gut sichtbaren Kolonien der UV-Mutanten zeigten die unterschiedlichsten Ausprägungen filamentösen Wachstums. Neben den vom Ausgangsstamm nicht zu unterscheidenden stark filamentösen Kolonien fanden sich sowohl reduziert filamentös wachsende Kolonien als auch die gewünschten nicht-filamentösen Kolonien. Desweiteren wurden hyperfilamentöse Kolonien, deren Filamente deutlich länger als die des Ausgangsstammes waren, beobachtet. Um sicherzustellen, dass die ausgewählten UV-Mutanten einen eindeutigen Defekt in der Konjugationshyphenbildung haben, wurden unter dem Binokular ausschließlich völlig glatte Kolonien zur Vereinzelung auf CM-Glukose-Platten ausgewählt. Diese Auswahl umfaßte insgesamt 262 nicht-filamentös wachsenden UV-Mutanten (durchnummeriert von #1 bis #262; Tabelle 8, siehe Anhang).

2.2.3 Charakterisierung der 262 nicht-filamentösen UV-Mutanten

Alle 262 vereinzelt nicht-filamentösen Mutanten wurden in CM-Glukose-Medium angezogen. Aus diesen Kulturen wurden parallel: (1) Glyzerinkulturen in 96-well-Mikrotiterplatten angelegt; (2) Zur Bestätigung des nicht-filamentösen Wachstums Aliquots auf CM-Arabinose-Platten ausgestrichen und (3) Pheromonstimulationen in Fluorimeter-kompatiblen 96-well-Mikrotiterplatten angesetzt (Details, siehe Material und Methoden). Bei der Bewertung des filamentösen Wachstums der vereinzelt Mutanten auf CM-Arabinose-Platten konnten von den 262 anfänglich isolierten Mutanten 235 als nicht-filamentös bestätigt werden. Die Inkubation mit synthetischem a2-Pheromon bzw. DMSO als Negativkontrolle erfolgte für 5h bei 28°C. Als Positivkontrolle wurde in jeder Mikrotiterplatte der Ausgangsstamm FB1UV mitgeführt. Desweiteren diente zellfreies Medium mit a2-Pheromon bzw. DMSO als Blindwert. Somit konnten pro Mikrotiterplatte 46 nicht-filamentöse UV-Mutanten untersucht werden. Im Anschluß an die Inkubation wurden zunächst die basale und induzierte Expression des *mfal:gfp*-Reporters sowie die Zelldichte (als OD₆₀₀) mittels Fluorimeteranalyse quantifiziert. Dies ermöglichte die Berechnungen von relativen Fluoreszenzwerten für

die basale sowie induzierte GFP-Expression jeder einzelnen Mutante (Tabelle 8, siehe Anhang). Mutanten die eine der jeweiligen Positivkontrolle (FB1UV) annähernd vergleichbare GFP-Induktion nach Pheromonstimulation aufwiesen, wurden hierbei als gewünschter GFP⁺-Phänotyp kategorisiert. Bei dem Vergleich der GFP-Fluoreszenz in den Mutanten mit

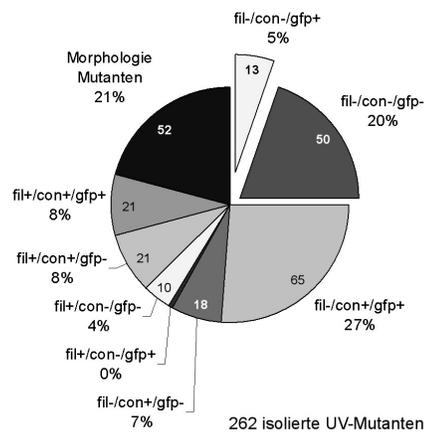


Abbildung 25: Häufigkeit verschiedener Phänotypen bei 262 untersuchten UV-Mutanten. Die Häufigkeit der einzelnen Phänotypen ist als prozentualer Anteil an allen charakterisierten UV-Mutanten angegeben. Zusätzlich ist die absolute Anzahl der Mutanten eines bestimmten Phänotyps in der jeweiligen Diagrammfläche angegeben. Phänotypen: fil: filamentöses Wachstum Arabinose-Platten; con: Konjugationshyphen nach Pheromonstimulation; gfp: Pheromon-induzierte *Pmfal:egfp*-Expression.

den entsprechenden Werten des Ausgangsstammes fiel auf, dass keine der isolierten 262 Mutanten nach der Pheromonbehandlung das GFP-Expressionsniveau des Ausgangsstammes erreichte. Mutanten ohne eine signifikant Pheromon-induzierte GFP-Expression erhielten die Bezeichnung GFP⁻. 90 Mutanten wurden hingegen als GFP⁺ klassifiziert. Unmittelbar im Anschluß an die Fluorimeteranalyse wurden die Pheromon-stimulierten 262 Mutanten mikroskopisch auf ihre Konjugationshyphenbildung untersucht (Tabelle 8, siehe Anhang). Dabei zeigte sich, dass lediglich 63 der auf Arabinoseplatten nicht-filamentös wachsenden Mutanten keine Konjugationshyphen nach Pheromonstimulation bildeten. Mutanten, die sowohl nach Pheromonstimulation als auch in den DMSO-Kontrollen eine aberrante Zellmorphologie zeigten, wurden als eigene Klasse definiert (Tabelle 8, siehe Anhang). Sie tragen vermutlich Mutationen in Zytoskelettkomponenten mit möglicherweise pleiotropen Effekten auf die Morphologie. Insgesamt zeigten 52 der 262 vereinzelt UV-Mutanten eine aberrante Zellmorphologie. Die Verteilung der verschiedenen Mutanten auf die definierten Phänotypenklassen ist in Abbildung 25 zusammengefaßt.

2.2.4 Konjugationshyphenbildung und *Pmfal:egfp*-Expression von 13 ausgewählten Mutanten

Die beschriebenen Charakterisierungen erlaubten schließlich die Identifikation von 13 nicht-filamentösen, Konjugationshyphen-defizienten aber GFP-exprimierenden (GFP⁺) Mutanten. Die Defekte in der Konjugationshyphenbildung wurden sowohl nach *fuz7DD*-Induktion als auch nach einer regulären Pheromonstimulation in 15-ml Plastikröhrchen (siehe

Material und Methoden) bestätigt (M. Di Stasio, Laborpraktikum). Nach dieser Pheromonbehandlung der 13 Mutanten wurde eine zwischen 6- und 16-fach erhöhte *mfal:egfp*-Reporterexpression beobachtet (Abb. 26). Im Vergleich dazu zeigte der Ausgangsstamm eine 11- bis 20-fache Pheromoninduktion der GFP-Fluoreszenz (Abb. 26). Die Induktionsfaktoren der meisten Mutanten lagen somit zumindest in demselben Bereich wie die des Ausgangsstammes. Auffällig war jedoch, dass die absoluten RFE-Werte (relative Fluoreszenzeinheiten) sowohl für die Basalexpression als auch für die Pheromon-induzierte *mfal:egfp*-Expression in den Mutanten in keinem Fall das Niveau des jeweils als Positivkontrolle mitgeführten Ausgangsstammes erreichte (Abb. 26).

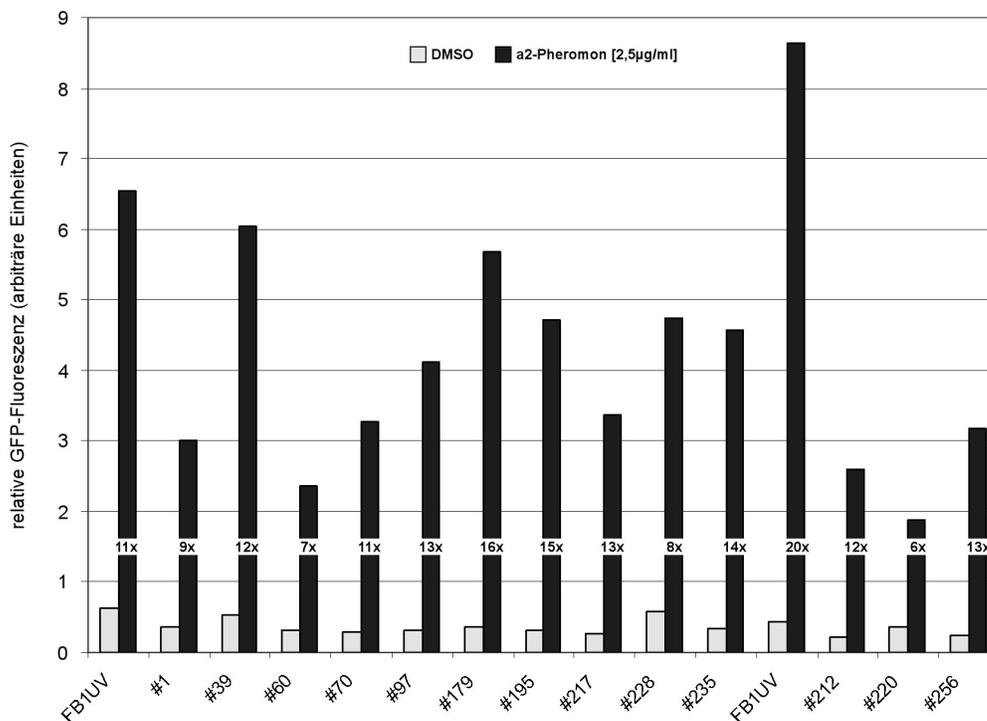


Abbildung 26: Pheromon-induzierte Expression des *mfal:egfp*-Reporters in 13 Konjugationshyphen-defizienten UV-Mutanten. Die angegebenen Stämme wurden mit 2,5 μ g/ml synthetischem α 2-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) in PPN-Röhrchen unter leichtem Rotieren inkubiert. Als Positivkontrolle diente der FB1UV-Ausgangsstamm und als Blindwert zellfreies Medien. Die optische Dichte (bei 600nm) sowie die GFP-Fluoreszenz wurden fluorimetrisch bestimmt. Die relative GFP-Fluoreszenz errechnet sich aus den auf die OD_{600} normalisierten Fluoreszenzwerten. Die den Balken zugeordneten Zahlen geben die Pheromon-Induktion des *egfp*-Reporters im Vergleich zur jeweiligen Basalexpression an.

2.2.5 Die 13 ausgewählten Konjugationshyphen-defizienten Mutanten zeigen nach Fuz7DD-Induktion keine Expression bekannter Zielgene der MAPK-Kaskade

Um die Induzierbarkeit des *fuz7DD*-Allels und die *kpp2*-Expression in den UV-Mutanten direkt zu überprüfen, wurde die RNA der in CM-Glukose bzw. CM-Arabinose inkubierten Mutanten und des Ausgangsstammes isoliert und Northern-Analysen unterzogen (Abb. 27).

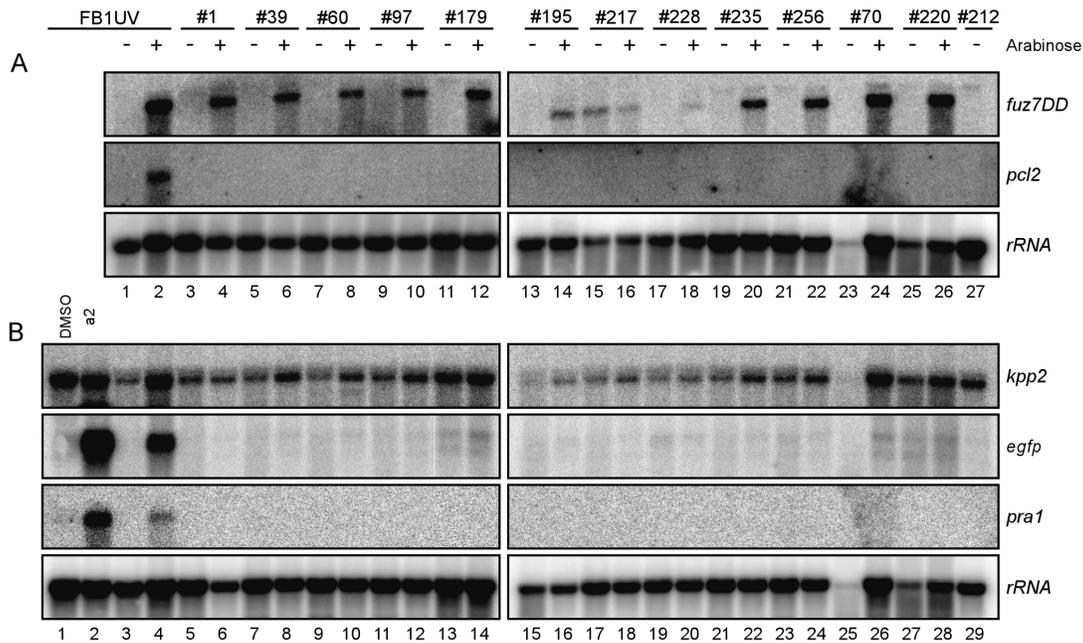


Abbildung 27: Expression bekannter Zielgenen des MAPK-Moduls in 13 Konjugationshyphen-defizienten UV-Mutanten. A) und B) Für die Northern-Analyse wurden pro Spur 10 µg Gesamt-RNA geladen und die Filter wurden mit den Sonden, die auf der rechten Seite angegeben sind, hybridisiert. Dabei diente die *rRNA*-Sonde als Ladekontrolle. Der FB1UV-Ausgangsstamm und die angegebenen UV-Mutanten wuchsen in Anwesenheit von Glukose (-) oder 5 h in Arabinose-haltigem Medium (+). In B) wurde zusätzlich Gesamt-RNA des für 5 h mit 2,5 µg/ml synthetischem a₂-Pheromon oder entsprechender Menge DMSO behandelten FB1UV-Ausgangsstamm aufgetragen.

Wie im Ausgangsstamm FB1UV (Abb. 27A, Spuren 1 und 2) konnte in allen 13 ausgewählten Mutanten die Arabinose-Induktion des *fuz7DD*-Allels nachgewiesen werden (Abb. 27A, Spuren 3 bis 29). Die Hybridisierung der Northern-Membranen mit einer *kpp2*-spezifischen Sonde zeigte weiterhin, dass alle untersuchten Mutanten eine mit dem Ausgangsstamm vergleichbare *kpp2*-Transkription aufwiesen (Abb. 27B). Folglich sind die Defekte in der Filamentbildung und in der Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation nicht in einer fehlenden Expression des MAPK-Gens *kpp2* begründet. Bei der weiteren Beprobung der Northern-Filter mit einer *gfp*-Sonde konnte jedoch, im Gegensatz zum Ausgangsstamm (Abb. 27B, Spuren 3 und 4), in keiner Mutante eine Fuz7DD-induzierte Expression des

mfa1:egfp-Reportergens nachgewiesen werden (Abb. 27B, Spuren 5 bis 29). Dieses Resultat wurde durch die Northern-Analyse des ebenfalls *prf1*-regulierten *pral*-Gens bestätigt (Abb. 27B). Eine Funktion der defekten Komponente(n) unterhalb der MAPK Kpp2 als essenzielle Regulator(en) von sowohl *prf1* als auch der Konjugationshyphenbildung würde dieses Resultat erklären. Mutationen im *kpp2*-Gen würden jedoch ebenfalls zu diesem Resultat führen. Um die Funktionalität des MAPK-Moduls noch eingehender zu analysieren, wurde daher eine *pcl2*-Sonde verwendet. Die Expression dieses Gens wurde in DNA-Microarray-Experimenten als *kpp2*-abhängig Fuz7DD-induziert beschrieben (*pcl2*, Cyclin-ähnlich; Eichhorn, 2004). Im Unterschied zur Expression des *mfa1:egfp*-Reportergens und der *pral*-Expression erfolgt die Expression des *pcl2*-Gens jedoch *prf1*-unabhängig (Eichhorn, 2004). Die Hybridisierung der Northern-Membranen mit dieser Sonde wies im Ausgangsstamm wie erwartet eine stark Fuz7DD-induzierte Expression nach (Abb. 27A, Spuren 1 und 2), während in keiner der Mutanten eine Transkription dieses Gens nachweisbar war (Abb. 27B, Spuren 3 bis 29). Diese Ergebnisse machten das Vorliegen von Mutationen im *kpp2*-Gen als Ursache der Mutantenphänotypen wahrscheinlich.

2.2.6 Alle 13 ausgewählten Mutanten tragen Mutationen im *kpp2*-Gen

Um die naheliegenste Vermutung, dass die Phänotypen der ausgewählten Mutanten auf Defekten im *kpp2*-Gen beruhen, direkt zu überprüfen, wurden die 13 Mutanten mit einem das *kpp2*-Gen konstitutiv exprimierenden, freireplizierenden Vektor transformiert. Als Negativkontrolle diente der leere Vektor. Der Filamentationsdefekt aller 13 Mutanten konnte durch das *kpp2*-Plasmid, nicht jedoch durch den leeren Vektor komplementiert werden (M. Di Stasio, Laborpraktikum). Folglich tragen vermutlich alle 13 ausgewählten Mutanten zum Funktionsverlust führende Mutationen im *kpp2*-Gen. Zur Bestätigung und um die jeweiligen Mutationen in den *kpp2*-Genen der 13 Mutanten zu kartieren, wurde der *kpp2*-ORF der einzelnen Mutanten mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Lediglich für Mutante #60 gelang es nicht ein *kpp2*-PCR-Produkt zu amplifizieren. Vergleiche mit der Wildtypsequenz ergaben, dass die *kpp2*-Allele der Mutanten alle unterschiedliche Mutationen enthielten. In 3 Fällen wurden Rasterschubmutationen durch Duplikationen, Insertionen oder Deletionen identifiziert, während in den anderen 9 Fällen unterschiedliche 'Missense'-Mutationen gefunden wurden (Abb. 29, Diskussion). Die in den 13 UV-Mutanten beobachteten Defekte in der Konjugationshyphenbildung basieren also alle auf unterschiedlichen Mutationen im *kpp2*-Gen.

3 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit konnten, neben Prf1, zwei weitere sequenzspezifisch DNA-bindende HMG-Domänen-Transkriptionsfaktoren, Rop1 und Hmg3, in *U. maydis* identifiziert werden. Rop1 ist für die Konjugationshyphenbildung sowie die transkriptionelle Pheromonantwort in axenischer Kultur erforderlich. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Rop1 einen essenziellen Aktivator der *prf1*-Expression darstellt. Die Konjugationshyphenbildung kontrolliert Rop1 jedoch nur indirekt über die *prf1*-vermittelte Expression des Pheromonrezeptors. Ferner erlaubten Epistasis-Analysen die Einordnung von *rop1* unterhalb des MAPK-Moduls. Mit Rop1 konnte demnach ein unterhalb der MAPK Kpp2 postulierter, die *prf1*-Expression induzierender Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Überraschenderweise wird Rop1 jedoch, trotz seiner essenziellen Rolle bei der Transkription von *prf1* während des Wachstums außerhalb der Pflanze, für die *prf1*-Expression auf der Pflanzenoberfläche nicht benötigt. Der dritte sequenzspezifische HMG-Domänen-Transkriptionsfaktor in *U. maydis*, Hmg3, spielt hingegen nur eine untergeordnete Rolle bei der sexuellen Entwicklung. *hmg3*-Deletionsmutanten zeigten lediglich einen schwachen Kreuzungs- und Pathogenitätsdefekt, der vermutlich auf die verminderte Expression des Pheromogens *mfa* zurückzuführen ist.

Darüber hinaus wurde in einem genetischen Ansatz versucht, Komponenten des morphologischen Zweiges der Pheromonantwort zu identifizieren. Von zunächst 262 isolierten, nach Fuz7DD-Induktion nicht filamentös wachsenden UV-Mutanten, zeigten 13 nach Pheromonstimulation Konjugationshyphen-spezifische Defekte. Sie bildeten keine Konjugationshyphen, exprimierten jedoch das *mfa1::egfp*-Reportergen. Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass die Defekte in allen dreizehn Stämmen auf Mutationen im *kpp2*-Gen zurückzuführen sind. Es konnte also mit diesem Ansatz kein Konjugationshyphen-spezifisches Zielgen der MAPK-Kaskade identifiziert werden.

3.1 HMG-Domänen-Proteine als Regulatoren der sexuellen Entwicklung

Die in dieser Arbeit identifizierten Transkriptionsfaktoren, Rop1 und Hmg3, gehören, wie Prf1, zu der sequenzspezifisch DNA-bindenden Klasse der HMG-Domänen-Proteine. Damit existieren in *U. maydis* drei Regulatoren dieser Proteinfamilie. Eine BLAST-Analyse ergab, dass die bisher verfügbare Genomsequenz des humanpathogenen Basidiomyceten *C. neoformans* ebenfalls für drei sequenzspezifische HMG-Box-Proteine kodiert. Dies erscheint besonders interessant, da in *C. neoformans* der zentrale Regulator der

Pheromonantwort noch nicht identifiziert wurde. So könnte eines dieser drei bisher nicht untersuchten HMG-Domänen-Proteine in *Cryptococcus* unterhalb der Pheromon-MAPK-Kaskade agieren. In *C. neoformans* liegen also sowohl das an der monokaryotischen Differenzierung beteiligte Ste12-Homeodomänenprotein als auch drei sequenzspezifische HMG-Box Proteine vor. In *S. cerevisiae* existiert neben dem zentralen Homeodomänen-Regulator der Pheromonantwort, Ste12p, hingegen nur ein sequenzspezifisches HMG-Domänen-Protein, Rox1p. Im Gegensatz dazu konnte in der *Ustilago*-Genomsequenz kein Ste12-ähnliches Homeodomänenprotein identifiziert werden, somit entspricht die Situation in *U. maydis* eher der in *S. pombe*. Das Genom der Spaltheife kodiert lediglich für zwei sequenzspezifische HMG-Domänenproteine, Ste11 und Mat1-Mc, die beide für die sexuelle Entwicklung essenziell sind. In *U. maydis* führt die Deletion von *hmg3* zu geringen Kreuzungs- und Pathogenitätsdefekten. Die leicht reduzierte Expression des Pheromogens *mfa* in *hmg3*-Deletionsmutanten könnte diese Phänotypen erklären. So würde in Kreuzungen kompatibler $\Delta hmg3$ -Stämme eine verringerte *mfa1*-Expression zu einer geringeren Fusions-effizienz führen, da sich die Zellen gegenseitig schlechter stimulieren als Wildtypzellen. Damit wäre die Expression des Pheromonrezeptors ebenfalls geringer. Dies würde letztlich die Wahrscheinlichkeit eines gerichteten Aufeinanderzuwachsens und einer Fusion verringern. Dies trifft auch auf die Situation auf der Pflanze zu. Im Gegensatz zu der geringen Beteiligung von Hmg3 an der sexuellen Entwicklung ist Rop1 als zentraler Regulator der *prf1*-Genexpression für die sexuelle Differenzierung in axenischer Kultur essenziell.

