

**Charakterisierung von frühen Komponenten der
Signaltransduktion in *Ustilago maydis***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Doris Greilinger
aus München

Marburg/Lahn 2007

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2004 bis Ende Juni 2007 unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am:

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung 31.08.2007

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung von frühen Komponenten der Signaltransduktion in *Ustilago maydis*“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, Juli 2007

Zusammenfassung

In *U. maydis* ist die Zell-Zellerkennung über ein Pheromon-Rezeptor-System essentiell für die pathogene Entwicklung. Nach Pheromonstimulation werden ein cAMP-Signalweg und eine MAPK-Kaskade aktiviert, jedoch ist der genaue Mechanismus der Signalübermittlung von dem Pheromonrezeptor Pra ins Zellinnere unbekannt. In Analogie zu anderen Pilzen wurde postuliert, dass ein G-Protein als Signalübermittler fungiert. In *U. maydis* wurden vier $G\alpha$ -Untereinheiten *gpa1-gpa4* identifiziert, aber nur Gpa3 konnte bisher eine Funktion im cAMP-Signalweg zugeordnet werden. Es blieb ungeklärt, ob die restlichen $G\alpha$ -Untereinheiten untereinander und zu Gpa3 funktionell redundant sind.

In dieser Arbeit wurde der C-Terminus des Rezeptors Pra als wichtiger Bereich für die Signalweiterleitung identifiziert. Zellen, die ein C-terminal deletiertes Rezeptorprotein exprimieren, können nach Pheromonstimulation keine Konjugationshyphen ausbilden, sind jedoch noch in der Lage mit Wildtypzellen zu fusionieren und dikaryotische Filamente zu bilden. Dieser Defekt konnte auf eine fehlende Stimulation der MAPK-Kaskade eingegrenzt werden und deutet darauf hin, dass die MAPK-Kaskade über eine mit dem Pra1-C-Terminus interagierende Komponente aktiviert wird.

Die funktionelle Redundanz der $G\alpha$ -Untereinheiten wurde anhand von Stämmen untersucht, die nur Gpa3 oder keine funktionelle $G\alpha$ -Untereinheit exprimieren. *gpa1 gpa2 gpa4*-Dreifachdeletionsmutanten zeigten eine wildtypartige Pheromonantwort und eine vollständige pathogene Entwicklung, jedoch reduzierte Sporenbildung. Die $G\alpha$ -Untereinheiten Gpa1, Gpa2 und Gpa4 sind demnach im Lebenszyklus von *U. maydis* nicht essentiell. $G\alpha$ -Nullmutanten zeigten phänotypisch keinen Unterschied zu *gpa3*-Einzeldelentionsmutanten und waren cAMP-revertierbar. In Bezug auf die Pheromonantwort wird demnach nur Gpa3 benötigt. Die cAMP-revertierbaren Phänotypen konnten auf die Appressorienbildung und Penetration erweitert werden. Dabei wurde erstmals die Bildung von „knospenden Filamenten“ beschrieben, die auf der Pflanzenoberfläche und anderen hydrophoben Oberflächen auftritt. Die Pathogenität war durch cAMP-Zugabe nicht revertierbar, was zeigt, dass die Signalgebung durch Gpa3 für die Tumorentwicklung benötigt wird. Gpa3 ist somit die zentrale regulatorische $G\alpha$ -Untereinheit im Lebenszyklus von *U. maydis* und funktionell nicht durch eine andere $G\alpha$ -Untereinheit ersetzbar.

Microarray-Analysen zeigten, dass in der Dreifachdeletionsmutante die Basalexpression weniger Gene der Pheromonantwort und des Metabolismus reduziert war, was die Pheromonantwort aber nicht beeinträchtigte. In der Transkriptomanalyse der *gpa3*-Deletionsmutante wurden insgesamt 163 im Vergleich zum Wildtypstamm differenziell exprimierte Gene identifiziert. Die Analyse dieser Gene ergab, dass Gpa3 den Nährstoffstatus der Zelle abbildet und an der Glucoserepression beteiligt ist. Das deutlich unterschiedliche Expressionsprofil im Vergleich zur Dreifachdeletionsmutante bestätigte die funktionell nicht-redundante Funktion von Gpa3.