3.2 Rop1, ein kritischer Regulator der *prf1*-Expression

Die Untersuchungen von *rop1*-Deletionsstämmen haben gezeigt, dass *rop1* für die transkriptionelle Pheromonantwort und die Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation unentbehrlich ist. Die konstitutive Expression des Pheromonrezeptors Pra bzw. die Induktion des konstitutiv aktiven *fuz7DD*-Allels in $\Delta rop1$ -Zellen offenbarte jedoch, dass *rop1* für die Konjugationshyphenbildung nicht benötigt wird. Rop1 ist also kein direkter Regulator der morphologischen Pheromonantwort. Im Gegensatz dazu war *rop1* auch dann noch für die transkriptionelle Pheromonantwort erforderlich, wenn die Notwendigkeit für die Perception eines Pheromonsignals durch ein genetisch aktiviertes MAPK-Modul umgangen wurde. Das legte die Vermutung nahe, dass *rop1* für die basale und Pheromon-induzierte Expression von *prf1* erforderlich ist, da sich damit alle Phänotypen der *rop1*-Deletionsmutanten während der Zellfusion, der transkriptionellen Pheromonantwort und der Dikaryenbildung in axenischer Kultur erklären lassen. Die Beobachtung, dass die konstitutive Expression von *prf1* die Kreuzungsdefekte von *rop1*-Deletionsmutanten komplementierte, die

konstitutive Expression des Pheromonrezeptors Pra jedoch nicht, untermauerte die Funktion von Rop1 als transkriptioneller Aktivator von *prf1*. Zusätzlich wurde diese Annahme durch den *in vitro* Nachweis der direkten Bindung von Rop1 an den *prf1*-Promotor bestätigt (siehe Abschnitt 2.16). Demzufolge aktiviert Rop1 direkt die *prf1*-Transkription. In *S. pombe* aktiviert das ebenfalls zur Familie der sequenzspezifischen HMG-Domänen Proteine gehörende Ste11 direkt die Expression von Mat1-Mc (Sipiczki, 1988; Sugimoto *et al.*, 1991). *mat1-mc* kodiert wiederum für ein sequenzspezifisches HMG-Box Protein, welches in M-Zellen als transkriptioneller Aktivator der Pheromonantwort für die Zellfusion sowie die Sporulation und Meiose erforderlich ist (Kelly *et al.*, 1988; Kjaerulff *et al.*, 1997). Somit regulieren sowohl in *S. pombe* als auch in *U. maydis* Transkriptionsfaktoren der HMG-Familie die Expression eines zweiten zentralen Regulators dieser Proteinfamilie.

3.3 Rop1 bindet an spezifische DNA-Elemente im *prf1*-Promotor

Der komplex regulierte *prf1*-Promotor enthält in seinem proximalen Teil zwei PRE-Boxen, über die das *prf1*-Genprodukt seine eigene Expression kontrolliert. Das distale regulatorische UAS-Element ist für die *prf1*-Transkription essenziell und wird in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und dem Nährstoffangebot reguliert (Hartmann *et al.*, 1996 und 1999). Die Deletion von *rop1* hat keinen Einfluß auf die Expression des *3xUAS:sgfp*-Reporters in dem Stamm HA232, d. h. dass Rop1 die *prf1*-Expression nicht über die UAS steuert. Vielmehr zeigten Gelretardationsexperimente in Kombination mit quantitativen Kompetitionsanalysen unter Verwendung von spezifischen und unspezifischen Oligonukleotiden, dass die HMG-Domäne von Rop1 *in vitro* spezifisch an ein elf Basenpaare umfassendes Sequenzmotiv (Konsensus: ATTGT[C/T][C/T]T[A/T]TC) im *prf1*-Promotor bindet. Die Aktivierung der *prf1*-Expression durch Rop1 erfolgt also wahrscheinlich direkt über die Interaktion mit den im *prf1*-Promotor identifizierten RRS-Elementen ('*Rop1 Recognition Site*'). Die Analyse auf die *in vivo* Funktionalität des RRS-Motivs steht jedoch noch aus. Dazu wurden bereits Reporterstrukturen hergestellt, die das *egfp*-Reportergen unter der Kontrolle des mit drei bzw. sechs Wiederholungen des RRS-Elements fusionierten *mfa1*-Basalpromotors tragen. Mit Hilfe dieses Stammes wird sich zeigen lassen, ob die *in vitro* identifizierten RRS-Elemente für eine *rop1*-abhängige Expression ausreichend sind. Um auch ihre Notwendigkeit für die *prf1*-Expression zu zeigen, müßten die RRS-Elemente im *prf1*-Promotor deletiert/substituiert werden. Dies könnte entweder im nativen *prf1*-Locus des solopathogenen SG200-Stammes erfolgen, wobei die Filamentbildung auf Aktivkohleplatten als Bewertung der Aktivität herangezogen würde. Alternativ ließen sich die RRS-Elemente im $P_{prf1}:gfp$ -

Reporterkonstrukt substituieren. Die Auswirkungen dieser Modifikation könnten durch Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz bewertet werden.

Die HMG-Domäne von Prf1 zeigte erwartungsgemäß eine spezifische Interaktion mit den bereits bekannten PRE-Boxen (TCCCTTTGT), während die HMG-Domäne von Rop1 spezifisch mit dem RRS-Element (Konsensus: ATTGT[C/T][C/T]T[A/T]TC) interagiert. In *U. maydis* binden Prf1 und Rop1 also an distinkte Promotorelemente. Die beiden sequenzspezifischen HMG-Domänen-Proteine Ste11 und Mat1-Mc in *S. pombe* binden hingegen beide mit vergleichbarer Affinität an das TR- (*T-Rich*) Element (Konsensus: TTTCTTTGTT). Dieses zehn Basenpaare umfassende Motiv wird von Ste11 allein effektiv erkannt (Sugimoto *et al.*, 1991). Das um die zwei 5'-Thymidine kürzere Motiv TCTTTGTT wird von Ste11 jedoch nur ineffizient gebunden, und das daran noch hochaffin bindende Mat1-Mc rekrutiert Ste11 über eine Interaktion der HMG-Domäne an diese verkürzten TR-Elemente und ermöglicht so die Expression M-Zell-spezifischer Promotoren (Dooijes *et al.*, 1993; Kjaerulff *et al.*, 1997). Ein Vergleich des TR-Elements mit der Sequenz des RRS-Motivs zeigt die größte Ähnlichkeit im 3'-Bereich der Motive (Tabelle 4). Der 5'-Bereich zeigt hingegen die größte Übereinstimmung mit der Halbseite des *hypoxic operators* (HOP: YYYATTGTTCTC), der Bindestelle des einzigen sequenzspezifischen HMG-Domänen Proteins in *S. cerevisiae*, Rox1p (Balasubramanian *et al.*, 1993) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zielsequenzen pilzlicher HMG-Domänen Proteine

Protein	Organismus	Zielsequenz		Referenzen
Rop1	<i>U. maydis</i>	YYATTGTTCTATC	RRS1	diese Arbeit
		YYATTGTCCTTTC	RRS2	-"
		YYATTGTCCTTTC	RRS3	-"
Rox1p	<i>S. cerevisiae</i>	YYYATTGTTCTC	HOP	Balasubramanian <i>et al.</i> , 1993; Deckert <i>et al.</i> , 1998
Rfg1	<i>C. albicans</i>	YYYATTGTTCTC	-	Kadosh & Johnson, 2001; Khalaf & Zitomer, 2001
Prf1	<i>U. maydis</i>	TCCCTTTGT	PRE	Hartmann <i>et al.</i> , 1996, Urban <i>et al.</i> , 1996a
Ste11	<i>S. pombe</i>	TTCTTTGTT	TR	Sugimoto <i>et al.</i> , 1991; Kjaerulff <i>et al.</i> , 1997
Mat-Mc	<i>S. pombe</i>	[tt]TCTTTGTT	TR	Dooijes <i>et al.</i> , 1993; Kjaerulff <i>et al.</i> , 1997

Im Gegensatz zu Rop1, das in *U. maydis* als Aktivator der *prf1*-Expression agiert, fungiert Rox1p in *S. cerevisiae* als Repressor für Gene, die bei Sauerstofflimitierung benötigt werden (Zitomer *et al.*, 1996). Interessanterweise bindet das HMG-Box-Protein Rfg1 in dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* an das gleiche Sequenzmotiv wie Rox1p in *S. cerevisiae*. Rfg1 ist in *C. albicans* jedoch nicht an der transkriptionellen Antwort auf Sauerstoffmangel beteiligt, sondern kontrolliert das filamentöse Wachstum in Abhängigkeit von verschiedenen Umwelteinflüssen (Khalaf und Zitomer, 1999). Dies erscheint im Hinblick auf mögliche zusätzliche Funktionen von Rop1 interessant, da das in dieser Arbeit identifizierte von Rop1

gebundene RRS-Motiv sich in einer Reihe weiterer putativer Promotorbereiche des *U. maydis*-Genoms findet (Tabelle 5).

Tabelle 5: RRS-Elemente in putativen Promotorbereichen der *U. maydis*-Genomsequenz

ORF ^a	mutmaßliche Funktion/Homologie	Position	RRS-Sequenz
90_130	`pheromone response factor'; Prf1/ <i>U. maydis</i>	-1908	ATTGTCCTTTTC
		-501	ATTGTCCTTTTC
		-423	ATTGTTCTATC
124_520	Aspartat-/Glutamatttransporter/ <i>S. cerevisiae</i>	-553	ATTGTCCTTATC
6_50	Aminosäure-Permease, GAP1/ <i>C. albicans</i>	-929	ATTGTTTTTTTC
30_460	Methionin-Synthase/Methyltransferase, Met-8/ <i>Neurospora crassa</i>	-858	ATTGTCCTATC
189_100	Pepsinogen AIIb, Pep2b/ <i>Pleuronectes americanus</i>	-1097	ATTGTCCTTTTC
205_50	hypothetischer `Major facilitator'/ <i>S. pombe</i>	-2682	ATTGTCCTTTTC
86_140	Chitin-Synthase5/ <i>U. maydis</i>	-58	ATTGTCCTTTTC
2_1160	Chitooligosaccharid-Deacetylase/ <i>Brucella melitensis</i>	-356	ATTGTCCTTTTC
2_1030	Zinkfinger-Protein, FacB (Acetat-Regulation)/ <i>Aspergillus nidulans</i>	-1023	ATTGTTCTTTTC
30_470	MIC1 GTPase-aktivierendes Protein, Rab1p/ <i>S. cerevisiae</i>	-714	ATTGTCCTATC
186_530	Suppressorprotein SPT23/ <i>S. cerevisiae</i>	-2576	ATTGTTCTATC
191_860	Flavin-Monooxygenase, Fmo-14/ <i>Caenorhabditis elegans</i>	-833	ATTGTCCTTTTC
86_270	H ⁺ -ATPase (P-Typ), PMA1/ <i>Blumeria graminis</i>	-2440	ATTGTCCTTTTC
183_110	mutmaßliches Membranprotein, YDR104c/ <i>S. cerevisiae</i>	-268	ATTGTTCTTTTC
79_150	uncharakterisierte Proteinfamilie, IMPACT/ <i>Homo sapiens</i>	-65	ATTGTTTTTTTC
215_40	keine Homologie	-17	ATTGTCCTTTTC
215_50	keine Homologie	-946	ATTGTCCTTTTC
77_20	keine Homologie	-3314	ATTGTCCTTTTC
79_140	keine Homologie	-458	ATTGTTTTTTTC
86_150	keine Homologie	-163	ATTGTCCTTTTC
142_190	keine Homologie	-665	ATTGTTTTTTTC
153_80	keine Homologie	-1219	ATTGTTCTTTTC

^a Angegeben als Annotationsnummern der GENRE-Datenbank (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>)

Diese Tatsache impliziert eine Beteiligung von Rop1 an der transkriptionellen Regulation von weiteren Genen neben *prf1*. Eine Homologie-basierte Kategorisierung der entsprechenden Genprodukte ließ jedoch keine eindeutige Präferenz für bestimmte zelluläre Prozesse erkennen. Einige der mutmaßlichen Genprodukte scheinen jedoch am Aminosäuremetabolismus beteiligt zu sein. Desweiteren findet sich jeweils ein RRS-Element in den Promotoren des Chitin-Synthase5-Gens und eines Gens mit Homologie zu Chitooligosaccharid-Deacetylasen (Tabelle 5). Im Gegensatz zum *prf1*-Promotor, in dem die drei *in vitro* Rop1-bindenden RRS-Elemente vorliegen, findet sich in den putativen Promotorregionen dieser Gene jeweils nur ein RRS-Element (Tabelle 5). In *rop1*-Deletionsmutanten traten unter den verwendeten Kulturbedingungen neben den auf der unzureichenden *prf1*-Expression basierenden Defekten keine zusätzlichen Phänotypen auf, so dass kein Rückschluß auf weitere Rop1-regulierte Prozesse möglich ist. Ein Vergleich der Expressionsprofile der Stämme FB1fuz7DDΔ*prf1* und FB1fuz7DDΔ*rop1*Δ*prf1* über DNA-Microarray-Experimente würde die Identifizierung weiterer *rop1*-regulierter Gene ermöglichen.

3.4 MAPK-Kaskade und cAMP-Signalweg wirken antagonistisch auf die *rop1*-Genexpression

Da *rop1* für die Expression von *prf1* und die Expression der *prf1*-regulierten Paarungstypgene auch dann noch erforderlich ist, wenn die Notwendigkeit einer Stimulation über den Pheromonrezeptors durch die genetische Aktivierung der MAPK-Kaskade umgangen wird, agiert Rop1 vermutlich unterhalb des MAP-Kinasemoduls. Die Beobachtung, dass die *rop1*-Genexpression durch die MAPK-Kaskade reguliert wird, bestätigte diese Annahme. *Prf1* ist hingegen nicht an der transkriptionellen Regulation von *rop1* beteiligt. Die drei in Northern-Analysen nachgewiesenen *rop1*-Transkripte können durch unvollständiges Spleißen der beiden Introns im 5'-Bereich der *rop1*-prä-mRNA erklärt werden. Die Resultate aus 3'-RACE-Experimenten lieferten ferner einen Hinweis darauf, dass lediglich das kürzeste im Northern-Blot detektierte *rop1*-Transkript vollständig gespleißt und polyadenyliert vorliegt. Somit scheint nur das kürzeste Transkript die reife *rop1*-mRNA zu repräsentieren. Interessanterweise induzierte die Expression der konstitutiv aktiven MAPKK Fuz7DD selektiv die Expression dieses kürzesten *rop1*-Transkripts. Dies erforderte außerdem die unterhalb von Fuz7 agierende MAPK Kpp2. Das aktive MAPK-Modul induziert also nicht nur die *rop1*-Transkription, sondern scheint zusätzlich eine Rolle bei der Prozessierung bzw. Reifung der *rop1*-prä-mRNA zu spielen. Bisher ist jedoch unklar, wie dies erreicht wird. Es existiert jedoch ein Beispiel für die Beteiligung eines MAPK-Moduls bei der Regulation von Spleißprozessen: In menschlichen Zelllinien wird das alternative Spleißen der CD44-prä-mRNA über die Phosphorylierung des RNA-Bindeproteins Sam68 durch die ERK-Kinase reguliert (Matter *et al.*, 2002; Weg-Remers *et al.*, 2001).

Die *rop1*-Expression unterliegt außerdem einer Regulation durch den cAMP-Signalweg. Während die Aktivierung des cAMP-Signalwegs durch Deletion der regulatorischen Untereinheit Ubc1 der PKA oder das dominant aktive Allel der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins Gpa3_{Q206L} zu einer nahezu vollständigen Repression der *rop1*-Transkription führte und lediglich geringe Mengen des längsten, vermutlich ungespleißten Transkripts, nachweisbar waren, bewirkte die Inaktivierung dieses Signalwegs durch Deletion des Adenylatzyklasegens *uac1* eine selektive Induktion des kürzesten *rop1*-Transkripts. Ein aktiver cAMP-Weg reprimiert also die *rop1*-Expression. Im Hinblick auf die oben beschriebenen Ergebnisse der *rop1*-cDNA-Analyse könnte das Auftreten verschieden langer *rop1*-Transkripte in den $\Delta ubc1$ - und $\Delta uac1$ -Mutanten zusätzlich darauf hindeuten, dass auch der cAMP-Weg, vermutlich über die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), Adr1, die Prozessierung der *rop1*-prä-mRNA beeinflusst. Eine Beteiligung von PKA bei der Regulation des Spleißvorgangs wurde bisher nicht beschrieben, jedoch phosphoryliert die mit

den PKAs sehr nahe verwandte cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG-I) in neuronalen Zellkulturen und im Rattenhirn den Spleißfaktor SF1 und verhindert dadurch die initiale Assemblierung des Spleißosomkomplexes und so vermutlich die Prozessierung von prä-mRNA (Wang *et al.*, 1999). Zusätzlich zu einer möglichen Beteiligung an der Regulation des Spleißens von *rop1*-prä-mRNA wirken cAMP- und MAPK-Signalweg auf das *rop1*-Expressionsniveau. Ein aktiver cAMP-Signalweg reprimiert die Expression, während sie durch ein aktives MAPK-Modul induziert wird. Die nach Pheromonstimulation nahezu unveränderte *rop1*-Expression stellt demnach vermutlich das durch die Aktivierung beider Wege ausbalancierte *rop1*-Niveau dar. Über beide Signalwege weitergeleitete Umweltsignale könnten also über die Expression von *rop1* zu zellulären Antworten integriert werden. Ein ähnliches Regulationsmuster wird für die IME2-ähnliche MAPK Crk1 beschrieben, die an der Regulation von Zellzyklus und Morphogenese beteiligt ist (Garrido und Perez-Martin, 2003). Im Hinblick auf die Funktion und die sehr ähnliche Regulation von *rop1* ist sehr interessant, dass auch *crk1* für eine ausreichende *prf1*-Expression erforderlich ist (Garrido *et al.*, 2004).

Das Vorliegen von potenziellen MAPK- und PKA-Phosphorylierungsstellen im Rop1-Protein könnte außerdem darauf hindeuten, dass Kpp2 und Adr1 nicht nur an der Expression und möglicherweise Reifung der *rop1*-mRNA beteiligt sind, sondern zusätzlich die Aktivität des Rop1-Proteins kontrollieren. Das *rop1*-Genprodukt könnte also auf drei Regulations Ebenen die Interaktion zwischen cAMP-Signalweg und MAPK-Kaskade bei der Integration diverser Umweltsignale koordinieren.

3.5 Umweltreize auf der Pflanzenoberfläche - Rop1 wird für die *prf1*-Expression und die sexuelle Entwicklung auf der Pflanze nicht benötigt

Während Rop1 für die Transkription von *prf1* im Verlauf des Kreuzungsprozesses und der Dikaryenbildung in axenischer Kultur und auf hydrophoben Oberflächen absolut erforderlich ist, wird *rop1* für die pathogene Entwicklung auf der Pflanze nicht benötigt. Diese Beobachtung war sehr überraschend, da *prf1* nicht nur für den Kreuzungsprozess auf Nährmedien, sondern auch für die Zellfusion auf der Pflanze und die anschließende pathogene Entwicklung unentbehrlich ist (Hartmann *et al.*, 1996). Die Verwendung von $\Delta rop1 P_{prf1}:egfp$ -Reporterstämmen in Infektionsstudien zeigte dann auch, dass *prf1* auf der Pflanzenoberfläche in Abwesenheit von *rop1* ausreichend exprimiert wird, um auf den kompatiblen $\Delta rop1$ -Partner mit der Bildung von Konjugationshyphen und Dikaryen zu reagieren und die weitere pathogene Entwicklung ungestört zu durchlaufen. Im Gegensatz dazu unterblieb die Dikaryenbildung und $P_{prf1}:egfp$ -Expression in Mischungen kompatibler $\Delta rop1 P_{prf1}:egfp$ -Stämme auf Aktivkohleplatten, Petrischalen und Parafilm. Die Diskrepanz

zwischen der essenziellen Rolle von *rop1* für die *prf1*-Expression in axenischer Kultur und der *rop1*-unabhängigen *prf1*-Expression auf der Pflanzenoberfläche verdeutlicht die Bedeutung von bereits lange postulierten Pflanzensignalen bei der sexuellen Entwicklung von *U. maydis*. Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten kompatiblen $\Delta rop1 P_{prf1}:egfp$ -Stämme sollten eine Suche nach relevanten Umweltreizen oder Pflanzenkomponenten ermöglichen. Die Integration des $P_{prf1}:egfp$ -Reporters in den solopathogenen SG200 $\Delta rop1$ -Stamm würde einen noch geeigneteren Indikatorstamm ergeben, da stimulierende Substanzen und Bedingungen in diesem Stamm nicht erst die Zellfusion induzieren müssten um filamentöses Wachstum hervorzurufen. Die Identifizierung von Umweltreizen würde einen wichtigen Beitrag zur *in vitro* Appressorienbildung leisten, die bisher in *U. maydis* nicht etabliert werden konnte. In anderen Pilzen sind bereits für die *in vitro* Appressorienbildung relevante Umweltreize identifiziert worden. So erfasst der Rostpilz *Uromyces appendiculatus* die physikalischen Eigenschaften der Pflanzenoberfläche, während *Magnaporthe grisea* und *Colletotrichum gloeosporioides* auf hydrophobe, feste Oberflächen und chemische Signale wie Wachse reagieren (Gilbert *et al.*, 1996; Hoch *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2000; Kolattukudy *et al.*, 1995; Lee und Dean, 1994; Podila *et al.*, 1993; Tucker und Talbot, 2001).

Dass in *U. maydis* *rop1* für die Expression von *prf1* auf der Pflanzenoberfläche nicht benötigt wird, verdeutlicht nicht nur die Rolle von pflanzlichen Signalen, sondern deutet auch auf die Existenz eines weiteren Transkriptionsfaktors hin. Die Weiterleitung von Pflanzensignalen könnte über die bereits bekannten cAMP- und/oder MAPK-Signalkaskaden erfolgen, oder zusätzlich einen parallel agierenden Signalweg erfordern. In diesem Szenario könnte insbesondere die kürzlich beschriebene IME2-ähnliche MAP-Kinase Crk1 eine zentrale Rolle spielen (Garrido und Perez-Martin, 2003; Garrido *et al.*, 2004). Crk1 wird sowohl in axenischer Kultur als auch auf der Pflanze für eine ausreichende *prf1*-Expression benötigt. Diese Funktion übt Crk1 über das UAS-Element im *prf1*-Promotor aus (Hartmann *et al.*, 1996; Garrido *et al.*, 2004). Die drei über ihre Affinität zur UAS-Sequenz identifizierten potenziellen Transkriptionsfaktoren Ncp1-3 sind für die Aktivität des *prf1*-Promotors hingegen nicht essenziell (A. Hartmann, persönliche Mitteilung; Hartmann *et al.*, 1999). Demnach ist vorstellbar, dass Crk1 über die Regulation eines bisher unbekanntem Transkriptionsfaktors die *prf1*-Expression auf der Pflanzenoberfläche gewährleistet.

3.6 Modellvorstellung zur komplexen Regulation des *prf1*-Promotors

Aus den beschriebenen Experimenten ist deutlich geworden, dass Rop1 *in vitro* an spezifische Elemente im *prf1*-Promotor bindet und in axenischer Kultur, nicht jedoch auf der Pflanzenoberfläche für die *prf1*-Expression benötigt wird. Im Folgenden werden diese

Ergebnisse zusammen mit bestehenden Kenntnissen zur Regulation des *prf1*-Promotors über die bekannten Signalkaskaden zu einem Modell zusammengefaßt (Abb. 28).

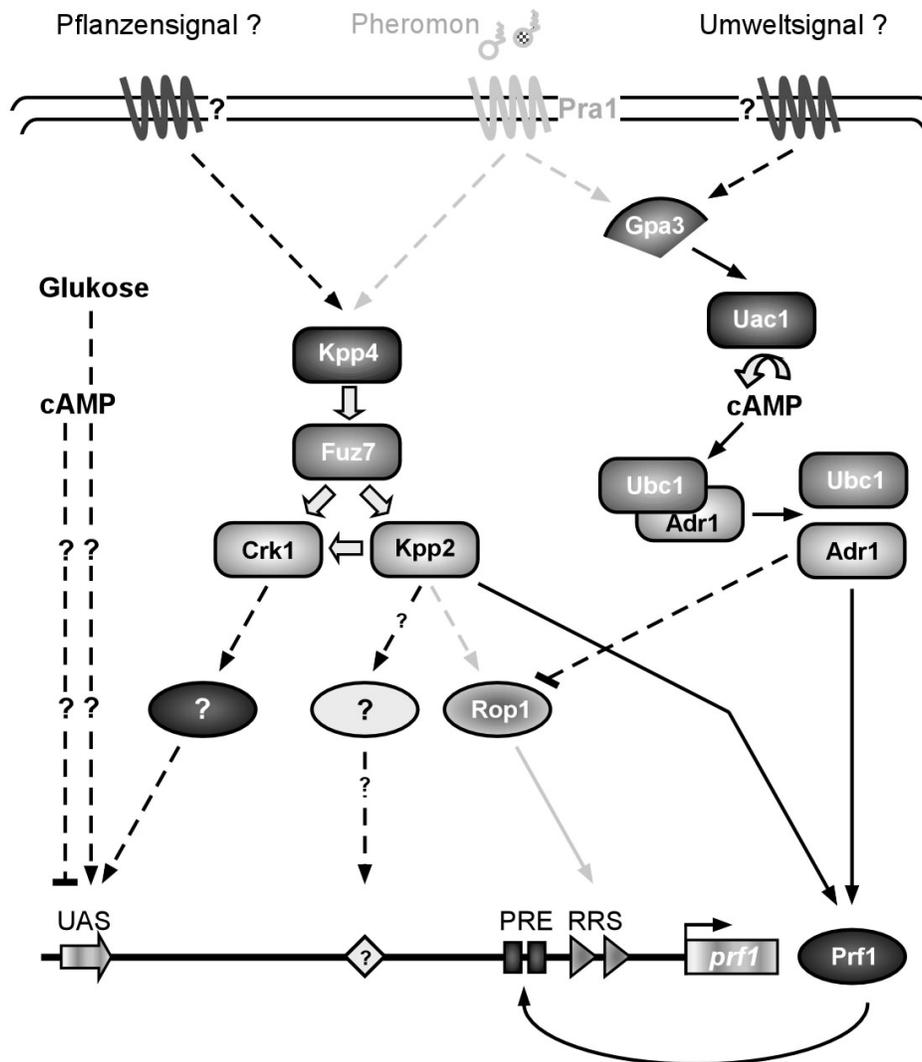


Abbildung 28: Modellvorstellung zur komplexen Regulation des *prf1*-Promotors durch cAMP- und MAPK-regulierte Transkriptionsfaktoren in *U. maydis*. Ein aktiver cAMP-Weg aktiviert das Prf1-Proteins und bewirkt darüber eine Autoinduktion der *prf1*-Expression. Das MAPK-Modul reguliert nicht nur die Aktivität des Prf1-Proteins, sondern induziert zusätzlich die *prf1*-Expression über die Regulation von Rop1 und möglicherweise weitere Transkriptionsfaktoren. Bekannte *prf1*-Promotorelemente sind durch graue Pfeile (UAS) und Rechtecke (PREs) gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit identifizierten Rop1-Erkennungssequenzen (RRS) sind als graue Dreiecke dargestellt. Die Möglichkeit weiterer Promotorelemente ist durch eine mit Fragezeichen versehene Raute dargestellt. Mögliche Interaktionen und Signaltransduktionswege sind durch gestrichelte Pfeile dargestellt. Aktivierende bzw. inhibierende Wechselwirkungen sind durch Pfeile bzw. blockierte Linien gekennzeichnet. Hellgraue Pfeile kennzeichnen Signalwege, die zwar in axenischer Kultur essenziell sind, auf der Pflanze jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Perzeption eines Pheromonsignals durch den Pheromonrezeptor Pra führt über die Aktivierung der beiden Signalkaskaden zur Phosphorylierung des Prf1 Proteins durch die MAPK Kpp2 und die Proteinkinase A, Adr1 (Kaffarnik *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 1999) (Abb. 28). Diese Aktivierungen fördern vermutlich die autoregulative Induktion der *prf1*-Expression über die Bindung von Prf1 an die PRE-Elemente im *prf1*-Promotor (diese Arbeit; Hartmann *et al.*, 1996, Kaffarnik *et al.*, 2003) (Abb. 28). Neben der posttranskriptionellen Aktivierung von Prf1 induziert die MAPK Kpp2 die Expression des *prf1*-Gens. Dazu ist unter axenischen Bedingungen der Transkriptionsfaktor Rop1 unentbehrlich (Abb. 28). Die Expression von *rop1* unterliegt wiederum der antagonistischen Regulation durch cAMP- und MAPK-Signalweg. Ein aktiver cAMP-Signalweg reprimiert die Expression, während sie durch ein aktives MAPK-Modul induziert wird (Abb. 28). Unterschiedliche über beide Signalwege weitergeleitete Signale könnten also über das *rop1*-Expressionsniveau zur adaptierten Expression von *prf1* integriert werden. Das möglicherweise zusätzlich über potenzielle MAPK-Phosphorylierungsstellen aktivierte Rop1-Protein bindet spezifisch an die RRS-Elemente im proximalen Teil des *prf1*-Promotors und ermöglicht so die Transkription (Abb. 28). Parallel führt die Aktivierung des MAPK-Moduls zur Phosphorylierung der kürzlich beschriebene MAPK Crk1, die bei der *prf1*-Expression eine essenzielle Rolle spielt (Garrido *et al.*, 2004). Crk1 wird über Phosphorylierungen sowohl von der MAPKK Fuz7 als auch von der MAPK Kpp2 aktiviert (Garrido *et al.*, 2004) (Abb. 28). Garrido *et al.* (2004) platzieren Crk1 und Kpp2 bei der Regulation von *prf1* parallel, da beide MAP-Kinasen von Fuz7 phosphoryliert werden und die Phosphorylierung von Crk1 durch Kpp2 für die Crk1-vermittelte Expression von *prf1* nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Crk1 kontrolliert die *prf1*-Expression über die palindromische UAS-Sequenz im distalen Teil des Promotors (Garrido *et al.*, 2004; Hartmann *et al.*, 1999) (Abb. 28). Demnach aktiviert Crk1 wahrscheinlich einen bisher nicht identifizierten, für die *prf1*-Expression essenziellen, UAS-bindenden Transkriptionsfaktor (Abb. 28). Da die MAPK Kpp2 an der transkriptionellen Regulation von *crk1* beteiligt ist (Garrido und Perez-Martin, 2003), könnte die ausbleibende *prf1*-Expression in $\Delta kpp2$ -Stämmen (diese Arbeit; Müller *et al.*, 1999) neben der unzureichenden *rop1*-Expression von einer unzureichenden *crk1*-Transkription mitverschuldet sein. Kpp2 könnte also die *prf1*-Expression nicht nur über Rop1 und die RRS-Boxen, sondern zusätzlich über die Menge an Crk1 auch über die UAS regulieren. Diese Hypothese könnte leicht durch die Deletion von *kpp2* im *3xUAS:sgfp*-Reporterstamm HA232 und die anschließende Quantifizierung der GFP-Expression überprüft werden.

Auf der Pflanzenoberfläche wird *rop1* für eine ausreichende *prf1*-Expression nicht benötigt. Dies deutet, wie im letzten Abschnitt beschrieben, auf die Existenz von aktivierenden

Pflanzensignalen hin, die über noch zu identifizierende Rezeptoren perzipiert werden könnten (Abb. 28). Die früheren Beobachtungen, dass der haploid-solopathogene Stamm CL13 (Bölker *et al.*, 1995a), der nicht zur autokrinen Pheromonstimulation in der Lage ist, auf der Pflanze b-abhängige Filamente bildet und die *b*-Genexpression MAPK-phosphoryliertes Prf1 erfordert (Müller *et al.*, 1999; Kaffarnik *et al.*, 2003) sprechen für eine Pheromon-unabhängige Aktivierung der MAPK-Kaskade auf der Pflanze (Abb. 28). Folglich könnte ein über das MAPK-Modul weitergeleitetes Pflanzensignal zur Aktivierung von Crk1 führen und über einen bisher unbekanntem Transkriptionsfaktor die *prf1*-Expression auch in Abwesenheit von *rop1* ermöglichen (Abb. 28). Außerdem könnte ein weiterer Kpp2-regulierter Transkriptionsfaktor existieren, der die Funktion von Rop1 auf der Pflanze übernimmt (Abb. 28). Die Expression und/oder Aktivität der postulierten Transkriptionsfaktoren sollte auf der Pflanzenoberfläche induziert sein, da sie unter axenischen Bedingungen den Verlust von *rop1* nicht kompensieren. Vorstellbar wäre außerdem ein Repressor, der auf der Pflanze inaktiviert wird. Der *prf1*-Promotor in *U. maydis* scheint also einer ähnlich komplexen Regulation zu unterliegen wie der von diversen Transkriptionsfaktoren über cAMP-Signalweg (Flo8p) und Kss1-MAPK-Kaskade (Ste12p/Tec1p) regulierte *FLO11*-Promotors in *S. cerevisiae* (Lo und Dranginis, 1996; Rupp *et al.*, 1999; van Dyk *et al.*, 2003).

3.7 Wie wird der morphologische Zweig der Pheromonantwort reguliert?

Während sich einer der beiden in dieser Arbeit identifizierten und charakterisierten Transkriptionsfaktoren, Rop1, als ein zentraler Regulator der transkriptionellen Pheromonantwort unter axenischen Bedingungen herausstellte, regulieren weder *rop1* noch *hmg3* direkt die Konjugationshyphenbildung und von dem dritten sequenzspezifischen HMG-Domänen-Protein Prf1 war bereits bekannt, dass es die morphologische Pheromonantwort nur indirekt beeinflusst (Müller *et al.*, 2003). Redundante Funktionen von *rop1* und *prf1* sowie von *rop1* und *hmg3* bei der Konjugationshyphenbildung konnten durch Analyse der entsprechenden Doppelmutanten im *fuz7DD*-Hintergrund ebenfalls ausgeschlossen werden. Dies läßt jedoch die Möglichkeit offen, dass der gesuchte Transkriptionsfaktor einer anderen Proteinfamilie angehört. Desweiteren muß die Konjugationshyphenbildung nicht notwendigerweise über einen Transkriptionsfaktor reguliert werden, sondern könnte z. B. wie in *S. cerevisiae* durch eine Koordination von Zellzyklusarrest und gerichtetem Wachstum erfolgen (Nern und Arkowitz, 1999; Cherkasova *et al.*, 1999). Zur Identifizierung von an der Konjugationshyphenbildung beteiligten Komponenten der morphologischen Pheromonantwort schien daher ein genetischer Ansatz über die UV-Mutagenese des konstruierten FB1UV-Ausgangstammes geeignet. Von 262 aus insgesamt etwa 280.000 Kolonien zur weiteren

Charakterisierung ausgewählter *fil*-Mutanten zeigten letztlich 13 den für Konjugationshyphen-spezifische Defekte erwarteten Phänotyp. Die eingehende Analyse ergab jedoch, dass diese 13 UV-Mutanten alle Mutationen im *kpp2*-Gen tragen.

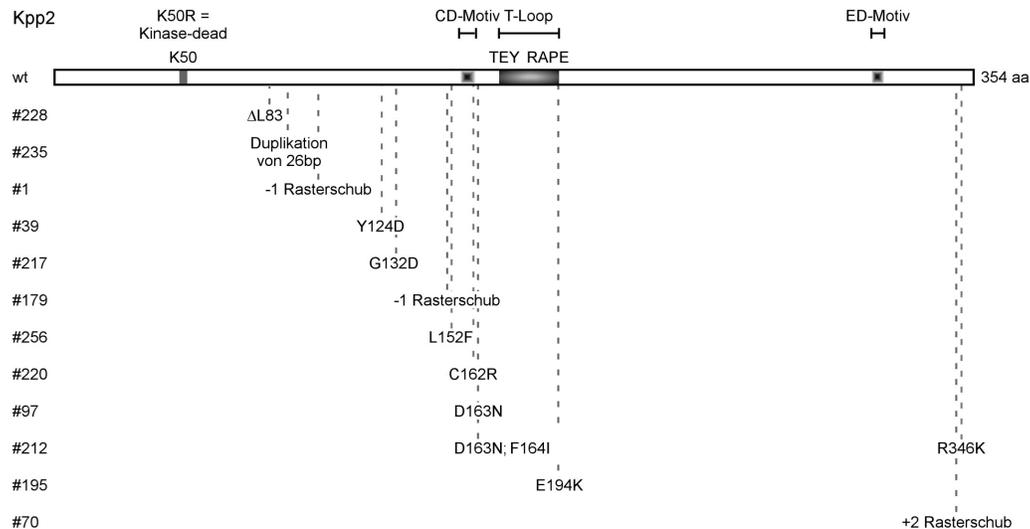


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Kpp2-Proteins und Positionen der identifizierten Mutationen. Konservierte Proteinmotive sind durch beschriftete Kästen markiert. K50R kennzeichnet eine Aminosäuresubstitution in der ATP-Bindestelle, die einen Verlust der Kinaseaktivität ('kinase-dead') zur Folge hat. Die CD- und ED-Motive sind vermutlich für die Interaktion mit der MAPKK Fuz7DD von Bedeutung. Der 'T-Loop' trägt die hochkonservierte Phosphatakzeptorstelle (TEY), die für die Aktivierbarkeit von Kpp2 essenziell ist. Benachbart liegt die an der Katalyse beteiligte RAPE-Domäne. Zusätzlich ist die Länge des Proteins angegeben. Positionen und Arten der in den Kpp2-Varianten identifizierten Mutationen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Aminosäuresubstitutionen sind im Einbuchstaben-Code angegeben.

Die *kpp2*-Mutationen erklären die im Vergleich zum Ausgangsstamm reduzierte bzw. ausbleibende Expression des *mfal:egfp*-Reporters nach Pheromonstimulation bzw. *fuz7DD*-Induktion. Stämme, in denen die für die Phosphorylierung durch die MAPKK Fuz7 essenziellen konservierten Threonin- (T182) und Tyrosinreste (Y184) des TEY-Motivs von Kpp2 durch Alanin (A) und Phenylalanin (F) substituiert sind (*kpp2^{AEF}*) oder in denen *kpp2* deletiert ist, zeigen ein ähnlich stark reduziertes *mfal*-Expressionsniveau nach Pheromonstimulation, und eine Fuz7DD-induzierte *mfal*-Expression ist in diesen Stämmen ebenfalls kaum nachweisbar (Müller *et al.*, 2003). Bei den mit Kpp2 verwandten MAP-Kinasen in Säugerzellen konnte neben dem 'T-Loop', auf dem sich das TEY-Phosphorylierungsmotiv befindet, ein weiterer Bereich identifiziert werden, der vor allem für die Interaktion der MAP-Kinasen mit den entsprechenden MAPK-Kinasen wichtig ist. Dabei

handelt es sich um die sogenannte 'docking groove' oder Bindetasche, die eine Diskriminierung zwischen ERK2 und p38 α erlaubt (Tanoue *et al.*, 2000 und 2001). Sie wird von sogenannten CD- und ED-Motiven begrenzt, deren Austausch zwischen ERK2 und p38 zu veränderten Spezifitäten führt (Tanoue *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit identifizierten, zum Funktionsverlust führenden Punktmutationen treten gehäuft im zentralen Teil des *kpp2*-ORFs auf, in dem der für die MAP-Kinasefunktion essenzielle und hochkonservierte 'T-Loop' mit den Phosphatakzeptorstellen des TEY-Motivs und der benachbarten katalytischen RAPE-Domäne liegt (Abb. 29). So kodiert das *kpp2*-Allel der UV-Mutante #195 für ein Protein, in dem der Aspartatrest (E) der RAPE-Domäne durch einen Lysinrest (K) ersetzt ist (Abb. 29). Die 'missense'-Mutationen in den UV-Mutanten #220, #97 und #212 führen hingegen zu Aminosäuresubstitutionen im konservierten CD-Motiv (Abb. 29). Überraschend erscheint jedoch, dass die durch eine Insertion von 2bp verursachte Rasterschubmutation 60bp vor dem Ende des *kpp2*-ORFs von Mutante #70 zu einem Verlust der Kpp2-Funktion führt. Durch die Mutation verlängert sich das Proteins nur um 13 Aminosäuren. Möglicherweise hat der veränderte C-Terminus jedoch Einfluß auf die Proteinstabilität. Insgesamt unterstreichen diese Resultate die von Müller *et al.* (1999 und 2003) bereits beschriebene zentrale Rolle der MAPK Kpp2 bei der Regulation der Konjugationshyphenbildung.

3.8 Warum führte der genetische 'Screen' auf Konjugationshyphen-spezifische Zielgene des MAPK-Moduls ausschließlich zur Identifizierung von *kpp2*-Mutanten?

Die Identifizierung von Mutanten, in denen das für die Konjugationshyphenbildung essenzielle *kpp2*-Gen (Müller *et al.*, 1999 und 2003) defekt ist, wurde bei der Verwendung des konstruierten Ausgangstammes erwartet. Dass ausschließlich *kpp2*-Mutanten zur näheren Charakterisierung ausgewählt wurden, deutet jedoch darauf hin, dass die Selektionskriterien zu stringent festgelegt wurden.