Summary

In *U. maydis* pathogenic development is initiated by fusion of two compatible strains. Fusion is regulated by a pheromone-receptor system, and pheromone signaling involves the activation of a conserved cAMP pathway as well as of a MAP kinase module. Heterotrimeric G-proteins are considered as the initial transmitters of the pheromone signal during mating partner recognition in filamentous fungi and yeasts. *U. maydis* encodes four G α -subunits *gpa1-4*, but only to Gpa3 a function in the cAMP pathway could be assigned. It remained unclear if the three remaining G α -subunits are functional redundant between each other or to Gpa3.

In this study, the C-terminus of the pheromone receptor Pra1 could be identified as functional important site for signal transduction. Cells expressing a C-terminal truncated receptor protein are unable to form conjugation hyphae upon pheromone stimulation but remain competent to fuse with wild type cells and to establish dikaryotic hyphae. This defect could be ascribed to the lack of MAP kinase module activation and indicates interaction of an activating component with the Pra1-C-terminus.

To test for redundancy in G α -subunit function, strains deleted in *gpa1*, *gpa2*, *gpa4* and strains deleted in all G α -subunits were generated. *gpa1 gpa2 gpa4*-triple mutants were indistinguishable from wild type in their pheromone response and pathogenic development. However, spore formation was reduced in these strains. Therefore, the G α -subunits *gpa1 gpa2 gpa4* are not essential for completion of the *U. maydis* life cycle. G α null mutants were phenotypically indistinguishable from *gpa3*-mutants and could be reverted by external cAMP. These results argue against functional redundancy between G α -subunits and suggest that only Gpa3 is needed for pheromone signaling. The suppression of phenotypes by cAMP could be extended to appressoria formation and penetration. The induction of "budding filaments" in these strains on hydrophobic surfaces including the leaf surface could be described for the first time. However, full pathogenicity could not be achieved by cAMP supplementation indicating essential functions of Gpa3 during tumour development. Gpa3 represents therefore the major regulatory G α -subunit for growth and pathogenic development in *U. maydis*.

Microarray analyses revealed in the triple mutant few genes with lower basal expression compared to wild type. These genes encoded proteins with functions in the pheromone response and metabolism; however these differences did not affect the pheromone response in this strain. The Analysis of the *gpa3* mutant transcriptome led to the identification of 163 differentially expressed genes with functions in metabolism, nutrient transport and morphology. This is consistent with the role of Gpa3 in regulating the cAMP pathway. Therefore, signaling through Gpa3 reflects the nutrient status of the cell and participates in glucose repression of genes. The clear differences to the transcriptome of the triple mutant confirm the functional non-redundant role of Gpa3 as a central activator of the cAMP pathway.