Als erstes Selektionskriterium für interessante UV-Mutanten diente der vollständige Verlust des filamentösen Wachstums auf CM-Arabinoseplatten. Dadurch sollte ein eindeutiger Phänotyp in Bezug auf die Konjugationshyphenbildung gewährleistet werden. Sollten jedoch zwei oder mehrere Komponenten bei der Regulation der Konjugationshyphen teilweise redundante Funktionen übernehmen, könnte eine einzelne zum Funktionsverlust führende Mutation möglicherweise nur zu einer Reduktion der Filamentbildung führen. Solche potenziell interessanten Mutanten wurden durch das Anlegen der stringenten Selektionsbedingungen gar nicht erst vereinzelt. Im Hinblick auf dieses mögliche Szenario erscheint die

Funktion der kürzlich beschriebenen IME2-ähnlichen MAPK Crk1 interessant, die bei der transkriptionellen Pheromonantwort parallel zu Kpp2 agiert (Garrido *et al.*, 2004). Die Überexpression von Crk1 führt zur Ausbildung von Filamenten, die Ähnlichkeit zu Konjugationshyphen aufweisen, und dieser Crk1-induzierte morphologische Wechsel erfordert intakte Phosphorylierungsstellen für die MAPKK Fuz7 und die MAPK Kpp2 im Crk1-Protein (Garrido *et al.*, 2004). Es wäre also denkbar, dass Crk1 bei der Regulation der morphologischen Pheromonantwort ebenfalls parallel zu Kpp2 agiert. Dass die Deletion von *crk1* nur zu einer Verzögerung der Fuz7DD-induzierten Konjugationshyphenbildung führt (U. Voß, persönliche Mitteilung), könnte bedeuten, dass Kpp2 im $\Delta crk1$ -Hintergrund die Funktion von Crk1 teilweise übernehmen kann. Bei den angelegten Selektionskriterien wären *crk1*-Mutanten folglich aufgrund von Restfilamenten verworfen worden.

Um Konjugationshyphen-spezifische Komponenten zu identifizieren, diente als zweites Ausschlußkriterium die Zellmorphologie: 52 UV-Mutanten mit aberranter Zellmorphologie im unstimulierten Zustand wurden von der weiteren Charakterisierung ausgeschlossen. Diese Klasse von UV-Mutanten zeichnet sich durch die Bildung von unterschiedlich strukturierten Zellaggregaten aus, deren Morphologie durch die Pheromonbehandlung nicht signifikant beeinflusst wurde. Das apikale Wachstum hängt vom intrazellulären Transport von Vesikeln und Zellwandkomponenten entlang des Zytoskeletts ab, an dem sowohl Mikrotubuli und die Mikrotubuli-basierten Motorproteine Kinesin und Dynein als auch F-Aktin beteiligt sind (Weber *et al.*, 2003; Steinberg, 2000; Heath, 1995). Demnach ist vorstellbar, dass die Umstrukturierung des Zytoskeletts während der Konjugationshyphenbildung ausschließlich über posttranskriptionelle Modifikationen erfolgt. In diesem Fall könnten Defekte in der Konjugationshyphenbildung möglicherweise mit pleiotropen Effekten auf die Zellmorphologie einhergehen. Ein Beispiel liefert das an der Bildung von Konjugationshyphen beteiligte Aktin-abhängige Motorprotein Myo5. *myo5*-Deletionsmutanten weisen Defekte in der Konjugationshyphenbildung auf und zeigen zusätzlich einen starken Zellseparationsdefekt, der zur Bildung großer septierter Zellaggregate führt (Weber *et al.*, 2003). Es ist allerdings bisher nicht klar, ob der Verlust der Konjugationshyphenbildung in *myo5*-Deletionsmutanten auf einer direkten Beteiligung von Myo5 an der Hyphenbildung oder auf einem Defekt in der Pheromonperzeption beruht, der vermutlich aus der Mislokalisierung des Pheromonrezeptors resultiert (Weber *et al.*, 2003; U. Fuchs, persönliche Mitteilung). In *S. cerevisiae* ist die morphologische Transition während der Konjugation zudem an einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase gekoppelt. Dabei wird Far1p sowohl für das gerichtete Wachstum auf die Pheromonquelle zu als auch für den pheromon-induzierten Zellzyklusarrest benötigt (Nern und Arkowitz, 1999; Cherkasova *et al.*, 1999). Eine ähnliche Kopplung könnte

auch in *U. maydis* vorliegen, da die Aktivierung des MAPK-Moduls neben der Konjugationshyphenbildung einen reversiblen Zellzyklusarrest induziert (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Müller, 2003). Im Unterschied zu der Situation in Bäckerhefe erfolgt der Arrest in *U. maydis* jedoch in der G₂-Phase des Zellzyklus (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Ein für das Wachstum nachteiliger oder sogar letaler Effekt von Mutationen in Konjugationshyphen-spezifischen Genen erscheint jedoch im Hinblick auf die Vitalität von *kpp2*-Mutanten unwahrscheinlich. Außerdem müßten Defekte in den gesuchten Komponenten eher mit der Aufhebung des Fuz7DD-induzierten Zellzyklusarrests einhergehen. Desweiteren sind in *U. maydis* zwar die Cyclin-abhängige Kinase *cdk1* und die B-Typ Cycline *clb1* und *clb2* essenzielle Gene, die an ihrer Regulation beteiligten Komponenten Crk1 oder Cru1 jedoch nicht (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Garrido und Perez-Martin, 2003; Castillo-Lluva *et al.*, 2004). Die Beobachtung, dass die Überexpression von Crk1 zur Ausbildung von Hyphen mit mehreren Zellkernen führt (Garrido *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2004), könnte zudem auf eine Verzweigung des Signalwegs zur morphologischen Differenzierung auf der einen und der Zellzykluskontrolle auf der anderen Seite hindeuten. Demzufolge könnte es Konjugationshyphen-spezifische Komponenten geben, die nicht am Zellzyklusarrest beteiligt sind.

Über die Bewertung der Pheromon-induzierten *mfa1:egfp*-Reporterexpression in Konjugationshyphen-defizienten Mutanten sollten *kpp2*-Mutanten von der weiteren Charakterisierung ausgeschlossen werden. Dieses Auswahlkriterium beruht auf der Annahme, dass die von Müller *et al.* (2003) postulierte Verzweigung der Pheromonantwort zur *prf1*-abhängigen Transkription der Paarungstypgene und zur *prf1*-unabhängigen Konjugationshyphenbildung unmittelbar unterhalb der MAPK Kpp2 erfolgt potenzielle Regulatoren der morphologischen Pheromonantwort also parallel zu *prf1* agieren und folglich die *prf1*- und somit die *mfa1*-Expression nicht beeinflussen sollten. Überraschend erscheint in diesem Zusammenhang, dass außer den 13 identifizierten *kpp2*-Mutanten (siehe Abschnitt 2.25) keine einzige der 50 Konjugationshyphen-defizienten Mutanten eine Pheromon-induzierte GFP-Expression aufwies. Die Defekte dieser Mutanten könnten ebenfalls auf Mutationen im *kpp2*-Gen zurückgehen. In diesem Fall würde es eine weitere Klasse von *kpp2*-Mutanten geben, für die der Pheromonstimulus in den Massendurchmusterungen nicht ausreichte, um die Expression des *mfa1:egfp*-Reporters zu induzieren. Sollten einige der Mutationen in diesen Stämmen jedoch nicht durch *kpp2* komplementierbar sein, könnte dies auf die Existenz eines zentralen Regulators hindeuten, der sowohl die Konjugationshyphenbildung als auch die Expression der Paarungstypgene reguliert. Diese Möglichkeit erscheint auch im Hinblick auf einen weiteren neben Rop1 zu postulierenden essenziellen Regulator der *prf1*-Expression auf der Pflanze vorstellbar (siehe Abschnitt 3.6, Abb. 28).

3.9 Ausblick

Mit der Charakterisierung von Rop1 als direktem Regulator der *prf1*-Expression in *U. maydis* konnte ein unterhalb der MAPK Kpp2 agierender Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der für die transkriptionelle Pheromonantwort in axenischer Kultur essenziell ist. An der morphologischen Pheromonantwort ist Rop1 über seine Funktion als Aktivator der *prf1*-Transkription hingegen nur indirekt beteiligt. Somit ist weiterhin unklar, wie die Konjugationshyphenbildung reguliert wird. Im Hinblick auf die mögliche Existenz eines zentralen Regulators, der sowohl den morphologischen Wechsel als auch die Expression der Paarungstypgene kontrolliert, sollten zunächst die Konjugationshyphen-defizienten UV-Mutanten mit Defekten in der Pheromon-induzierten *mfal*-Expression auf Mutationen im *kpp2*-Gen hin untersucht werden. Die Rolle der MAPK Crk1 bei Morphogenese und Zellzykluskontrolle sowie deren Assoziation mit dem Pheromon-MAPK-Modul lassen außerdem eine gezielte Analyse der Funktion von Crk1 bei der Konjugationshyphenbildung interessant erscheinen, insbesondere im Hinblick auf möglicherweise redundante Funktionen der beiden MAPK Crk1 und Kpp2.

Durch die Beobachtung, dass *rop1* auf der Pflanzenoberfläche nicht für eine ausreichende *prf1*-Expression benötigt wird, ist weiterhin deutlich geworden, dass auf der Pflanze bisher unbekannt Signale und möglicherweise Signaltransduktionswege an der Regulation von *prf1* beteiligt sein müssen.

Um Einblicke in die Natur der auf der Pflanzenoberfläche wahr genommenen Signale zu erhalten, könnte untersucht werden, ob es ähnlich wie in *M. grisea* oder *C. gloeosporioides* Kombinationen aus physikalischen und chemischen Reizen gibt, die die *prf1*-Expression in Abwesenheit von *rop1* induzieren. Die *rop1*-unabhängigen *prf1*-Expression auf der Pflanze macht außerdem wahrscheinlich, dass ein weiterer Transkriptionsfaktor existiert, der die *prf1*-Expression unter diesen Bedingungen entscheidend beeinflusst. In diesem Zusammenhang erscheint insbesondere eine Untersuchung der durch die MAPK Crk1 vermittelten Regulation des *prf1*-Promotors über die UAS von großem Interesse. Die Identifizierung eines Pflanzenspezifischen Regulators der *prf1*-Expression und der beteiligten Signaltransduktionswege würde dazu beitragen, die molekularen Kontrollmechanismen aufzuklären, die die sexuelle Entwicklung von *U. maydis* an die Pflanze koppeln, und würde somit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Interaktion zwischen *U. maydis* und seiner Wirtspflanze Mais leisten.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialien und Bezugsquellen

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën und Roth bezogen; Einzelheiten siehe (Brachmann, 2001).

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.*, 1987) und (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt, Einzelheiten dazu siehe (Brachmann, 2001). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml).

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet, die wenn nicht anders angegeben 5 min bei 121 °C autoklaviert wurden:

YEPS_L-Medium modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988):

10 g Yeast Extract
10 g Pepton
10 g Saccharose
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

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

1,5 g NH₄NO₃
2,5 g Casamino Acids
0,5 g DNA
1 g Yeast Extract
10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974):

3 g KNO₃
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)
40 ml 25 % (w/v) Maltose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)

AM Ammonium-Minimalmedium (Holliday, 1974):

3 g (NH₄)₂SO₄
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

16 g KH₂PO₄
4 g Na₂SO₄
8 g KCl
4 g MgSO₄ x 7 H₂O
1,32 g CaCl₂ x 2 H₂O
8 ml Spurenelement-Lösung (s. unten)
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

60 mg H₃BO₃
140 mg MnCl₂ x 4 H₂O
400 mg ZnCl₂
40 mg NaMoO₄ x 2 H₂O
100 mg FeCl₃ x 6 H₂O
40 mg CuSO₄ x 5 H₂O
Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

- 100 mg Thiamin
- 50 mg Riboflavin
- 50 mg Pyridoxin
- 200 mg Kalziumpantothenat
- 500 mg p-Aminobenzoessäure
- 200 mg Nikotinsäure
- 200 mg Cholinchlorid
- 1000 mg myo-Inositol
- Mit H₂O 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_L-Medium
- b) Bottom-Agar:
 - wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum.

CM-CC aktivkohlehaltiges Vollmedium

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

- 6 g NH₄NO₃
- 10 g Casamino Acids
- 1 g DNA
- 2 g Yeast Extract
- 20 ml Vitamin-Lösung
- 250 ml Salz-Lösung
- 10 g Aktivkohle
- 20 g Bacto-Agar
- mit H₂O auf 960 ml aufgefüllt
- mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
- nach dem Autoklavieren:
- 40 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 2 %)

PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium:

- 24 g Potato Dextrose Broth
- 10 g Aktivkohle
- 20 g Bacto-Agar
- mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

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

Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird.)

Enzyme

Restriktionsenzyme und T4-DNA Ligase wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen AMV Reverse Transkriptase (Invitrogen), *Taq*- (Laborpräparation), *TaqPlus® Precision*- und *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene).

Verwendete Kits und sonstiges Material

QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETsorb Kit zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, GeneRacer Kit (Invitrogen) zur Herstellung von 5'- und 3'-cDNA aus Gesamt-RNA, TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (NEB) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden und Microspin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.1.2 Oligonukleotide

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

Folgende Oligonukleotide liegen im *rop1*-Locus und wurden zur PCR und Sequenzierung verwendet:

ROPI-1

CCG TCA ATC GCC TAG AGC

ROPI-2

GGA TGG TAG TGG CGA TGC

ROP1-3

GCA AGC CAA AGC TGC AGC

ROP1-4

GCA CAC GGC TAG AAC ACG

ROP1-5

CCA CAG CTC TTG CGG ATG

ROP1-6

CTA CGG ATC GGA GTT GGG

ROP1-7

CTT CGT CGG ATC CTC TCG

ROP1-8

GAT GAT TGG ACA GCG CGC

ROP1-9

CTG GCT TGA CGG AGA AGC

ROP1-10

TCG TCG GCC ATT GCT TCG

ROP1-11

CCG GGA GAA GGT ACA TCG

ROP1-12

ACG CAT CCG AGA CTC GAG

ROP1-13

GGT CTC ACG CTG TCT AGC

ROP1-14

GAG ACT ACA GCG GGA AGG

ROP1-15

CAC TAG CCG AAA TGG CCG

ROP1-16

CTC GAA TCG CGA ATC GCG

ROP1-17

CTG ACC ATC TGA GCT CGG

ROP1-18

GCC CTC CTT CTC TTC AAC G

ROP1-19

CGC TAC TCG GAG CTG TTG

ROP1-20

TGC CAC CAA CTC CTA GCC

ROP1-21

GTT CCA CTC GTT AGG CGC

ROP1-22

CAT GCA CAA GGC CAA GCC

ROP1-23

CCA AAC CTC TGG CCA AGC

ROP1-24

GCG GAT CAC GTC ATG ATG G

ROP1-25

GAG AGC CTC GAC GAG TAC

ROP1-26

GCC ATG TCC AAG GGA AGG

ROP1-27

GCG AGT TGA GCT TCG AGC

ROP1-28

CAT GTC TTC CGC CTC TGC

ROP1-29

GTT GAA GCG AGG CAG AGG

Folgende Oligonukleotide dienten in Kombination mit OAN180-183 zur Amplifikation von *rop1* cDNA-Enden aus der λ gt10-Bank:

OTB9uni

ACC TCG GCC ACC TAA TGC

OTB10uni

CGC AAC TCA CAA TGC CGC

OTB11rev

TCG TCG GCC ATT GCT TCG

OTB12rev

GGC GAT ATC GGT AGG TGG

Folgende Oligonukleotide dienten zur Amplifikation der linken (L) und rechten (R) Flanke von *rop1* zur Konstruktion von K. O.-Konstrukten nach Kämper (2004):

OTB27L1

CAT TCC CTT TCG TCG TCC TTG ATC

OTB28L2SfiICAC GGC CTG AGT GGC CCT GAA GCA
GTC AAA TCA CGC CAG G**OTB15R1SfiI**GTG GGC CAT CTA GGC CGC ACT GAA
GTC TTG ACA CAG ATG C**OTB16R2**

GGT CAG TAC TTG ATA CTA AGC GCC

Mit diesen Oligonukleotiden wurde eine *rop1*-Sonde amplifiziert:

OTB57

GTT GCA AGT TCG CCA CGC

OTB58

GTG CAA GCA GCC AAA GGG

Diese Oligonukleotide wurden in Kombination mit dem GeneRacerKit (Invitrogen) zur Herstellung von stamm-spezifischer cDNA verwendet:

Rop1-5'-RACE

GGC TCG TAC TCC TCC GTC AAT GTG

Rop1-5'-RACE-nested

CGG AGC GGC ATC CGC AAA TGT GG

Diese Oligonukleotide führen die angegebenen Restriktionsschnittstellen ein. Sie wurden zur Klonierung des *rop1*-ORFs bzw. des HMG-Box kodierenden Abschnitts in pET15b verwendet:

Rop1-5'-SalIGTC GAC ATG GCG CAA CAG GGC TAT
GGC**Rop1-3'-BglII**

AGA TCT TCA GTG CCC AGA GGC GC

Rop1-HMG-5'-SalI

GTC GAC CTG TCC AAT CAT CCG ACC

Rop1-HMG-3'-BglII

AGA TCT GTG TTG CAA GTT CGC CAC G

Diese Oligonukleotide wurden zur Amplifikation eines synthetischen 3xRRS2-Fragments verwendet und führen die angegebenen Restriktionsschnittstellen ein:

RRSPacIuni

GCG CTT AAT TAA CAA TTG GC

RRSEcoRIrev

GCT GGA ATT CGT AGT TCG G

Folgende Oligonukleotide liegen im *hmg3*-Locus und wurden zur PCR und Sequenzierung verwendet:

HMG3uni1

GCG GCA TCA GAG CAT CG

HMG3rev2

GGA CTC AGA AGC ATC GGC

HMG3rev3

GAC CTC GGA TAT CGC CTG G

HMG3rev4

CGG AGG AGC AGA TAC TGG

HMG3uni3

CTG CCT AAG CCC AAG TGC

HMG3uni4

TGT GGA TGC CAC TGC TGC

HMG3uni5

CTC AGC CAG TAC AGC TAC C

HMG3uni6

GCC TCT ACT GTC CAA GCG

dienten zur Amplifikation der linken (L) und rechten (R) Flanke von *hmg3* zur Konstruktion von K. O.-Konstrukten nach Kämper (2004):

L152uni

CGA CTT GGA GAA GTG CGC G

L152SfilrevACA CGG CCT GAG TGG CCT AGC GAG
ATG GAG TTG GGG C**R152Sfiluni**TGT GGG CCA TCT AGG CCC GGC GCG
AAT CAA GTA CAG AGC**R152rev**

GCG ATG AGT TTG GCG AGA CGG

Folgende Oligonukleotide liegen im *kpp2*-Locus und wurden zur PCR und Sequenzierung von UV-Mutanten verwendet:

kpp2Locus uni

CAA AAG ACG CGT CGC TGC

kpp2Locus rev

GCG TAG CGG CGT AAC GAC

kpp2ORF uni

CGC AAG TGC TGC ATC GCG

kpp2ORF rev

CAT GAT TTC CGG TGC GCG

weitere Oligonukleotide:

Folgende Oligonukleotide wurden zur Herstellung einer *pcl2*-Sonde verwendet.

HE112

CCC TCG TCG TCA AGA TCC

HE113

CCT GCA CAA GCT CGT AGG

Folgende Oligonukleotide liegen im Rückgrat von λ gt10 und dienen der Amplifikation von cDNA-Enden aus der λ gt10 cDNA-Bank.

OAN180

GAG CTG CTC TAT AGA CTG C

Verwendet als linkes äußeres Oligonukleotid.

OAN181

AGA CTG CTG GGT AGT CCC

Verwendet als linkes inneres Oligonukleotid.

OAN182

GGG TAA ATA ACA GAG GTG GC

Verwendet als rechtes äußeres Oligonukleotid.

OAN183

TGG CTT ATG AGT ATT TCT TCC

Verwendet als rechtes inneres Oligonukleotid.

Folgende Oligonukleotide wurden zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus verwendet:

OAN74

GAG CAG TTC ATG ATG GTA AG

OAN75

TTC GAG CTG GTT GCC TGC

OAN76

CTA TGC GGC ATC AGA GCA G

OAN77

TTC GCT CTA CCG ATG CCT T

OAN78

TCT CCA AGC CAC GGT TCC

REV24

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)-SK, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR2.1-Topo.

UNI24

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)-SK, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR2.1-Topo.

T7-24

GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG

Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pSP72.

SP6-24

CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG
Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid;
liegt neben dem Polylinker von pSP72.

4.1.3 Stämme***E. coli*-Stämme**

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 α (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*,

hsdR, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ* Δ M15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR2.1/4-TOPO wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12-Derivat mit dem Genotyp: F', *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^R), *endA1*, *nupG*. Für die Überexpression der 6xHis-Fusionsproteine wurde der Stamm, Rosetta::DE3[pRARE] (Novagen) verwendet. Dieser Stamm ist ein Derivat des Stammes *E. coli* B, trägt das pRARE (cam^R) Plasmid und hat folgenden Genotyp: F', *ompT*, *hsdS* (r_B- m_B-), *dcm*⁺, Tet^r *gal*(DE3), *endA*, *Hte*.

Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Für alle Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

***U. maydis*-Stämme**

Die Stämme in Tabelle 6 dienten in dieser Arbeit als Ausgangs- und/oder Teststämme, die in Tabelle 7 aufgelisteten Stämme wurden in dieser Arbeit hergestellt. In allen Stämmen wurden einfach homologe Rekombinationsereignisse durch Southern-Analyse bestätigt.

Tabelle 6: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
CL13	<i>a1 bW2bE1</i>	-	Bölker <i>et al.</i> , 1995a
SG200	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i>	Phleo ^R	Bölker <i>et al.</i> , 1995b
FB1gpa3 _{QL}	<i>a1 b1 gpa3_{Q206L}</i>	-	Regenfelder <i>et al.</i> , 1997
FB1 Δ ubc1	<i>a1 b1 Δubc1</i>	Nat ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 1999
FB1 Δ uac1	<i>a1 b1 Δuac1</i>	Hyg ^R	Krüger <i>et al.</i> , 1999
FB1 Δ prf1	<i>a1 b1 Δprf1</i>	Nat ^R	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB2 Δ prf1	<i>a2 b2 Δprf1</i>	Nat ^R	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB1P _{crf} :fuz7DD	<i>a1 b1 ip^R[P_{crf}1:fuz7DD]ip^S</i>	Cbx ^R	Müller <i>et al.</i> , 2003
FB1 Δ kpp2-1P _{crf} :fuz7DD	<i>a1 b1 Δkpp2-1 ip^R[P_{crf}1:fuz7DD]ip^S</i>	Cbx ^R , Nat ^R	Müller <i>et al.</i> , 2003
FB1 Δ prf1P _{crf} :fuz7DD	<i>a1 b1 Δprf1 ip^R[P_{crf}1:fuz7DD]ip^S</i>	Cbx ^R , Nat ^R	Müller <i>et al.</i> , 2003
FB2pra2 ^{con}	<i>a2 b2 ip^R[P_{otef}:pra2]ip^S</i>	Cbx ^R	Müller <i>et al.</i> , 2003
FB2pra2 ^{con} Δ prf1	<i>a2 b2 Δprf1 ip^R[P_{otef}:pra2]ip^S</i>	Cbx ^R , Nat ^R	Müller <i>et al.</i> , 2003
HA232	<i>a2 b2 ip^R[B-UAS3prf1]ip^S</i>	Cbx ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 7: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
FB1 Δ rop1	<i>a1 b1 Δrop1</i>	Hyg ^R	FB1
FB2 Δ rop1	<i>a2 b2 Δrop1</i>	Hyg ^R	FB2
SG200 Δ rop1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δrop1</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200
HA232 Δ rop1	<i>a2 b2 Δrop1 ip^R[B-UAS3prf1]ip^S</i>	Cbx ^R , Hyg ^R	HA232

Fortsetzung von Tabelle 7:

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
FB1Δhmg3	<i>a1 b1 Δhmg3</i>	Nat ^R	FB1
FB2Δhmg3	<i>a2 b2 Δhmg3</i>	Nat ^R	FB2
SG200Δhmg3	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δhmg3</i>	Phleo ^R , Nat ^R	SG200
FB1Δrop1P _{crg} :fuz7DD	<i>a1 b1 Δrop1 ip^R[P_{crg1}:fuz7DD]ip^S</i>	Cbx ^R , Hyg ^R	FB1P _{crg} :fuz7DD
FB1Δrop1Δprf1P _{crg} :fuz7DD	<i>a1 b1 Δrop1 Δprf1 ip^R[P_{crg1}:fuz7DD]ip^S</i>	Cbx ^R , Nat ^R , Hyg ^R	FB1Δprf1P _{crg} :fuz7DD
FB1Δhmg3P _{crg} :fuz7DD	<i>a1 b1 Δhmg3 ip^R[P_{crg1}:fuz7DD]ip^S</i>	Cbx ^R , Nat ^R	FB1P _{crg} :fuz7DD
FB1Δhmg3Δrop1P _{crg} :fuz7DD	<i>a1 b1 Δhmg3 Δrop1 ip^R[P_{crg1}:fuz7DD]ip^S</i>	Cbx ^R , Hyg ^R , Nat ^R	FB1Δrop1P _{crg} :fuz7DD
FB2pra2 ^{con} Δrop1	<i>a2 b2 Δrop1 ip^R[P_{otef}:pra2]ip^S</i>	Cbx ^R , Hyg ^R	FB2pra2 ^{con}
FB2pra2 ^{con} Δprf1Δrop1	<i>a2 b2 Δrop1 Δprf1 ip^R[P_{otef}:pra2]ip^S</i>	Cbx ^R , Nat ^R , Hyg ^R	FB2pra2 ^{con} Δprf1
FB1prf1 ^{con} Δrop1	<i>a1 b1 prf1^{con} Δrop1</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	FB1Δrop1
FB2prf1 ^{con} Δrop1	<i>a2 b2 prf1^{con} Δrop1</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	FB2Δrop1
FB2Δrop1rop1 ^{con}	<i>a2 b2 Δrop1 ip^R[P_{otef}:rop1]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	FB2Δrop1
SG200Δrop1rop1 ^{con}	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δrop1 ip^R[P_{otef}:rop1]ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δrop1
FB1P _{prf1} :egfp	<i>a1 b1 ip^R[P_{prf1}:egfp]ip^S</i>	Cbx ^R	FB1
FB2P _{prf1} :egfp	<i>a2 b2 ip^R[P_{prf1}:egfp]ip^S</i>	Cbx ^R	FB2
FB1Δrop1P _{prf1} :egfp	<i>a1 b1 Δrop1 ip^R[P_{prf1}:egfp]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	FB1Δrop1
FB2Δrop1P _{prf1} :egfp	<i>a2 b2 Δrop1 ip^R[P_{prf1}:egfp]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	FB2Δrop1
FB1UV	<i>a1 b1 P_{mfa1}:[egfp-Nat^R-P_{crg1}:fuz7DD]mfa1</i>	Nat ^R	FB1

4.1.4 Ausgangsplasmide

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

Klonierungsvektoren

pSP72 (Promega), **pBS(+)**SKII (Stratagene), **pBS(+)**KSII (Stratagene), **pTZ18R** (Pharmacia), **pTZ19R** (Pharmacia), **pSL1180** (Pharmacia), **pNEB193** (NEB), **pCR2.1 -/4-TOPO** (Invitrogen).

Plasmide für die Proteinexpression in *E. coli*

pET15b (Novagen) ist ein T7-Expressionsvektor für *E. coli*, der die N-terminale Fusion eines hexa-Histidin Epitops [(His)₆] erlaubt.

pET-prf1tm (Hartmann, 1997)

Dieses pET15b-Derivat erlaubt die Expression des Prf1-Vollängenproteins in Fusion mit einem N-terminalen hexa-Histidin- und einem C-terminalen triple-myc-Epitop.

pAH298 (pET-Prf1₁₋₂₉₈) (Hartmann *et al.*, 1996)

Dieses pET15b-Derivat erlaubt die Expression der HMG-Domäne von Prf1 (Aminosäuren 1-298; Prf1₁₋₂₉₈) in Fusion mit einem N-terminalen hexa-Histidin Epitop.

Spezielle Vektoren für das Arbeiten in/mit *U. maydis*

pBS-hhn (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette als *Sfi*I-Fragment.

pMF1-h (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2,7 kb *Sfi*I-Fragment.

pMF1-n (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1,4 kb *Sfi*I-Fragment.

pMF4-1n (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält eine *egfp-Nat^R-P_{crg1}*-Kassette als 3,9 kb *SfiI*-Fragment.

pmfa1gHn (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pCR2.1-TOPO-Derivat dient der homologen Integration einer *egfp-Hyg^R-P_{nar1}*-Kassette in den *mfa1*-Locus von *U. maydis*. Es trägt die von 1,0 kb des *mfa1*-Promotors und 0,9 kb der *mfa1*-ORF-Region flankierte *SfiI-egfp-Hyg^R-P_{nar1}*-Kassette aus pMF4-2h (Brachmann *et al.*, 2004). Eine homologe Integration ermöglicht sowohl die *mfa1*-Promotor kontrollierte *egfp*-Expression als auch die regulierbare Expression des *mfa1*-Gens.

pUMa182 (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung)

Enthält sechs synthetische PRE-Boxen vor einem *dik6*-Basalpromotor, dem *egfp*-Reportergen und dem *nos*-Terminator. Die Carboxin-Resistenzkassette ermöglicht die homologe Integration des Reportergen-Konstruktes in den *ip*-Locus von *U. maydis*.

pCU4 (Loubradou *et al.*, 2001)

Enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

pRU11 (Brachmann, 2001)

Enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des 3,5 kb-*crg1*-Promotors und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

p123 (C. Aichinger, pers. Mitteilung)

Enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

p123kpp2

Diese p123-Derivat dient der homologen Integration von *P_{otef:kpp2}* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht somit die konstitutive Expression von *kpp2*.

p123crg1fuz7DD (Müller *et al.* 2003)

Diese Plasmid dient der homologen Integration von *P_{crg1:fuz7DD}* in den *ip*-Locus von *U. maydis*. Es trägt das *fuz7DD*-Allel und 0,2 kb des 3'-Bereichs von *fuz7* unter der Kontrolle des 3,5 kb *crg1*-

Promotors und erlaubt somit die regulierbare Expression von *fuz7DD*.

pRF-6.0B (Hartmann *et al.*, 1999)

Ein pSP72-Derivat, das ein genomisches 6,0 kb *BamHI*-Fragment enthält, welches den gesamten *prf1*-Locus umfasst.

pRF-7,8BH (Hartmann, 1997)

Ein pSP72-Derivat, das ein genomisches 7,8 kb *BamHI-HindIII*-Fragment enthält, welches den gesamten *prf1*-Locus umfaßt.

pRF^{con} (Hartmann *et al.*, 1999)

Enthält *prf1* unter der Kontrolle des *tefl*-Promotors und eine Carboxin-Resistenzkassette. Dieses Plasmid kann dazu verwendet werden, in *U. maydis* das endogene *prf1*-Allel durch *prf1^{con}* zu ersetzen.

pNEBUH (Weinzierl, 2001)

Dieses pNEB193-Derivat enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette und die UARS und ist somit ein frei-replizierendes Plasmid für *U. maydis*.

pRF1-1746 (P. Müller, unveröffentlicht)

Ein pNEBUH-Derivat, das das *egfp*-Gen unter der Kontrolle des *prf1*-Promotors (-1 bis -1746 bp) und des *nos*-Terminators trägt. Hygromycinresistenz vermittelt in *U. maydis* frei-replizierender Vektor.

Cosmidbank pUMcos^x (Bölker *et al.*, 1995a)

Cosmidbank des *U. maydis*-Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*).

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

cDNA-Bank des Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium. Erstellt mit dem cDNA-Bank-Kit von Amersham

Plasmide für die Herstellung von Hybridisierungssonden**pSL-Cbx(+), pSL-Cbx(-)** (Brachmann, 2001)

Enthalten die Carboxin-Resistenzkassette als 1,9 kb *NotI*-Fragment in unterschiedlichen Orientierungen.

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

Enthalten die Hygromycin-Resistenzkassette als 2,9 kb *NotI*-Fragment in unterschiedlicher Orientierung.

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

Enthalten die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1,5 kb *NotI*-Fragment in unterschiedlichen Orientierungen.

pfrb34 (Brachmann, 2001)

Enthält ein 1,1 kb *EcoRI/EcoRI*-Fragment des Amplicons *frb34*, das in pCR-Topo kloniert wurde.

pSP4,2EcoRV (Bölker *et al.*, 1992)

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

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

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

pbW2-NdeI-bE1 (Brachmann, 2001)

Enthält ein intronfreies 1,8 kb *NdeI/PvuII*-5'-Fragment von *bW2* und ein intronfreies 0,8 kb *NdeI/PvuII*-5'-Fragment von *bE1*.

4.1.5 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

rop1-Plasmide

pRop1-7.7S

Dieses pBS(+)-SKII-Derivat enthält einen 7,7 kb genomischen Subklon des *rop1*-Locus und diente zur Sequenzierung mit den Oligonukleotiden ROP1-1 bis ROP1-29. Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein den *rop1*-Locus und flankierende Sequenzen umfassendes 7,7 kb *SacII*-Fragment aus dem BAC-Klon Um216 (sortierte BAC-Bibliothek des *U. maydis* Genoms) in den *SacII* linearisierten Vektor pBS(+)-SKII kloniert.

pΔrop1-Hyg

Dieses pCR2.1-TOPO-Derivat dient der Erzeugung von *rop1*-Deletionsmutanten. Für die Konstruktion wurden zunächst zwei den *rop1*-ORF flankierende Bereiche mittels PCR amplifiziert. Mit genomischer DNA des Stammes FB1 als Matrize wurde die 5'-Flanke (1,1 kb) mit den Oligonukleotiden

OTB27L1 / OTB28L2*SfiI* und die 3'-Flanke (1,0 kb) mit den Oligonukleotiden OTB15R1*SfiI* / OTB16R2 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach der Restriktion der über OTB28L2*SfiI* bzw. OTB15R1*SfiI* eingeführten *SfiI*-Schnittstellen mit der ebenfalls *SfiI* geschnittenen 2,7 kb-Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF1h ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in pCR2.1-TOPO inseriert und diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des *rop1*-Deletionskonstruktes mit den Oligonukleotiden OTB27L1 und OTB16R2.

p123P_{otef:rop1}

Dieses p123-Derivat dient der homologen Integration von *P_{otef:rop1}* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht die konstitutive Expression von *rop1*. In p123P_{otef:rop1} wurde das 0,7 kb *NcoI/NotI*(aufgefüllt) *egfp*-Fragment durch ein 2,2 kb *NcoI/HindIII*(aufgefüllt)-Fragment aus pET15bRop1 ersetzt, das den *rop1*-ORF und den hexa-Histidin kodierenden 5'-Bereich umfaßt. Die geschnittene *NotI*-Sequenz in p123 und die *HindIII*-Schnittstelle des *rop1*-Fragments wurden vor der *NcoI*-Restriktion mit Klenow-Enzym aufgefüllt.

Plasmide für die Proteinexpression in *E. coli*

pET15bRop1

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines (His)₆-Rop1-Fusionsproteins in *E. coli*. Für die Konstruktion wurde pET15b *XhoI/BamHI* linearisiert und mit einem *Sall/BglII* geschnittenen 1,8 kb PCR-Produkt ligiert, das den *rop1*-ORF umfaßt. Das PCR-Produkt wurde mit den Oligonukleotiden Rop1-5'-*Sall* und Rop1-3'-*BglII* generiert. Die verwendeten Oligonukleotide führen eine *Sall*-Schnittstelle am Start- bzw. eine *BglII*-Schnittstelle am Stop-Codon des *rop1*-ORFs ein. Als Matrize diente genomische DNA des Stammes FB1.

pET15bHMGrop1

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression der HMG-Domäne von Rop1 (Aminosäuren 100-401; Rop1₁₀₀₋₄₀₁) als (His)₆-Fusionsproteins in *E. coli*. Zur Konstruktion wurde pET15b *XhoI/BamHI* linearisiert und mit einem *Sall/BglII* geschnittenen 0,9 kb PCR-Produkt ligiert, das den HMG-Box kodierenden Abschnitt von *rop1* umfaßt. Das PCR-

Produkt wurde mit den Oligonukleotiden Rop1-HMG-5'-SalI und Rop1-HMG-3'-BglII generiert. Die verwendeten Oligonukleotide führen eine SalI-Schnittstelle bzw. eine BglII-Schnittstelle ein. Als Matrize diente genomische DNA des Stammes FB1.

hmg3-Plasmid und Cosmid-Klon

pΔhmg3-nat

Dieses pCR2.1-TOPO-Derivat dient der Erzeugung von Stämmen in denen ein Großteil des *hmg3*-ORFs (1-1713 bp) deletiert ist. Für die Konstruktion wurden zunächst zwei Flanken aus dem *hmg3*-Locus mittels PCR amplifiziert. Mit genomischer DNA des Stammes FB1 als Matrize wurde die 5'-Flanke (1,0 kb) mit den Oligonukleotiden L152uni / L152SfiIrev und die 3'-Flanke von bp-Position 1713 bis 2663 (1,0 kb) mit den Oligonukleotiden R152SfiIuni / R152rev amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach der Restriktion der über L152SfiIrev bzw. R152SfiIuni eingeführten SfiI-Schnittstellen mit der ebenfalls SfiI geschnittenen 1,4 kb-Nourseothricin-Resistenzkassette aus pMF1h ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in pCR2.1-TOPO inseriert und diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des *hmg3*-Deletionskonstruktes mit den Oligonukleotiden L152uni und R152rev.

Cosmid 20C9 (pUMcos^{20C9})

Dieses Cosmid wurde über seine Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten 0,8 kb *hmg3*-Fragment isoliert. Es enthält den gesamten *hmg3*-Locus. Ein den *hmg3*-ORF umfassender 3,3 kb Abschnitt dieses Cosmids wurde mit den Oligonukleotiden HMG3uni1 bis HMG3uni6 sequenziert.

Plasmide für den UV-Mutagenese-Ansatz

pUVmut-Vorläufer

Zur Konstruktion dieses Plasmids wurde die 5,8 kb umfassende SfiI-Kassette (*egfp-Hyg^R-Pnar1*) in pmfa1::gHn durch die 3,9 kb-SfiI-Kassette aus pMF4-1n ersetzt. In dem so entstandene pmfa1::gHn-Derivat wird die *egfp-Nat^R-Pcrg1*-Kassette von 1,0 kb des *mfa1*-Promotors und 0,9 kb der *mfa1*-ORF-Region flankiert.

pUVmut

Dieses Plasmid dient der homologen Integration eines *egfp-Nat^R-Pcrg1:fuz7DD*-Konstruktes in den *mfa1*-Locus von *U. maydis*. Zur Herstellung von pUVmut wurde in die StuI-Schnittstelle des pUVmut-Vorläufers ein 1,6 kb NdeI(aufgefüllt)-Fragment aus p123crg1fuz7DD inseriert, welches den *fuz7DD*-ORF enthielt. pUVmut trägt folglich ein von 1,0 kb des *mfa1*-Promotors und 0,9 kb der *mfa1*-ORF-Region flankiertes *egfp-Nat^R-Pcrg1:fuz7DD*-Konstrukt. Eine homologe Integration ermöglicht sowohl die *mfa1*-Promotor kontrollierte *egfp*-Expression als auch die regulierbare Expression des *fuz7DD*-Allels.

pKpp2otef

Dieses pNEBUH-Derivat erlaubt die konstitutive *kpp2*-Expression von einem frei-replizierenden Vektor. Zur Konstruktion wurde in das *PmeI/SphI* linearisierte pNEBUH ein 2,4 kb *HpaI/SphI*-Fragments aus p123kpp2 inseriert, welches das an den konstitutiven *otef*-Promotor fusionierte *kpp2*-Gen und den *nos*-Terminator enthält.

Reportergenkonstrukte

pPprf1-1746:gfp

Dieses pCU4-Derivat dient der homologen Integration von *Pprf1-1746:egfp* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht die *in vivo* Analyse der *prf1*-Expression, da es das *egfp*-Reportergen unter der Kontrolle des *prf1*-Promotors trägt. In pPprf1-1746:gfp wurde das 1,9 kb *EcoRI/XbaI* *Potef:gfp*-Fragment durch ein 2,8 kb *EcoRI/XbaI*-Fragment aus pRF1-1746 ersetzt, das 1.746 bp des *prf1*-Promotors in Fusion mit dem *egfp*-Gen enthält. Das inserierte 2,8 kb-*EcoRI/XbaI*-Fragment setzt sich aus einem 2,0 kb-*EcoRI/BglII* und einem 0,8 kb-*BglII/XbaI*-Fragment zusammen.

pCR2.1-3xRRSrev

Dieses pCR2.1-TOPO-Derivat enthält ein synthetisches 0,12 kb Fragment, das drei RRS2-Elemente trägt. Dieses Fragment besitzt am 5'-Ende eine *PacI*- und eine *MfeI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle. Es wurde über eine PCR-Auffüll- und Amplifikationsreaktion mit den Oligonukleotiden RRSPacIuni und RRSEcoIrev aus einem einzelsträngigen

synthetischen 0,12 kb Polynukleotid hergestellt. In diesem Vektor liegt es in (-)-Orientierung vor.

p3xRRS-GFP-Cbx / p6xRRS-GFP-Cbx

Diese pUMa182-Derivate, tragen drei bzw. sechs synthetische RRS2-Elemente vor dem *dik6*-Basalpromotor und dem *egfp*-Reportergen und dienen der homologen Integration in den *ip*-Locus von *U. maydis*. Sie ermöglichen die *in vivo* Analyse der *in vitro* identifizierten Rop1-Bindestelle. p3xRRS-GFP-Cbx wurde konstruiert, indem in pUMa182 das sechs PRE-Boxen tragende 0,13 kb

PacI/BamHI-Fragment durch ein 0,15 kb *PacI/BamHI*-Fragment aus pCR2.1-3xRRSrev ersetzt wurde, welches drei RRS2-Elemente trägt. Zur Konstruktion von p6xRRS-GFP-Cbx wurde der *PacI/BamHI* geöffnete pUMa182-Vektor mit einem 0,11 kb *PacI/EcoRI*-Fragment und einem 0,14 kb *MfeI/BamHI*-Fragment ligiert. Beide Fragmente stammen aus pCR2.1-3xRRSrev und tragen jeweils drei RRS2-Elemente, so dass das Ligationsprodukt p6xRRS-GFP-Cbx sechs RRS2-Elemente in gleicher Orientierung vor dem *dik6*-Basalpromotor und dem *egfp*-Reportergen trägt.

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

Kultivierung von *E. coli*

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

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung Transformations-kompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 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 Antibiotika-resistenz 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 10⁶ Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
30 mM K-Acetat
10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15 % (v/v) Glycerin
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

RF2-Lösung

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15 % (v/v) Glycerin

mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

4.2.2 *Ustilago maydis*

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.

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 OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10⁷ Zellen/ml. In Einzelfällen wurde die Zellzahl/ml mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer exakt bestimmt

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 50 ml frischem YEPS-Flüssigkultur angesetzt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von 1-2 x 10⁷ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 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 20 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 20 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 ca. 5 µg maximal aber 10 µl linearisierter Plasmid-DNA oder PCR-Produkt und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit freireplizierenden Plasmiden werden 50 µl Protoplasten mit 1 µg zirkulärer Plasmid-DNA 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 8 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert. Die Stämme wurden im Allgemeinen insgesamt dreimal vereinzelt.