Abkürzungen und Fachbegriffe

a2	das <i>mfa2</i> kodierte Pheromon von <i>U. maydis</i>	kb	Kilobasenpaar
aa	Aminosäuren (<i>amino acid</i>)	kDa	Kilo Dalton
Ara	Arabinose	MAPK	„mitogen activated protein kinase“
bp	Basenpaar(e)	MS	Massenspektrometrie
C-terminal	carboxyterminal	Nano-HPLC	“Nano-High-Performance-Liquid-Chromatography”
Cbx	Carboxin	Nat	Nourseothricin
CM	„complete medium“	N-terminal	aminoterminal
Δ	Deletion	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	ORF	„open reading frame“
DIC	„differential interference contrast“	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DIG	Digoxigenin	PCR	„polymerase chain reaction“
DMSO	Dimethylsulfoxid	PD	„potato dextrose“
dNTP	Deoxyribonukleotide	Phleo	Phleomycin
DTT	Dithiothreitol	PKA	Proteinkinase A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PRE	„pheromone response element“
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“	RT	Raumtemperatur
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
EtOH	Ethanol	Sgfp	"synthetic green fluorescent protein"
f. c.	“final concentration”	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
GAD	GAL4-Aktivierungsdomäne	U	Enzymaktivitätseinheit
Gfp	„green fluorescent protein“	UAS	„upstream activating sequence“
Glc	Glucose	Upm	Umdrehungen pro Minute
GTP	Guanosintriphosphat	UTR	nicht-kodierende Region
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	UV	ultraviolettes Licht
HA	Haemagglutinin	WGA	"wheat germ agglutinin"
Hyg	Hygromycin	wt	Wildtyp
<i>ip</i> -locus	Locus der Succinatdehydrogenase	w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Ustilago maydis</i> , ein Modellorganismus phytopathogener Pilze	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	2
1.3 Die genetische Kontrolle der pathogenen Entwicklung	4
1.3.1 Der <i>a</i> -Locus kodiert für ein Pheromon-Rezeptorsystem	4
1.3.2 Der <i>b</i> -Locus kodiert für einen zentralen Transkriptionsfaktor der pathogenen Entwicklung	5
1.4 Die Pheromonantwort	5
1.5 Die Pheromonsignalweiterleitung	6
1.6 Signalweiterleitung über G-Proteine	9
1.6.1 G-Proteine in <i>U. maydis</i>	10
1.6.2 G-Proteine in der Pheromonsignalweiterleitung in <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	12
1.7 Fragestellung dieser Arbeit	15
2 ERGEBNISSE	16
2.1 Funktionelle Analyse des Pheromonrezeptors Pra1	16
2.1.1 Pheromonsignalweiterleitung in Stämmen mit C-terminal verkürztem Pra1	16
2.1.2 Der Einfluss der C-terminalen Deletion in Pra1 auf die transkriptionelle Pheromonantwort	21
2.1.3 Geladene Aminosäuren in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife von Pra1 sind nicht essentiell für die Pheromonantwort	23
2.2 Untersuchungen zur direkten Interaktion des Pheromonrezeptors Pra1 mit den $G\alpha$ -Untereinheiten	25
2.2.1 <i>In vitro</i> -Synthese der $G\alpha$ -Untereinheiten und Isolation des Pheromonrezeptors aus <i>U. maydis</i>	25
2.2.2 Versuch zum Nachweis der Interaktion von Pra1 mit einer $G\alpha$ -Untereinheit mittels Ko-Immunopräzipitation	26
2.2.3 Test auf Interaktion von Pra1 und Gpa3 <i>in vivo</i> mit dem Split-Gfp-System	30
2.3 Charakterisierung der G-Proteine in <i>U. maydis</i>	31
2.3.1 Untersuchungen zur Redundanz der $G\alpha$ -Untereinheiten Gpa1–Gpa4	31
2.3.2 Wachstum der $G\alpha$ -Deletionsmutanten unter verschiedenen Stressbedingungen	45

2.4	Transkriptomanalysen zur funktionellen Charakterisierung der G α -Untereinheiten	47
2.4.1	<i>U. maydis</i> -Stämme mit induzierbarer Expression von konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten	47
2.4.2	Die Auswirkungen der induzierten Expression von konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten auf die Genexpression	51
2.4.3	Der Einfluß von Arabinose auf die Ausbildung des „multiple budding“- Phänotyps in FB1 in cAMP-haltigem Medium	55
2.4.4	Differentielle Genregulation in G α -Deletionsmutanten	55
2.5	Biochemische Aufreinigung des Pheromonrezeptors	77
2.6	Charakterisierung weiterer Signalkomponenten	78
2.6.1	Phänotypische Charakterisierung von <i>ras1</i> -Deletionsstämmen	78
3	DISKUSSION	81
3.1	Die Auswirkung der Deletion des C-Terminus von Pra1 auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade	81
3.2	Versuche zum Nachweis der direkten Interaktion zwischen dem Pheromonrezeptor und einer G α -Untereinheit in <i>U. maydis</i>	83
3.2.1	Auswirkung der Expression von Pra1-Versionen mit mutierten putativen G α -Bindestellen auf die Pheromonsignalweiterleitung <i>in vivo</i>	84
3.2.2	<i>in vitro</i> -Synthese von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	85
3.2.3	Das Split-Gfp-System zum Nachweis von Protein-Interaktionen <i>in vivo</i>	86
3.2.4	Modell zur putativen Interaktion des Pheromonrezeptors mit Gpa3	86
3.3	Gpa1, Gpa2, Gpa3 und Gpa4 haben keine redundante Funktion in der Pheromonantwort und Tumorbildung	89
3.4	<i>U. maydis</i> -Stämme ohne funktionelle G α -Untereinheiten sind lebensfähig und zeigen einen cAMP-abhängigen Phänotyp	91
3.4.1	Die Notwendigkeit der Gpa3-Signalgebung für die Pathogenität von <i>U. maydis</i>	92
3.4.2	Bildung von knospenden Filamenten in Stämmen mit cAMP-Mangel	93
3.5	Genomweite Expressionsanalysen zur Untersuchung der Signalgebung von G α -Untereinheiten in <i>U. maydis</i>	94
3.5.1	Die induzierte Expression von konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten verursacht keine signifikante Änderung in der Genexpression unter den getesteten Bedingungen	94
3.5.2	Einfluß von Gpa1, Gpa2 und Gpa4 auf die basale Genexpression in <i>U. maydis</i>	94
3.5.3	Gpa3 ist an der Regulation einer Vielzahl von cAMP-regulierten Prozessen beteiligt	97
3.5.4	Vergleichende Analyse der Transkriptomprofile der G α -Deletionsmutanten	104
3.6	Die Funktion von Ras1 in <i>U. maydis</i>	105
3.7	Ausblick	107