SCS

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
sterilfiltriert

STC

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
sterilfiltriert

STC/PEG

10 g PEG4000 in 15 ml STC

Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum

U. maydis-Stämme wurden von Platte in CM-Glucose Flüssigmedium inokuliert. Bei 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 5 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H₂O_{bid.} so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD₆₀₀ = 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurden gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von diesen Ansätzen wurden 3 µl auf eine PD-Charcoal-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 - 48 h bei 28°C unter Luftabschluss inkubiert.

Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu testenden Stämme wurden im CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium bei 28°C mit 200 Upm bis zu einer Dichte von $OD_{600} \approx 0,8$ geschüttelt. Jeweils 1 ml Kultur wurde in 15 ml PPN Zentrifugenröhrchen (Greiner) pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in 1 ml CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium, dem zuvor kompatibles Pheromon in DMSO in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml oder nur DMSO zugesetzt worden war, resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in den PPN-Röhrchen auf einem Roll-Inkubator (New Brunswick Scientific) bei ca. 20 Upm in nahezu waagrechter Position gedreht. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bildung von Konjugationshyphen mikroskopisch analysiert.

Pheromonstimulation in Mikrotiterplatten

Die zu testenden Stämme wurden im CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium bei 28°C mit 200 Upm bis zu einer Dichte von $OD_{600} \approx 0,8$ geschüttelt. Jeweils 1 ml Kultur wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15), und mit frischem CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium auf eine $OD_{600} = 1,0$ eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden je 100 µl in Fluorimeter-taugliche 96-well-Mikrotiterplatten (Greiner, µClear, schwarz) überführt. Zur Pheromonstimulation wurden weitere 100 µl CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium, dem zuvor kompatibles Pheromon (in DMSO) in einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml oder nur DMSO zugesetzt worden war, zugegeben. Die Pheromonendkonzentration betrug somit 3,75 µg/ml. Die Zellen in den Mikrotiterplatten wurden anschließend bei 28°C auf einem Thermomixer (Eppendorf, comfort) bei 600 Upm schüttelnd inkubiert. Nach 4,5 – 5 h Inkubation wurde die OD_{600} und die GFP-Fluoreszenz fluorimetrisch (TECAN-Saphire Fluorimeter) bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine mikroskopische Bewertung der Konjugationshyphenbildung.

Induktion des *crgI*-Promotors

Die Stämme wurden aus Vorkultur in CM-Flüssigmedium angeimpft, das Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um repräsentierende Bedingungen zu gewährleisten, und bis zu $OD_{600} \approx 0,6$ bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen $H_2O_{bid.}$ resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in CM-Flüssigmedium resuspendiert, das Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um den *crgI*-Promotor zu induzieren. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit geschüttelt.

UV-Mutagenese

Zur Identifizierung von unterhalb der MAPK Kpp2 agierenden Komponenten, die an der Konjugationshyphenbildung beteiligt sind, wurde eine UV-Mutagenese durchgeführt. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass alle Zellen nach der UV-Bestrahlung eine zu einem Funktionsverlust führende Mutation tragen, wurde die Energiedosis so gewählt, dass die Überlebensrate bei 2-7% lag. Zur Bestimmung einer entsprechenden UV-Dosis für den Ausgangsstamm FB1UV (*al b1 P_{mfaI}:[egfp-Nat^R-P_{crgI}:fuz7DD]mfaI*) wurden in einem Vorversuch die Überlebensraten bei UV-Dosen von 0 bis 75 mJ/cm² bestimmt. Bei einer UV-Dosis von 40 mJ/cm² lag die Überlebensrate des Ausgangsstammes bei 3%, so dass diese UV-Dosis für die Mutagenese verwendet wurde. Dazu wurde der Stamm FB1UV in CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium bis zu einer $OD_{600} \approx 0,6$ angezogen, die Zellen pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und in $H_2O_{bid.}$ gewaschen und resuspendiert. Daraufhin wurde die Gesamtzellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Jeweils 400 µl der Zellsuspension wurden in zwei unabhängigen Mutageneserunden auf insgesamt 60 rechteckige CM-1 %-Arabinose-Platten ausplattiert. Anschließend wurden die mit 1×10^5 Zellen inokulierten CM-Arabinose-Platten in einem UV-Stratalinker 1800 (Stratagene; Wellenlänge der UV-Lampen: 254 nm)

mit einer UV-Dosis von 40 mJ/cm² bestrahlt und für 5 Tage bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

Test auf Pathogenität

Der verwendete Pathogenitätstests ist eine Spritzinfektion, bei der 200 - 250 µl einer Pilzsuspension (in Wasser, OD₆₀₀ = 3) 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 OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet und in Wasser zu einer OD₆₀₀ = 3 aufgenommen. Bei Mischungen wurden die entsprechenden Suspensionen vorher 1:1 gemischt. Etwa 14 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Tumore lichtmikroskopisch auf Sporenbildung untersucht.

Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5 %-igen CuSO₄-Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit H₂O_{bid} gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf YEPS_L-Platten ausplattiert. 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.

Test auf filamentöses Wachstum und GFP-Fluoreszenz auf der Maispflanze

Zur Untersuchung des filamentösen Wachstums auf der Maispflanze, der Ausbildung von Infektionsstrukturen und der Expression des *P_{prf1}:egfp*-Reporters wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Nach 12, 24 und 48 h wurde dann ein Stück von der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, ausgeschnitten und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke zerteilt. Die Blattstücke wurden 1 min in eine FungiFluor™-Färbelösung (Sigma) gelegt. Die Präparate wurden

anschließend in einem Tropfen Wasser unter UV-Licht (DAPI bzw. GFP-Filter) im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) untersucht. Zur mikroskopischen Beobachtung von *U. maydis*-Zellen während des biotrophen Wachstums wurden 0,5 cm² große Quadrate aus Maisblättern 1, 2, 4 und 6 Tage nach der Infektion unweit der Infektionsstelle entnommen. Anschließend wurden mit einer Rasierklinge Querschnitte des entnommenen Blattstückes angefertigt und für die Analyse Stellen ausgewählt, die etwa 3 bis 6 Zellschichten dick waren.

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski- oder DIC-Optik und Fluoreszenz-Mikroskopie. 8 µl der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft, mit 8 µl einer 2 % wässrigem Lösung von Low-Melting-Agarose (37°C; Sigma) vermischt, und mit einem Deckgläschen bedeckt. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm; GFP 450-490 nm und 515-565 nm, WGA-TRITC 546 nm und 590 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen PHOTOSHOP 6.0 (Adobe) und CANVAS 7.0 (Deneba) abgespeichert.

Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 10 %-iger Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 % direkt zum Medium fixiert. Nach 30 min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert. Filamentöse Zellen erforderten zur Pelletierung längere Zentrifugation.

WGA-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden mit 5 µl einer WGA-TRITC Stammlösung (Sigma, 2 mg/ml) versetzt und 15 min auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in PBS aufgenommen und weiterverarbeitet.

DAPI-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in 200 µl H₂O_{bid.} aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf ein mit Polylysin beschichtetes Deckglas gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten für kurze Zeit in eine Petrischale mit PBS gelegt (Waschschritt). Das Deckglas wurde abgetropft, so dass ca. 10 µl am Deckglas verblieben. 10 µl einer DAPI-Lösung (Sigma D-9542, 1 mg/ml in PBS +50 % Glycerin) wurden in eine Petrischale mit 10 ml PBS gegeben, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt (10 min in PBS) wurde das Deckglas abgetropft und auf einen Objektträger gelegt. Das Präparat wurde mit VALAP versiegelt und im

Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

VALAP

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

Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz

Zellen wurden in den jeweils angegebenen Medien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert, in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in sterilem H₂O_{bid.} auf eine OD₆₀₀ = 1,0 eingestellt. 200 µl dieser Zellsuspensionen wurden in Fluorimeter-taugliche 96-well-Mikrotiterplatten (Greiner, µClear, schwarz) überführt und die GFP-Expression und OD₆₀₀ mittels Fluorimeter (TECAN Sapphire) bestimmt. Die GFP-Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 520 nm detektiert. In beiden Fällen lag die Bandweite bei 7,5 nm. Die gemessene GFP-Fluoreszenz wurde anschließend auf die OD₆₀₀ normalisiert, um vergleichbare relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) zu erhalten. Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Kulturen in dreifacher Wiederholung analysiert.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z.B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind in Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) ausführlich beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD_{260} zu OD_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 bzw. 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300 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 100 μl TE-Puffer mit 20 $\mu\text{g/ml}$ RNase A aufgenommen, bei 55°C resuspendiert bei -20°C aufbewahrt. 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 Na₂-EDTA
8 % (w/v) Saccharose
5 % (v/v) Triton X-100

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPSt_L-Flüssigmedium wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgossen 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 des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 μl TE mit 20 $\mu\text{g/ml}$ RNase A aufgenommen und bei 55°C resuspendiert.

Ustilago-Lysispuffer

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1 % (w/v) SDS

TE-Phenol/Chloroform

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

RNA-Isolierung aus *U. maydis* Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach Schmitt *et al.* (1990). Zellen von einer frischen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis $OD_{600} \approx 0,5$ bei 29°C und 200 Upm inkubiert.

15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600 µl AE-Puffer mit 1 % (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 µl) wurde danach mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 – 50 µl H₂O_{bid.} aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

AE-Puffer

50 mM Na-Acetat, pH 5,3
10 mM Na₂-EDTA

AE-Phenol/Chloroform

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

RNA-Isolierung nach der alkalischen Phenol-Methode

Diese Methode ist modifiziert nach Timberlake (1986). Sie dient zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die auf Festmedien gewachsen waren oder aus Pflanzentumormaterial. Dazu wurde das Pilzmateriale von drei Platten abgekratzt bzw. Pflanzentumorstücke mit Hilfe einer Rasierklinge kleingeschnitten, in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Das gefrorene Pulver wurde mit 5 ml RNA-Lysepuffer durchmischt und erneut mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Mischung wurde zu einem feinen Pulver gemörsert, in 10 ml TE-Phenol überführt, in

diesem bei RT aufgetaut und anschließend mit 0,5 ml Glasperlen für 4 min in 50 ml PPN-Röhrchen heftig geschüttelt. Dem Ansatz wurden 10 ml Chloroform zugesetzt, nach Zentrifugation (10.000 Upm, 15 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) und Phasentrennung die wässrige Phase in neue Gefäße überführt, dreimal mit dem gleichen Volumen TE-Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, die RNA anschließend durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Li-Acetat für 2 h bei 0°C gefällt und durch Zentrifugation (wie oben) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, nach Trocknung in 200-400 µl H₂O_{bid.} aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

RNA-Lysepuffer

Unter ständigem Rühren 40 ml Lösung 2 (12 % (w/v) Natrium-p-Aminosalicylsäure in H₂O_{bid.}, frisch ansetzen) langsam in 40 ml Lösung 3 (2 % (w/v) tri-iso-Propyl-naphthalensulfonat in H₂O_{bid.}, frisch ansetzen) tropfen lassen, dann 20 ml Lösung 1 (1 M Tris-Cl, pH 8,5; 1,25 M NaCl; 250 mM EGTA in H₂O_{bid.}) zugeben. Bei der Zugabe von Lösung 1 kann der Lysepuffer trüb oder flockig werden. Der pH wird mit NaOH auf 8,9 eingestellt. Ist der Lysepuffer trübe bzw. bildet sich ein Niederschlag, so muss er auf Eis so lange gerührt werden, bis er wieder klar wird. Vor Gebrauch kann der Lysepuffer filtriert werden; er ist auf Eis einen Tag haltbar.

4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA wird in dieser Methode durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht. Die RNA-Probe (normalerweise 15 µg) wurde dazu in 16 µl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50 % DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1 % MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das

Gel wurde nach 1 h 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 Na₂-EDTA

RNA-Auftragspuffer

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

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 2 h.

DENAT-Lösung

1,5 M NaCl
0,4 M NaOH

Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC 2 – 4 h. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet. Ein

Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methyleneblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

20x SSC

300 mM Na-Citrat, pH 7,0
3 M NaCl

Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die Hybond-N⁺-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 10⁶ cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

Hybridisierungspuffer

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
50 mM PIPES
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5 % (w/v) SDS

Waschpuffer

1x SSC
0,1 % (w/v) SDS

Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern-Analysen

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (New England Biolabs) unter Verwendung von [α - 32 P]-dCTP (3000 Ci/mmol) hergestellt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Bei über PCR-Amplifikation hergestellten DNA-Fragmenten diente DNA des *U. maydis* Stammes FB1 als Matrize. Folgende DNA-Fragmente wurden eingesetzt:

<i>mfal</i>	ein 0,7 kb <i>EcoRV</i> -Fragment aus pSP4,2 <i>EcoRV</i>
<i>pral</i>	ein 1,3 kb <i>EcoRI/EcoRV</i> -Fragment aus pSP4,2 <i>EcoRV</i>
<i>bW/be</i>	ein 2,6 kb <i>PvuII</i> -Fragment aus pbW2- <i>NdeI</i> -bE1
<i>prf1</i>	ein 1,5 kb <i>SalI/BglIII</i> -Fragment aus pRF-4.7H
<i>fuz7</i>	ein 1,4 kb <i>NdeI/SphI</i> -Fragment aus p123crg1:fuz7DD
<i>kpp2</i>	ein 1,4 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKpp2 ^{otef}
<i>egfp</i>	ein 0,7 kb <i>NcoI/NotI</i> -Fragment aus p123
<i>cbx</i>	ein 1,9 kb <i>NotI</i> -Fragment aus pSL-Cbx(+), pSL-Cbx(-)
<i>rop1</i>	ein 0,3 kb PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden OTB57 und OTB58
<i>hmg3</i>	ein 0,8 kb PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden HMG3uni und HMG3rev2
<i>pcl2</i>	ein 1,0 kb PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden HE112 und HE113

Zur Herstellung einer 18S-rRNA-spezifischen Sonde wurde ein Oligonukleotid mit der Sequenz:

AGG GGC CAA CAA AAT GTC AAC CCG T

durch Phosphorylierung des 5'-Endes radioaktiv markiert. Dabei wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 50 μ Ci [γ - 32 P]-ATP (6000 Ci/mmol) und 10 U T4-Polynukleotid Kinase (New England Biolabs) für 45 min bei 37°C in PNK-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH7,5; 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂; 2 mM DTT) inkubiert. Überschüssige Nukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin G-25 Säulchen entfernt.

4.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse

Sequenzierung von DNA

DNA wurde vor der automatischen Sequenzierung mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt und anschließend mit einem ABI377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert oder zur externen Sequenzierung an die Abteilung „ADIS“ des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln verschickt.

Die Sequenzreaktion mit ABI377 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 μ l Formamid mit 25 mM Na₂-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgekocht. Ein 1,5 μ l 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. Die Sequenz-Rohdaten wurden zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert. Rohdaten extern sequenzierter DNA wurden mit dem Programm SEQUENCHER (Gene Codes Corporation) auf einem Apple Macintosh ausgewertet.

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 Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

DNA-STRIDER 1.3 (Douglas, 1995; Marck, 1988) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen.

BLAST2 (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder

- DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.
- SMART** (Schultz *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 1998) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.
- PSORT2** (Nakai und Horton, 1999; Nakai und Kanehisa, 1992) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.
- SIGNALP** (Nielsen *et al.*, 1997a; Nielsen *et al.*, 1997b) zur Identifikation N-terminaler Signalpeptide.
- PESTFIND** (Rechsteiner und Rogers, 1996; Rogers *et al.*, 1986) zur Identifikation von PEST-Sequenzen in einem Protein
- ISREC**, **INTERPROSCAN** und **DART** zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Suche nach Motiven ähnlicher Proteine.
http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits_motifscan
<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rpszur>
- CLUSTALW** (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.
- SEQVU 1.0.1** (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments.

4.3.4 PCR-Techniken

Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach Innis *et al.* (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 μ M, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 μ M (d.h. je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 μ l mit Hot-Start durchgeführt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

94°C/4 min - 1U*Taq*-94°C/1 min - [94°C/1 min - 65°C/1 min - 72°C/1 min]x 30 - 72°C/5 min

Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate mussten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Es wurden die PCR-Geräte OmniGene (Hybaid), PTC100 (MJ Research) und Robocycler Gradient96 (Stratagene) verwendet.

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

Diese Technik ist ausführlich in Brachmann (2001) beschrieben und ermöglicht eine Vorauswahl richtiger Transformanten. In dieser Methode werden Zellen der Transformanten durch 10 min initialer Denaturierungszeit zum Platzen gebracht und so genomische DNA freigesetzt, die nun als Matritze für die PCR dient. Diese PCR-Analysen werden so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen homologen Rekombination kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Anschließend werden die Kandidaten durch Southern-Analyse bestätigt. Es wurden in dieser Arbeit folgende Kombinationen an Oligonukleotiden eingesetzt:

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

Techniken zur Bestimmung von mRNA-Enden

Für die Bestimmung von 5'- und 3'-Enden von mRNA-Molekülen wurden verschiedene Techniken angewendet. Am einfachsten war dabei die Amplifikation der Enden aus der λ gt10-cDNA-Bank. Die Orientierung der inserierten Fragmente ist in dieser Bank nicht festgelegt. Die Amplifikationen wurden in jeweils zwei Schritten durchgeführt, wobei die erhaltenen Fragmente aus der ersten Reaktion in einem zweiten Ansatz mit intern gelegenen Oligonukleotiden reamplifiziert wurden. In Fällen, in denen sich kein eindeutiges Bandenmuster zeigte, wurden die aufgetrennten Fragmente auf Nylonmembranen transferiert und mit einer Gen-spezifischen Sonden hybridisiert. Die Oligonukleotide für die Amplifikationen waren im Fall der λ gt10-Bank OAN180 und OAN181 bzw. OAN182 und OAN183. Im Fall von *rop1* wurden diese im λ gt10-Rückgrat liegenden Oligonukleotide

in Kombination mit den Gen-spezifischen Oligonukleotiden OTB9uni und OTB12rev bzw. OTB10uni und OTB11rev verwendet. Die *rop1*-spezifischen PCR-Produkte wurden isoliert und zur Sequenzierung in pCR2.1-TOPO kloniert.

Zusätzlich wurden die *rop1*-Transkripte aus FB1Pcrg:fuz7DD- und FB1Δkpp2Pcrg:fuz7DD-Stämmen vor und nach *crg1*-Induktion mittels 3'- bzw. 5'-RACE bestimmt (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde das GeneRACER Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Gesamt-RNA wurde zunächst über RNeasy-Säulen (QUIAGEN) aufgereinigt und DNaseI behandelt um DNA-Kontaminationen auszuschließen. Für die RACE-Experimente wurden dann jeweils 4 µg gereinigte RNA eingesetzt.

Im Fall der 5'-RACE wurden zunächst die 5'-CAPs der mRNA-Moleküle entfernt und das 5'-Oligonukleotid-1 (Kit) an das nun freie 5'-Phosphatende ligiert. Zur reversen Transkription wurde dann das Gen spezifisches Oligonukleotid Rop1-5'-RACE verwendet. Anschließend wurden die entstandenen 5'-cDNA-Moleküle über eine

PCR-Reaktion mit dem internen 5'-Oligonukleotid-2 (Kit) und Rop1-5'-RACE amplifiziert.

Im Fall der 3'-RACE wurde die mRNA mit dem 3'-Oligonukleotid-1 (Kit) revers transkribiert. Dieses Oligonukleotid weist an seinem 3'-Ende eine oligo(dT)-Sequenz und an seinem 5'-Ende eine spezifische Nukleotidfolge auf, so dass die generierten oligo(dT)-cDNA-Moleküle mit dem internen 3'-Oligonukleotid-2 (Kit) und dem *rop1*-spezifischen Oligonukleotid OTB27L amplifiziert werden konnten.

Die so erhaltene Stamm-spezifische 5'- bzw. 3'-cDNA wurde erneut als Matrize in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die 5'-cDNA wurde mit den beiden *rop1*-spezifischen Oligonukleotiden OTB27L und Rop1-5'-RACE reamplifiziert und die 3'-cDNA wurde in PCR-Reaktionen mit OTB27L und Rop1-14 verwendet. Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, isoliert und in pCR4-TOPO kloniert und sequenziert. Die Lage der Oligonukleotide im *rop1*-Locus sowie die Ergebnisse der Sequenzierungen sind schematisch in Abbildung 21 (Ergebnisse) zusammengefasst.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Dafür wurde eine Mini Protean II Apparatur (Biorad) benutzt bei 25 mA für 1 h aufgetrennt. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbe-Lösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

SDS-PAGE-Probenpuffer (6x)

- 300 mM Tris-Cl, pH 8,0
- 30 % (v/v) Glycerin
- 20 % (w/v) SDS
- 0,5 g/l Bromphenolblau
- 15 % (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)

Proteingel-Laufpuffer

- 25 mM Tris-Cl, pH 8,8
- 200 mM Glycin
- 0,1 % (w/v) SDS

Sammelgel

- 125 mM Tris-Cl, pH 6,8
- 5 % (w/v) Acrylamid
- 0,13 % (w/v) Bisacrylamid
- 0,1 % (w/v) SDS
- 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1 % (v/v) TEMED

Trenngel

- 375 mM Tris-Cl, pH 8,8
- 10 % bzw. 15 % (w/v) Acrylamid
- 0,27 % (w/v) Bisacrylamid
- 0,1 % (w/v) SDS
- 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1 % (v/v) TEMED

Coomassie-Färbelösung

- 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- 45 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbe-Lösung

- 45 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

4.4.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P von Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit H_2O_{bid} gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 1 mA/cm²) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

Anodenpuffer 1

- 300 mM Tris-Cl, pH 10,4
- 15 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer 2

- 30 mM Tris-Cl, pH 10,4
- 15 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer

- 25 mM Tris-Cl, pH 9,4
- 40 mM ϵ -Aminocaprinsäure
- 15 % (v/v) Methanol

4.4.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst für 1 h mit 5 % Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die

Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 - 12 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST 1 % Magermilchpulver, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 1 - 12 h mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 1 % Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Als primärer Antikörper wurde monoklonaler Maus- α -HIS (1 μ g/ μ l, in einer Verdünnung von 1:10.000, [Roche]) verwendet. Als sekundärer Antikörper diente der HRP-gekoppelte Ziege- α -Maus von Promega (in einer Verdünnung von 1:20.000). Zur Detektion wurden die frisch angesetzten Lösungen ECL I und ECL II zu gleichen Teilen gemischt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 5 min Exposition deutliche Banden zu erkennen.

TBST

20 mM Tris-Cl, pH 7,6
136 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween 20

ECL I

100 mM Tris-Cl, pH 8,0
0,44 % (v/v) p-Coumarinsäure in DMSO
1 % (v/v) Luminol (Fluka) in DMSO

ECL II

100 mM Tris-Cl, pH 8,0
0,018 % (v/v) H₂O₂

4.4.4 Überexpression und Reinigung von (His)₆-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Die Expression der (His)₆-Fusionsproteine erfolgte in dem *E. coli* Stamm Rosetta::DE3[pRARE], der mit den entsprechenden pET15b-Derivaten transformiert worden war. Diese *E. coli* Stämme wurden in 400 ml dYT Flüssigmedium (+ 1 % Glukose, 100 μ g/ml Ampicilin und 34 μ g/ml Chloramphenicol) bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0,5 bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellsuspensionen auf Eis gekühlt und die Expression mit 0,1 mM IPTG induziert. Die

Inkubation erfolgte dann für 16 h bei 20°C. Die Zellen wurden geerntet (3.500 Upm, 4°C, Sorval, Rotor GS3) und 1x in 25 ml Bindepuffer gewaschen und dann in 5 ml Bindepuffer+ (Bindepuffer plus (+) *Complete protease inhibitor cocktail* [Roche]) resuspendiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die Zellen wurden mit fünf Passagen durch eine Frenchpress-Zelle (Mini cell, 20.000 p.s.i.) aufgeschlossen und die chromosomale DNA anschließend durch Sonifikation geschert. Unlösliche Partikel wurden durch eine Zentrifugation (4°C, 60 min, 19.000 Upm, Sorval, SS34-Rotor) abgetrennt. Der klare Überstand wurde mit 1,5 ml Ni²⁺-NTA-Sephrose (QIAGEN) 2 h bei 4°C auf einem Rollinkubator inkubiert. Die Ni²⁺-NTA-Sephrose-Suspension wurde dann in eine QIAGEN-Säule überführt und nach der Sedimentation der Sepharose (Bettvolumen: 0,75 ml) durch Gravitationsfluß 8x mit je 12 ml Waschpuffer+ gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3x 1,5 ml Elutionspuffer+ bei 4°C. Die Eluate wurden dann mit PD10-Säulen (Amersham Bioscience, mit 25 ml Retentionspuffer+ äquilibriert) in fünf 1 ml Aliquots fraktioniert. Die proteinreichsten Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE bestimmt und auf Eis gelagert.

Bindepuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,9
500 mM NaCl
5 mM Imidazol

Waschpuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,9
500 mM NaCl
60 mM Imidazol

Elutionspuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,9
500 mM NaCl
1000 mM Imidazol

Retentionspuffer (1x)

25 mM HEPES pH 7,9
100 mM KCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
10 % Glycerin

4.4.5 Gelretardations-Analyse

Die Bindung eines Proteins an ein DNA-Fragment kann anhand des veränderten Laufverhaltens in einem Polyacrylamid-Gel nachgewiesen werden. Die dephosphorylierten Restriktionsfragmente bzw. doppelsträngigen Oligonukleotide wurden über eine T4-Polynukleotidkinasereaktion (New England Biolabs) mit [γ - 32 P]-ATP (6.000 Ci/mmol) an ihren 5'-Enden markiert, anschließend wurden nicht eingebaute Nukleotide über Microspin S-200 bzw. G-25-Säulchen abgetrennt.

Für die Reaktionsansätze wurden 4 μ l 2x Retentionspuffer+ mit 1 μ g BSA, 0,1 μ g poly (dIdC) und 2 μ l (His)₆-Rop1₁₀₀₋₄₀₁ bzw. -Prf1₁₋₂₉₈-Proteinlösung mit 2 μ l H₂O_{bid.} auf ein Volumen von insgesamt 8 μ l aufgefüllt und für 20 min bei 20°C vorinkubiert. Das Protein befand sich in 1xRetentionspuffer+ und es wurde etwa 100–200 ng Protein verwendet. Anschließend wurde pro Ansatz 1 μ l des radioaktiv markierten Restriktionsfragments bzw. des radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer spezifischen Aktivität von etwa 10.000 cpm/ μ l zugegeben und für weitere 30 min bei 20°C inkubiert.

In Kompetitionsexperimenten wurde nach 10 min Vorinkubation jeweils 1 μ l des unmarkierten Kompetitors zugesetzt. Nach weiteren 10 min wurde das markierte Oligonukleotid zugegeben und die Ansätze für weitere 30 min inkubiert. Die zur Kompetition verwendeten unmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden jeweils im 10-, 25-, 50- und 100-fachen molaren Überschuß zur radioaktiv markierten Sonde eingesetzt.

Retentionspuffer (2x):

- 50 mM HEPES, pH 7,9
- 200 mM KCl
- 2 mM Na₂-EDTA
- 20% (v/v) Glycerin
- 2 mM DTT
- 2x Complete (Roche)

Die folgenden *prf1*-Promotorfragmente aus dem Plasmid pRF-7,8BH wurden verwendet (Positionen: s. Abb. 19, Ergebnisse):

Fragment a	438 bp <i>SphI/XhoI</i>
Fragment a1	282 bp <i>SphI/NcoI</i>
Fragment a2	276 bp <i>NspI/XhoI</i>
Fragment b	413 bp <i>XhoI/NdeI</i>
Fragment c	366 bp <i>NdeI/NspI</i>
Fragment d	454 bp <i>NspI/XbaI</i>
Fragment d1	268 bp <i>NspI/BpmI</i>
Fragment d2	228 bp <i>SacII/XbaI</i>
Fragment e	427 bp <i>XbaI/SalI</i>

Zur Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide wurden die folgenden synthetischen, paarweise komplementären 33 nt Einzelstränge verwendet (die RRS bzw. PRE-Sequenzen sind unterstrichen):

RRS3uni

ATC ACC ATC ACC ATT GTC TTT TCA CCA GCG CGC

RRS3rev

AGC GCG CTG GTG AAA AGA CAA TGG_TGA TGG TGA

RRS2uni

TGC AAC CGA CTT ATT GTC CTT TCC CGA ACT CCA

RRS2rev

TTG GAG TTC GGG AAA GGA CAA TAA_GTC GGT TGC

RRS1uni

CTA ATG CGG TTC ATT GTT CTA TCC AAC TTG GCT

RRS1rev

GAG CCA AGT TGG ATA GAA CAA TGA_ACC GCA TTA

RRSm-uni

ATC ACC ATC ACC CGG TGA GGG GCA CCA GCG CGC

RRSm-uni

AGC GCG CTG GTG CCC CTC ACC GGG TGA TGG TGA

PREuni

CAA ATC TGT GAA TCC CTT TGT GCC AGT TGA CTG

PRErev

GCA GTC AAC TGG CAC AAA GGG ATT CAC AGA TTT

Die Reaktionen wurden über native 4,0 % Polyacrylamid-Gele in 0,5x TBE-Puffer für 1 - 3 h (je nach Größe der markierten Sonden) bei 8mA/Gel und maximal 80 V/Gel aufgetrennt, getrocknet und auf einen strahlungssensitiven Phosphorimager-Screen aufgelegt. Die Auswertung erfolgte nach Exposition für mindestens 8 h auf einem STORM840 Phosphorimager (Molecular Dynamics) mit der IMAGEQUANT Software (Molecular Dynamics).

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Ausubel, M.A., Ausubel, M.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., and Smith, J.A. (1987). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Balasubramanian, B., Lowry, C.V., and Zitomer, R.S. (1993). The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol Cell Biol* 13, 6071-6078.
- Banuett, F. (1998). Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 249-274.
- Banuett, F., and 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., and Herskowitz, I. (1994a). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* 8, 1367-1378.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1994b). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp. Mycology* 18, 247-266.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122, 2965-2976.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* 37, 149-170.
- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R. (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68, 441-450.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., and Kahmann, R. (1995a). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* 73, 320-325.
- Bölker, M., Bohnert, H.U., Braun, K.H., Gohl, J., and Kahmann, R. (1995b). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* 248, 547-552.
- Bottin, A., Kämper, J., and Kahmann, R. (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 253, 342-352.
- Brachmann, A. (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bE/bW-Heterodimer. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., and Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 42, 1047-1063.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P., and 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., König, J., Julius, C., and Feldbrügge, M. (2004). Reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**(2), 216-226.
- Castillo-Lluya, S., Garcia-Muse, T., and Perez-Martin, J. (2004). A member of the Fizzy-related family of APC activators is regulated by cAMP and is required at different stages of plant infection by *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **117**, 4143-4156.
- Chang, Y.C., Penoyer, L.A., and Kwon-Chung, K.J. (2001). The second STE12 homologue of *Cryptococcus neoformans* is MATa-specific and plays an important role in virulence. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 3258-3263.
- Chang, Y.C., Miller, G.F., and Kwon-Chung, K.J. (2003). Importance of a developmentally regulated pheromone receptor of *Cryptococcus neoformans* for virulence. *Infect Immun* **71**, 4953-4960.
- Chang, Y.C., Wickes, B.L., Miller, G.F., Penoyer, L.A., and Kwon-Chung, K.J. (2000). *Cryptococcus neoformans* STE12alpha regulates virulence but is not essential for mating. *J Exp Med* **191**, 871-882.
- Chang, Y.C., Wright, L.C., Tschärke, R.L., Sorrell, T.C., Wilson, C.F., and Kwon-Chung, K.J. (2004). Regulatory roles for the homeodomain and C2H2 zinc finger regions of *Cryptococcus neoformans* Ste12alphap. *Mol Microbiol* **53**, 1385-1396.
- Chen, J., Lane, S., and Liu, H. (2002). A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **46**, 1335-1344.
- Cherkasova, V., Lyons, D.M., and Elion, E.A. (1999). Fus3p and Kss1p control G1 arrest in *Saccharomyces cerevisiae* through a balance of distinct arrest and proliferative functions that operate in parallel with Far1p. *Genetics* **151**, 989-1004.
- Christensen, J.J. (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc. Monogr.* **2**.
- Clark-Lewis, I., Sanghera, J.S., and Pelech, S.L. (1991). Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* **266**, 15180-15184.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- Dolan, J.W., Kirkman, C., and Fields, S. (1989). The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5703-5707.
- Dooijes, D., van de Wetering, M., Knippels, L., and Clevers, H. (1993). The *Schizosaccharomyces pombe* mating-type gene *mat-Mc* encodes a sequence-specific DNA-binding high mobility group box protein. *J Biol Chem* **268**, 24813-24817.
- Douglas, S.E. (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol* **3**, 37-45.
- Dürrenberger, F., Wong, K., and Kronstad, J.W. (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5684-5689.
- Eddy, S.R. (1995). Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 114-120.
- Eichhorn, H. (2004). Pathogenitätsrelevante Signalkaskaden in *Ustilago maydis*: Identifikation von Zielgenen. Fakultät für Biologie, Philipps-Universität, Marburg.
- Elion, E.A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**, 573-581.
- Field, L.J., Bruenn, J.A., Chang, T.H., Pinhasi, O., and Koltin, Y. (1983). Two *Ustilago maydis* viral dsRNAs of different size code for the same product. *Nucleic Acid Res* **11**, 2765-2778.

- Froeliger, E.H., and Leong, S.A. (1991). The *a* mating-type alleles of *Ustilago maydis* are idiomorphs. *Gene* **100**, 113-122.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., and Perez-Martin, J. (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Euk. Cell* **2**, 494-500.
- Garrido, E., and 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., Castillo-Lluva, S., Kahmann, R., and Perez-Martin, J. (2004). The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein. *Genes Dev* **18**, 3117-3130.
- Gilbert, M.S. (1996). Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**, 335-346.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M., and Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K., and 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., and Kronstad, J.W. (1997). The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* **9**, 1585-1594.
- Grosschedl, R., Giese, K., and Pagel, J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* **10**, 94-100.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1264-1300.
- Hagen, D.C., McCaffrey, G., and Sprague, G.F., Jr. (1991). Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the FUS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 2952-2961.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. In Rickwood, D. and Hames, B.D. (eds.). DNA cloning, a practical approach, *IRL Press*, Vol.1, pp. 109-135.
- Hartmann, A. (1997). Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R., and Bolker, M. (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.
- Hartmann, H.A., Krüger, J., Lottspeich, F., and Kahmann, R. (1999). Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell* **11**, 1293-1306.
- Heath, I.B. (1995). The cytoskeleton. In the growing fungus. Gow, N.A.R. and Gadd, G.M. (eds.). Chapman and Hall, London. pp. 99-134.
- Heringa, J. (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**, 341-364.
- Hoch, H.C., Staples, R.C., Whitehead, B., Comeau, J., and Wolf, E.D. (1987). Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* **235**, 1659-1662.
- Hoffman, C.S., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holliday, R. (1961). Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **2**, 231-248.

- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R.C. King, (ed.). Plenum Press, pp. 575-595.
- Hull, C.M., and Johnson, A.D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**, 1271-1275.
- Hull, C.M., and Heitman, J. (2002). Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet* **36**, 557-615.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego, USA: Academic Press.
- Kaffarnik, F., Muller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R., and Feldbrügge, M. (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 5817-5826.
- Kahmann, R., Romeis, T., Bölker, M., and Kämper, J. (1995). Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 559-564.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., and Kämper, J. (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., and Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A., and Beach, D. (1988). Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J* **7**, 1537-1547.
- Khalaf, R.A., and Zitomer, R.S. (2001). The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **157**, 1503-1512.
- Kim, Y.K., Liu, Z.M., Li, D., and Kolattukudy, P.E. (2000). Two novel genes induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia. *J Bacteriol* **182**, 4688-4695.
- Kjaerulff, S., Dooijes, D., Clevers, H., and Nielsen, O. (1997). Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S. pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *EMBO J* **16**, 4021-4033.
- Kolattukudy, P.E., Rogers, L.M., Li, D., Hwang, C.S., and Flaishman, M.A. (1995). Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4080-4087.
- Kronstad, J.W., and Leong, S.A. (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev.* **4**, 1384-1395.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A., and Kahmann, R. (1998b). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**, 193-198.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., and Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-785.
- Leberer, E., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (1997). Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 59-66.
- Lee, Y.-H., and Dean, R.A. (1994). Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett* **115**, 71-76.
- Liu, H., Kohler, J., and Fink, G.R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* **266**, 1723-1726.
- Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1996). FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* **178**, 7144-7151.

- Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M., and Kahmann, R.** (2001). A homolog of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **40**, 719-730.
- Magee, B.B., and Magee, P.T.** (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science* **289**, 310-313.
- Magee, B.B., Legrand, M., Alarco, A.M., Raymond, M., and Magee, P.T.** (2002). Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **46**, 1345-1351.
- 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.
- Matter, N., Herrlich, P., and Konig, H.** (2002). Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* **420**, 691-695.
- Mayorga, M.E., and Gold, S.E.** (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol. Microbiol.* **34**, 485-497.
- Müller, P.** (2003). Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*: Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung. Fakultät für Biologie, Philipps-Universität, Marburg.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M., and Kahmann, R.** (1999). The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-1017.
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M., and Kahmann, R.** (2003). Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Euk Cell* **2**, 1187-1199.
- Murata, Y., Fujii, M., Zolan, M.E., and Kamada, T.** (1998). Molecular analysis of *pcc1*, a gene that leads to A-regulated sexual morphogenesis in *Coprinus cinereus*. *Genetics* **149**, 1753-1761.
- Nakai, K., and Kanehisa, M.** (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911.
- Nakai, K., and Horton, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- Nern, A., and Arkowitz, R.A.** (1999). A Cdc24p-Far1p-Gbetagamma protein complex required for yeast orientation during mating. *J Cell Biol* **144**, 1187-1202.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G.** (1997a). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**, 581-599.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G.** (1997b). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Park, G., Xue, C., Zheng, L., Lam, S., and 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.
- Podila, G.K., Rogers, L.M., and Kolattukudy, P.E.** (1993). Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol* **103**, 267-272.
- Puhalla, J.E.** (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-474.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-271.

- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M., and Kahmann, R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *EMBO J* **16**, 1934-1942.
- 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., and Friend, S.H. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**, 873-880.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R., and Kämper, J. (2000). Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **37**, 54-66.
- Rowell, J.B. (1955). Functional role of compatibility factors and an *in vitro* test for sexual incompatibility with haploid lines of *Ustilago zeae*. *Phytopathology* **45**, 370-374.
- Rowell, J.B., and DeVay, J.E. (1954). Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**, 356-362.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.J., Madhani, H., and Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J* **18**, 1257-1269.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Schauwecker, F., Wanner, G., and Kahmann, R. (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 617-625.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumppower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**, 3091-3092.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and 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., and 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., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R. (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Sipiczki, M. (1988). The role of sterility genes (*ste* and *aff*) in the initiation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **213**, 529-534.
- Snetselaar, K.M. (1993). Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Experimental Mycology* **17**, 345-355.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**, 347-355.

- Snetselaar, K.M., Bölker, M., and Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 299-312.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bottin, A., and Kahmann, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 503-509.
- Steinberg, G.** (2000). The cellular roles of molecular motors in fungi. *Trends Microbiol* **8**, 162-168.
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M.** (1991). *Schizosaccharomyces pombe* *stell1+* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* **5**, 1990-1999.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., and Nishida, E.** (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**, 110-116.
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., and Nishida, E.** (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J* **20**, 466-479.
- Thomas, J.O.** (2001). HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* **29**, 395-401.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994). Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. *Comput Appl Biosci* **10**, 19-29.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Timberlake, W.E.** (1986). Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. In Bailex, J. (ed.). *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, pp. 343-357. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. H1.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., and Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- Tucker, S.L., and Talbot, N.J.** (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 385-417.
- Urban, M., Kahmann, R., and Bölker, M.** (1996a). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 31-37.
- Urban, M., Kahmann, R., and Bölker, M.** (1996b). The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet* **250**, 414-420.
- van Dyk, D., Hansson, G., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F.** (2003). Cellular differentiation in response to nutrient availability: The repressor of meiosis, Rme1p, positively regulates invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**, 1045-1058.
- Wang, X., Bruderer, S., Rafi, Z., Xue, J., Milburn, P.J., Kramer, A., and Robinson, P.J.** (1999). Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly. *EMBO J* **18**, 4549-4559.
- Weber, I., Gruber, C., and Steinberg, G.** (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **15**, 2826-2842.
- Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P., and König, H.** (2001). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *EMBO J* **20**, 4194-4203.

- Weinzierl, G.** (2001). Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. Fakultät für Biologie, Philipps-Universität, Marburg.
- Wickes, B.L., Mayorga, M.E., Edman, U., and Edman, J.C.** (1996). Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7327-7331.
- Yamamoto, M.** (1996). The molecular control mechanisms of meiosis in fission yeast. *Trends Biochem Sci* **21**, 18-22.
- Yuan, Y.L., and Fields, S.** (1991). Properties of the DNA-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* STE12 protein. *Mol Cell Biol* **11**, 5910-5918.
- Yun, S.H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G.** (2000). Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet Biol* **31**, 7-20.
- Zitomer, R.S., and Hall, B.D.** (1976). Yeast cytochrome c messenger RNA. *In vitro* translation and specific immunoprecipitation of the CYC1 gene product. *J Biol Chem* **251**, 6320-6326.