4 MATERIAL UND METHODEN	108
4.1 Material und Bezugsquellen	108
4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	108
4.1.2 Oligonukleotide	110
4.1.3 Stämme	111
4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen	114
4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	121
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	121
4.2.2 Kultivierung von <i>U. maydis</i>	122
4.2.3 Mikroskopie und Bildverarbeitung	126
4.2.4 Fluorimetrische Messungen von Gfp in einer Zellsuspension	126
4.3 Molekularbiologische Standardmethoden	126
4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	126
4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	128
4.3.3 Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren mit dem DIG-System	129
4.3.4 Sequenzierung und Strukturanalyse	131
4.4 Transkriptom-Analyse von <i>U. maydis</i>	132
4.4.1 Wachstumsbedingungen	132
4.5 Biochemische Methoden	134
4.5.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen	134
4.5.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot)	135
4.5.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen	135
4.5.4 Isolierung von Proteinen aus <i>U. maydis</i>	136
4.5.5 Ko-Immunopräzipitation und <i>in vitro</i> -Proteinsynthese	136
4.5.6 Proteinaufreinigung von Pra I nach dem TAP-TAG-Protokoll	137
5 LITERATURVERZEICHNIS	139
6 ANHANG	153
6.1 Tabelle cAMP-regulierter Gene	153

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*, ein Modellorganismus phytopathogener Pilze

Ustilago maydis ist ein ubiquitär vorkommender Vertreter der Brandpilze, der spezifisch die Kulturpflanze Mais (*Zea mays*) und die in Mittelamerika beheimatete Wildform des Kulturmaises Teosinte (*Euchlena mexicana*) befällt und den Maisbeulenbrand hervorruft. Systematisch wird *U. maydis* in die Klasse der Heterobasidiomyceten, in die Ordnung Brandpilze (*Ustilaginales*) und die Familie *Ustilaginaceae* eingeordnet. Die Brandpilze umfassen ca. 1200 Arten und es finden sich darunter viele biotrophe Pflanzenschädlinge, die ca. 4000 Pflanzenarten aus 75 Familien infizieren können (Martinez-Espinoza et al., 2002). Darunter sind wirtschaftlich bedeutende Arten wie Weizen, Gerste und Mais (Fischer & Holton, 1957; Kahmann et al., 2000). Der wissenschaftliche Name *Ustilago* wie auch der deutsche Name „Brandpilz“ leitet sich von dem verbrannten Aussehen (*ustilare*, lat. brennen) der infizierten Pflanzenteile nach Bildung der reifen, schwarzen Teliosporen ab. Diese Symptome wurden bereits 1754 von Bonnet beschrieben, die systematische Einordnung unter dem Namen *Ustilago maydis* fand dagegen erst später im Jahre 1944 statt (Christensen, 1963).