6 ANHANG

Tabelle 8: Charakterisierung von 262 UV-Mutanten*

Platte 1 ^a		Kolonie-Morphologie ^b		Zell-Morphologie ^c		GFP-Fluoreszenz/RFU ^d		
Mutante	Gly	Glukose	Arabinose filamentös +/-	DMSO	Pheromon Konjugationshyphen +/-	DMSO	Pheromon	Induktion x-fach
FB1UV		wt	+	wt	+	5361	76851	14,3
#1	Kryo	wt	-	wt	-	2175	11032	5,1
#2	Kryo	wt	+	wt	+	5032	121753	24,2
#3	Kryo	klein		aberrant	aberrant	-	-	-
FB1UV		wt	+		+	3187	26633	8,4
#4	1C1	wt	-		+	4833	135807	28,1
#5	1D1	wt	-		-!	6071	6437	1,1
#6	1E1	braun	-		+	4268	29368	6,9
#8	1F1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	4006	4411	1,1
#9	1G1	wt	+		-	4625	6260	1,4
#11	1H1	wt	+		(-)	3831	5665	1,5
#13	1A3	wt	+		+	5444	43324	8,0
#15	1B3	wt	- ?		-	4702	4183	0,9
#16	1C3	wt	+		-	4375	5039	1,2
#18	1D3	wt	-		(-)	4063	5369	1,3
#19	1E3	wt	-		(-)	4575	6093	1,3
#20	1F3	wt	+		(-)	4245	9267	2,2
#21	1G3	wt	-		-	5443	5422	1,0
#22	1H3	wt	+		+	3976	5967	1,5
#23	1A5	wt	- ?	aberrant	(-) aberrant	3592	3399	0,9
#24	1B5	wt	-		-	3795	4271	1,1
#26	1C5	wt	-		+	4580	86563	18,9
#27	1D5	wt	-		+	4463	11343	2,5
#28	1E5	wt	-		+	4315	5185	1,2
#29	1F5	wt	+		+	4339	4407	1,0
#30	1G5	wt	+		+	4609	8981	1,9
#31	1H5	wt	-		+ (gegabelt)	3988	4481	1,1
#33	1A7	wt	-		+	4287	8282	1,9
#34	1B7	wt	-		+	4515	70835	15,7
#35	1C7	wt	-		(+) (reduziert)	4431	6943	1,6
#37	1D7	wt	+		+ (gegabelt)	3668	4473	1,2
#39	1E7	wt	-		-	4126	27447	6,7
#40	1F7	wt	+		+	4100	3956	1,0
#41	1G7	wt	-		+	4619	9721	2,1
#42	1H7	wt	- ?	klein, rund	-	6025	4885	0,8
#43	1A9	wt	+		+ sehr kurz!	3597	4298	1,2
#44	1B9	wt	-		+	3961	39540	10,0
#45	1C9	wt	-		+	6329	#WERT!	33,0
#46	1D9	wt	+		+	4487	5093	1,1
#47	1E9	wt	-		-	8268	8178	1,0
#48	1F9	wt	-		-	4790	4775	1,0
#49	1G9	wt	-		-	3847	4351	1,1
#50	1H9	wt	-		+	5577	125483	22,5
#51	1A11	wt	+		(+) (reduziert?)	3664	3743	1,0
#52	1B11	wt	-	klein, rund	-	3711	3741	1,0
#53	1C11	wt	-		-	2946	3292	1,1

Fortsetzung von Tabelle 8: Charakterisierung von 262 UV-Mutanten*

Platte 2 ^a		Kolonie-Morphologie ^b		Zell-Morphologie ^c		GFP-Fluoreszenz/RFU ^d		
Mutante	Gly	Glukose	Arabinose filamentös +/-	DMSO	Pheromon Konjugationshyphen +/-	DMSO	Pheromon	Induktion x-fach
FB1UV		wt	+		+	5235	21273	4,1
#14	2C1	wt	-		+	4011	4574	1,1
#25	2D1	braun	-	klein, rund	-	3192	4243	1,3
#32	2E1	wt	+		(+) (reduziert?)	5635	9456	1,7
#36	2F1	wt	-		+	7088	19271	2,7
#54	2G1	wt	-		+	6816	16126	2,4
#55	2H1	wt	-		(-)	8188	9207	1,1
#56	2A3	wt	-		+	5242	12019	2,3
#57	2B3	wt	-		+	6343	33025	5,2
#58	2C3	wt	-		-	5069	5420	1,1
#59	2D3	wt	+		+	6593	11354	1,7
#60	2E3	wt	-	kleiner	-	7407	15251	2,1
#61	2F3	wt	-		+	7069	11249	1,6
#62	2G3	wt	-		+	8159	28567	3,5
#63	2H3	wt	-		++	7836	6158	0,8
#64	2A5	wt	-		+	5819	8813	1,5
#65	2B5	wt	-	kleiner	-	5641	6686	1,2
#66	2C5	wt	+		(-)	6655	9013	1,4
#67	2D5	wt	+		-	6890	6844	1,0
#69	2E5	wt	-		-	6834	6685	1,0
#70	2F5	wt	-		-	7294	13752	1,9
#71	2G5	wt	-	aberrant	(-) aberrant	8197	8514	1,0
#72	2H5	wt	-	aberrant	(-) aberrant	7194	6665	0,9
#73	2A7	wt	-		(+) verzögert	6048	8224	1,4
#75	2B7	wt	-		-	7163	7175	1,0
#76	2C7	wt	-		+	6539	17209	2,6
#77	2D7	wt	-		+	7197	14264	2,0
#78	2E7	wt	-		-	7102	6868	1,0
#79	2F7	wt	-		+	9738	40648	4,2
#80	2G7	wt	-		-	6753	6682	1,0
#81	2H7	wt	-	aberrant	(-) aberrant	8361	7803	0,9
#82	2A9	wt	-	aberrant	(-) aberrant	6543	8114	1,2
#83	2B9	wt	-		+	6485	8694	1,3
#84	2C9	wt	-	aberrant	(-) aberrant	6134	7582	1,2
#85	2D9	wt	-		+	6906	37821	5,5
#86	2E9	wt	-		+	7247	15423	2,1
#87	2F9	wt	-		+	5019	13323	2,7
#88	2G9	wt	-		-	7595	6881	0,9
#89	2H9	wt	+		-	6363	8669	1,4
#90	2A11	wt	-	aberrant	(-) aberrant	7983	7710	1,0
#91	2B11	wt	-		+	7431	22776	3,1
#92	2C11	wt	+	aberrant	(-) aberrant	6294	7715	1,2
#93	2D11	wt	-		+ verzögert	6725	11863	1,8
#95	2E11	wt	-		-	8082	6419	0,8
#96	2F11	wt	-		(-)	6955	4828	0,7
#97	2G11	wt	-		-	6294	15691	2,5
#99	2H11	wt	-		+	7665	75884	9,9

Fortsetzung von Tabelle 8: Charakterisierung von 262 UV-Mutanten*

Platte 3 ^a		Kolonie-Morphologie ^b		Zell-Morphologie ^c		GFP-Fluoreszenz/RFU ^d		
Mutante	Gly	Glukose	Arabinose filamentös +/-	DMSO	Pheromon Konjugationshyphen +/-	DMSO	Pheromon	Induktion x-fach
FB1UV		wt	+		+	1551	18951	12,2
#10	3C1	wt	+	aberrant	- (aberrant)	2789	574	0,2
#17	3D1	wt	-		-	2536	2089	0,8
#38	3E1	wt	- ?	aberrant	- (aberrant)	1995	116	0,1
#68	3F1	wt	- ?		-	2119	-359	-
#74	3G1	wt	-		+	3128	11246	3,6
#94	3H1	weiß	+	aberrant	- (aberrant)	2739	2046	0,7
#100	3A3	wt	-		-	997	1631	1,6
#104	3B3	wt	-		(-)	1147	1014	0,9
#106	3C3	wt	-		+	1585	8495	5,4
#108	3D3	wt	-		+	2545	41362	16,3
#109	3E3	wt	-		+	3200	43704	13,7
#110	3F3	wt	-		(-)	1568	1759	1,1
#111	3G3	wt	-	klein, rund	-	1921	-51	-
#113	3H3	grau	-		+	2704	21662	8,0
#114	3A5	wt	-		+	1867	11520	6,2
leer	3B5							
#115	3C5	wt	-		+	1152	1987	1,7
#116	3D5	wt	-		+ verzögert	1583	2547	1,6
#117	3E5	wt	-	aberrant	(-) aberrant	1745	1001	0,6
#118	3F5	wt	-		+	2174	19299	8,9
#119	3G5	wt	-		+	1901	3889	2,0
#120	3H5	wt	-		+	1229	4594	3,7
#122	3A7	wt	-		+	1098	781	0,7
#123	3B7	wt	-		+	1520	12196	8,0
#125	3C7	wt	+		+ verzögert	1434	3529	2,5
#126	3D7	wt	+		-	1911	154	0,1
#127	3E7	wt	-		(+)?	1601	544	0,3
#128	3F7	wt	+		+	1717	3436	2,0
#129	3G7	wt	+		(+)	1810	1289	0,7
#130	3H7	wt	+		+	1506	989	0,7
#131	3A9	wt	+		+	1179	2830	2,4
#132	3B9	wt	-		+	1555	7344	4,7
#133	3C9	wt	-		-	1395	1841	1,3
#134	3D9	wt	+		+	1427	205	0,1
#136	3E9	wt	+		+	1634	1278	0,8
#137	3F9	wt	+		+	1639	2584	1,6
#138	3G9	wt	-		-	1404	446	0,3
#140	3H9	wt	-		(+) (reduziert?)	1554	1024	0,7
#142	3A11	wt	-		(-) (Krüppelhyphen?)	1239	1790	1,4
#143	3B11	wt	+		+	1165	2545	2,2
#144	3C11	wt	+		+	1295	2215	1,7
#146	3D11	wt	-		+	1625	1860	1,1
#147	3E11	grau	-		+ verzögert	1356	664	0,5
#148	3F11	wt	-	klein, rund	-	2143	-978	-
#149	3G11	wt	- ?	klein, rund	(-)	2182	2179	1,0

Fortsetzung von Tabelle 8: Charakterisierung von 262 UV-Mutanten*

Platte 4 ^a		Kolonie-Morphologie ^b		Zell-Morphologie ^c		GFP-Fluoreszenz/RFU ^d		
Mutante	Gly	Glukose	Arabinose filamentös +/-	DMSO	Pheromon Konjugationshyphen +/-	DMSO	Pheromon	Induktion x-fach
FB1UV		wt	+		+	3884	19054	4,9
#101	4C1	wt	-	klein, rund	(-)	3166	2040	0,6
#102	4D1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	6295	3990	0,6
#103	4E1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	8535	4505	0,5
#105	4F1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	7953	5670	0,7
#107	4G1	fil+	fil+	aberrant	(-) aberrant	7376	6076	0,8
#121	4H1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	8361	3176	0,4
#124	4A3	wt	-	aberrant	(-) aberrant	8548	3758	0,4
#135	4B3	wt	-		+	6900	29718	4,3
#139	4C3	wt	-	aberrant	(-) aberrant	9808	5713	0,6
#141	4D3	wt	-	aberrant	(-) aberrant	7209	3691	0,5
#151	4E3	wt	-		(+) (reduziert?)	6205	4323	0,7
#152	4F3	wt	-		(-)	8432	2162	0,3
#153	4G3	wt	-		+	6219	15059	2,4
#154	4H3	wt	+ ?	klein, rund	-	7165	5654	0,8
#155	4A5	wt	+		(-) (Stummelhyphen?)	5793	7814	1,3
#156	4B5	wt	+		+	5361	7320	1,4
#157	4C5	grau	+		(+) (reduziert?)	4898	3840	0,8
#160	4D5	wt	-		+	6876	45990	6,7
#161	4E5	wt	+		+	6184	10291	1,7
#162	4F5	grau	+	aberrant	(-) aberrant	6015	2949	0,5
#163	4G5	wt	-	aberrant	(+) aberrant	11390	4420	0,4
#164	4H5	wt	-		-	6308	3776	0,6
#165	4A7	wt	+		+	5653	14230	2,5
#166	4B7	wt	-		-	5969	5933	1,0
#168	4C7	wt	+		(+) (reduziert?)	5340	4881	0,9
#169	4D7	wt	+		(+) (reduziert?)	5770	5110	0,9
#171	4E7	wt	-		+	6519	14494	2,2
#172	4F7	wt	-		-	6371	3628	0,6
#173	4G7	wt	-	aberrant	(-) aberrant	8192	4161	0,5
#174	4H7	wt	+		(+) (reduziert?)	5807	6469	1,1
#175	4A9	wt	-		(-)	5666	7595	1,3
#176	4B9	wt	-		+	6855	10500	1,5
#177	4C9	wt	-		+	5692	5067	0,9
#178	4D9	wt	+		+	7119	21298	3,0
#180	4E9	wt	-		-	6762	4139	0,6
#181	4F9	wt	+	kleiner	-	6055	4365	0,7
#182	4G9	wt	-		-	6587	9161	1,4
#183	4H9	wt	-		+	5273	9195	1,7
#184	4A11	wt	-		+	5843	10612	1,8
#189	4B11	wt	- ?		+	5810	14218	2,4
#190	4C11	wt	- ?	kleiner	-	6590	2823	0,4
#191	4D11	wt	-	kleiner	-	7246	3520	0,5
#192	4E11	wt	+		+	6381	7373	1,2
#193	4F11	wt	+	aberrant	(-) aberrant	8607	4714	0,5
#194	4G11	wt	-		+	5635	5709	1,0
#195	4H11	wt	-	länger	-	5229	20601	3,9

Fortsetzung von Tabelle 8: Charakterisierung von 262 UV-Mutanten*

Platte 5 ^a		Kolonie-Morphologie ^b		Zell-Morphologie ^c		GFP-Fluoreszenz/RFU ^c		
Mutante	Gly	Glukose	Arabinose filamentös +/-	DMSO	Pheromon Konjugationshyphen +/-	DMSO	Pheromon	Induktion x-fach
FB1UV		wt	+		+	3094	22368	7,2
#158	5C1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	3896	4605	1,2
#170	5D1	wt	+	aberrant	(-) aberrant	5098	7496	1,5
#179	5E1	wt	-		(-)	6116	31588	5,2
#185	5F1	orange	-	aberrant	(-) aberrant	7314	5925	0,8
#186	5G1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	6361	9267	1,5
#188	5H1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	12012	9294	0,8
#196	5A3	wt	-	klein, rund	-	4520	3676	0,8
#197	5B3	wt	-		+	5603	14198	2,5
#198	5C3	wt	-		+	6946	24042	3,5
#199	5D3	wt	+		+	6525	11631	1,8
#200	5E3	wt	+		+	8876	12817	1,4
#202	5F3	wt	-		-	10747	11180	1,0
#205	5G3	wt	-		-	7703	7618	1,0
#206	5H3	wt	-		(-)	13315	17664	1,3
#206B	5A5	wt	-	klein, rund	+	8285	25199	3,0
#207	5B5	wt	-		-	5878	8427	1,4
#208	5C5	wt	+		++	9003	19678	2,2
#210	5D5	wt	-		+	8904	24588	2,8
#211	5E5	wt	+		+	8332	47328	5,7
#213	5F5	wt	-		-	8773	7851	0,9
#214	5G5	wt	-		+	10366	16351	1,6
#215	5H5	wt	-		-	8359	8624	1,0
#217	5A7	wt	-		-	6772	12006	1,8
#218	5B7	wt	-		+ (verzögert?)	6996	19180	2,7
#219	5C7	wt	+		++	8254	28067	3,4
#222	5D7	wt	+		+	8762	18749	2,1
#224	5E7	wt	-		+	8921	35408	4,0
#225	5F7	wt	-		+	10117	58899	5,8
#226	5G7	wt	+		(+)	10925	17228	1,6
#227	5H7	wt	+		+	9094	19644	2,2
#228	5A9	wt	-		-	8823	23794	2,7
#229	5B9	wt	-		+	8808	11692	1,3
#230	5C9	wt	+		+	7607	9852	1,3
#235	5D9	wt	-		-	7085	12021	1,7
#236	5E9	wt	-		+	8680	40765	4,7
#238	5F9	wt	-		+	8781	20990	2,4
#239	5G9	wt	-		++	11789	69861	5,9
#240	5H9	wt	-		+	9193	15333	1,7
#241	5A11	wt	-		++	7087	33656	4,7
#242	5B11	wt	-		++	7718	50767	6,6
#243	5C11	wt	-		++	7714	47493	6,2

Fortsetzung von Tabelle 8: Charakterisierung von 262 UV-Mutanten*

Platte 6 ^a		Kolonie-Morphologie ^b		Zell-Morphologie ^c		GFP-Fluoreszenz/RFU ^d		
Mutante	Gly	Glukose	Arabinose filamentös +/-	DMSO	Pheromon Konjugationshyphen +/-	DMSO	Pheromon	Induktion x-fach
FB1UV		wt	+		+	746	8629	11,6
#167	6C1	wt	-	kleiner	(+)	879	901	1,0
#201	6D1	wt	-		++	1096	27018	24,7
#204	6E1	wt	+		+	713	10387	14,6
#209	6F1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	895	894	1,0
#212	6G1	wt	-		-	749	2688	3,6
#216	6H1	wt	-	aberrant	(-) aberrant	740	833	1,1
#220	6A3	wt	-		-	613	3620	5,9
#221	6B3	wt	-	aberrant	(-) aberrant	724	677	0,9
#223	6C3	wt	-	aberrant	(-) aberrant	723	858	1,2
#231	6D3	weiß	-		+	1125	5110	4,5
#234	6E3	wt	-	aberrant	(-) aberrant	800	813	1,0
#237	6F3	wt	-		++	3711	28087	7,6
#244	6G3	weiß	-		+	943	15855	16,8
#245	6H3	wt	-	aberrant	(-) aberrant	885	781	0,9
#246	6A5	wt	-		++	1269	33474	26,4
#247	6B5	wt	+	aberrant	(+) aberrant	591	2203	3,7
#248	6C5	wt	-	aberrant	(-) aberrant	682	1093	1,6
#249	6D5	wt	-		++	1748	48328	27,7
#250	6E5	wt	+		(+)	681	1837	2,7
#252	6F5	wt	-		+	953	15708	16,5
#253	6G5	wt	+		+	448	1174	2,6
#255	6H5	wt	-	aberrant	(+) aberrant	859	1188	1,4
#256	6A7	wt	-		-	544	1008	1,9
#257	6B7	wt	-		+	924	10690	11,6
#258	6C7	wt	-	aberrant	(-) aberrant	559	722	1,3
#259	6D7	wt	+		+	456	1664	3,6
#260	6E7	wt	-		+	730	8447	11,6
#262	6F7	wt	+		-	543	764	1,4

* 12 als aberrant klassifizierte UV-Mutanten sind hier nicht aufgeführt, da sie so starke Morphologie- und Wachstumsdefekte aufwiesen, dass neben der Mikroskopie keine weitere Charakterisierung möglich war.

^a Die Ergebnisse der Charakterisierung sind pro Mikrotiterplatte angegeben. In der ersten Zeile finden sich die jeweiligen Vergleichswerte des Ausgangsstammes FB1UV.

^b Die Koloniemorphologie wurde auf CM-Glukose- bzw. CM-Arabinoseplatten bewertet (+/- filamentös/nicht-filamentös)

^c Die Zellmorphologie wurde nach der Behandlung mit 3,75 µg/ml synthetischem a2-Pheromon oder entsprechender Menge DMSO nach 5h Inkubation in Mikrotiterplatten bewertet. Angegeben ist die Konjugationshyphenbildung, als vorhanden oder abwesend (+/-). Allgemeinere Morphologiedefekte sind durch den Vermerk aberrant gekennzeichnet.

^d Die GFP-Fluoreszenz des *P_{mfa1}:egfp*-Reporters wurde nach der Behandlung mit 3,75 µg/ml synthetischem a2-Pheromon oder entsprechender Menge DMSO nach 5h Inkubation in Mikrotiterplatten fluorimetrisch bestimmt. Angegeben sind die auf die OD₆₀₀ normalisierten relativen Fluoreszenzwerte (RFU).

Die Induktion gibt das Verhältnis der Pheromon-induzierten Expression des Reportergens zur Basalexpression in den DMSO-Kontrollen an.

Danksagung

Zum Abschluß möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren wissenschaftlich und persönlich begleitet haben und ohne die diese Arbeit nicht in dieser Form vorliegen würde.

An erster Stelle gilt mein Dank Regine Kahmann, für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit, und vor allem für die stete Förderung und viele hilfreiche Anregungen.

Michael Bölker, Renate Renkawitz-Pohl und Erhard Bremer möchte ich für die freundliche Bereitschaft danken, meiner Prüfungskommission anzugehören.

Bei Philip möchte ich mich für zahlreiche anregende und angeregte Diskussionen bedanken, die für mich eine große Bereicherung waren und sich nicht auf die Wissenschaft beschränkten. Für Diskussionen, Materialien und hilfreiche Ratschläge danke ich außerdem Michael und Jörg.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die nette Zusammenarbeit und das gelegentlich nötige Aufbringen von Verständnis meinen Dank aussprechen; ohne Euch wäre es manchmal nicht gegangen. Den anderen Mitgliedern der Abteilung, mit denen ich wissenschaftliche und private Themen diskutieren konnte, sei an dieser Stelle ebenfalls herzlich gedankt.

Besonders möchte ich Miro, Julian und Nicole für viele nette Gespräche sowie ihre Aufmunterungen und ihren Beistand danken. Eine besondere Auszeichnung verdient Kathi für ihre Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.

Den Praktikumsstudenten, Verena und Maurizio, die ich betreuen und anleiten durfte, ein Dankeschön. Es hat sehr viel Spaß gemacht, mit euch zu Arbeiten.

Außerdem danke ich ganz besonders meinen Eltern und meiner Schwester, die mich stets bestärkt und immer an mich geglaubt haben. Danke, dass Ihr mir dieses Studium ermöglicht habt. Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei Meike für die gemeinsam gemeisterten Höhen und Tiefen bedanken.

Lebenslauf

Personalien		Thomas Brefort geboren am 18. Juli 1975 in Dinslaken
Schulbildung	1982-1986 1986-1995 Mai 1995	Besuch der Grundschule Hünxe Besuch des Gymnasiums Voerde Abschluss: Abitur
Studium	Okt. 1995-Aug. 2000 Nov. 1999-Aug. 2000 Aug. 2000	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg, Hauptfächer: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Philipps- Universität Marburg; Betreuer: Prof. Dr. E. Bremer Thema: "Einfluß Nukleoid-assoziiierter DNA-Bindeproteine auf die Gene für die äußeren Membran-proteine OmpW und OmpX" Abschluss: Diplom in Biologie
Zivildienst	Okt. 2000-Sept. 2001	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika sowie Nabelschnurblutbank der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (*)
Promotion	Okt. 2001-Okt. 2004	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg; Betreuerin: Prof. Dr. R. Kahmann Thema: "Identifizierung von Effektoren der Pheromon-MAPK-Kaskade in <i>Ustilago maydis</i> "

(*) Sorg, R.V.; Ozcan, Z.; Brefort, T.; Fischer J.; Ackermann, R.; Müller, M.; Wernet, P. (2003) Clinical-scale generation of dendritic cells in a closed system. J Immunother. 26(4).