Obwohl *U. maydis* als Nutzpflanzenschädling im Vergleich zu anderen Brandpilzen eine eher geringe wirtschaftliche Bedeutung zukommt, hat er sich als Modellorganismus phytopathologischer Forschung und in der Genetik etabliert (Banuett, 1995; Bölker, 2001; Martinez-Espinoza et al., 2002; Kahmann & Kämper, 2004). Wegweisende Studien mit *U. maydis* als untersuchten Organismus führten zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der homologen Rekombination („Holliday“-Struktur), der Bestimmung des Paarungstyps sowie für die Pathogenität relevante Signalkaskaden (Rowell, 1955; Christensen, 1963; Holliday, 1974; Banuett, 1995; Kahmann & Bölker, 1996; Kronstad et al., 1998; Kahmann et al., 2000). Erleichtert wurden diese Arbeiten dadurch, dass *U. maydis* ein fakultativ biotropher Pilz ist, der sich während der haploiden Phase seines Lebenszyklus außerhalb der Pflanze auf einfachen Nährmedien kultivieren lässt. Weitere Vorteile sind die relativ kurze Verdopplungszeit in seiner haploiden Phase sowie das Durchlaufen der sexuellen Entwicklung in ca. 3 Wochen auf der Maispflanze, was ein zügiges genetisches Arbeiten ermöglicht (Holliday, 1961, 1974; Christensen, 1963). Insbesondere werden revers genetische Ansätze durch das sehr effiziente homologe Rekombinationssystem erleichtert

und sind mittlerweile eine Standardmethode zur Charakterisierung von Genfunktionen (Kahmann & Kämper, 2004). Die Verfügbarkeit von dominanten Selektionsmarkern und integrativen Plasmiden ermöglicht die effiziente Geninaktivierung über homologe Rekombination bzw. die ektopische Expression von Genen (Wang et al., 1988; Kronstad et al., 1989; Keon et al., 1991; Kojic & Holloman, 2000; Brachmann et al., 2004; Kämper, 2004). Die Verwendung von regulierbaren Promotoren, die über die Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle gezielt aktiviert bzw. inaktiviert werden können (Bottin et al., 1996; Brachmann et al., 2001) erlaubt es, die Effekte der Expression bzw. Inaktivierung von z. B. essentiellen Genen zu studieren (Straube et al., 2001).

Neben den zahlreichen molekularbiologischen Methoden, ist seit 2003 zudem die vollständige Sequenz des 20,5 Mb großen Genoms von *U. maydis* verfügbar (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/; Kahmann & Kämper, 2004; Kämper et al., 2006). Die annotierte und manuell korrigierte *U. maydis*-Genomsequenz auf der *MIPS Ustilago maydis Data-Base* (MUMDB; <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) ermöglicht das schnelle Auffinden einzelner Gene und dazu homologer Gensequenzen in *U. maydis* und anderen Pilzen. In Kombination mit Affymetrix-DNA-Microarrays, die eine parallele Expressionsanalyse von ~ 90% der vorhergesagten 6902 Protein-kodierenden Gene erlauben (Scherer et al., 2006), können nun durch einzelne Gene kontrollierte regulatorische Netzwerke aufgedeckt werden. Mit diesem Methodenspektrum stellt *U. maydis* ein ideales Modellsystem zur molekularen Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen in Brandpilzen dar.

1.2 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

U. maydis ist ein fakultativ biotropher Heterobasidiomycet, dessen sexuelle Entwicklung ausschließlich auf der Wirtspflanze abläuft. Sein Lebenszyklus lässt sich anhand der Kernphasen in drei verschiedene Stadien einteilen, die mit einer Veränderung der Morphologie einhergehen (Abb. 1A) (zusammengefasst in Kahmann et al., 2000). In der saprophytischen Phase vermehren sich die haploiden Zellen, Sporidien genannt, durch Knospung und sind apathogen. Zu Beginn der pathogenen Phase müssen sich zwei kompatible Sporidien, die unterschiedliche Allele der Paarungstyploci besitzen, über ein Pheromon-Rezeptorsystem erkennen. Aufgrund des Pheromonsignals bilden diese Zellen an einem Zellpol sogenannte Konjugationshyphen, die gerichtet aufeinander zuwachsen und an der Spitze fusionieren (Bowmann, 1946; Snetselaar & Mims, 1992; Snetselaar, 1993; Snetselaar et al., 1996). Nach der Zellfusion bildet sich ein dikaryotisches Filament aus, das

die Zellkerne und das Zytoplasma beider Fusionspartner enthält (Sleumer, 1932; Rowell, 1955; Fischer & Holton, 1957). Erst in der dikaryotischen, filamentösen Form kann *U. maydis* die Wirtspflanze infizieren (Christensen, 1963; Snetselaar & Mims, 1992, 1993). Die Penetration von jungem, meristematischem Pflanzengewebe erfolgt über Appressorien oder seltener durch Stomata (Snetselaar & Mims, 1992, 1993; Banuett & Herskowitz, 1996). In der Pflanze wächst *U. maydis* zunächst intrazellulär, wobei die Hyphen von der intakten Plasmamembran der Pflanzenzelle umgeben sind (Snetselaar & Mims, 1992). Als erste Symptome einer Infektion treten Chlorosen und Anthocyanbildung auf. Etwa fünf Tage nach Infektion beginnen die Hyphen sich zu verzweigen und wachsen nun meist interzellulär. Zeitgleich ist die Induktion der Gallenbildung, hier als Tumor bezeichnet, anhand der Vergrößerung der Pflanzenzellen zu beobachten (Snetselaar & Mims 1992, 1994). Die Tumorbildung kann an allen oberirdischen Teilen der Pflanze auftreten. In den Tumoren proliferiert das Pilzmyzel massiv und wächst sowohl zwischen als auch in den vergrößerten Wirtszellen (Snetselaar & Mims, 1992; Banuett & Herskowitz, 1996). Nach etwa 10 Tagen erfolgt die Fragmentierung der sporogenen Hyphen, die nach der Fusion beider Zellkerne (Karyogamie) schließlich zu den diploiden Teliosporen ausdifferenzieren (Banuett & Herskowitz, 1996). Die reifen Sporen sind von einer schwarzen pigmentierten Hülle umgeben und können nach Aufplatzen des Tumors durch Wind, Regen und Insekten verbreitet werden (Christensen, 1963) (Abb. 1B). Unter geeigneten Bedingungen keimen die Teliosporen zu Probasidien aus und schnüren nach erfolgter Meiose die haploiden Sporidien ab (Christensen, 1963).

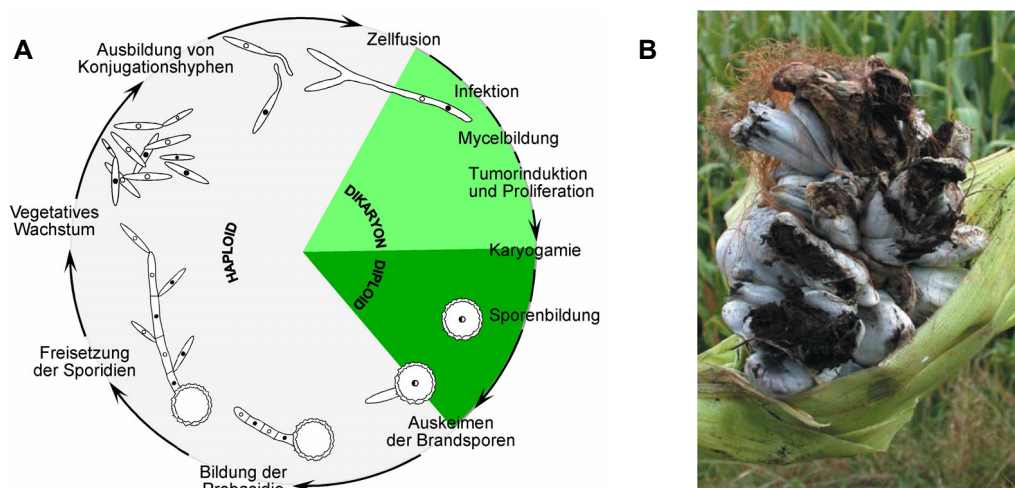


Abbildung 1. Der Lebenszyklus von *U. maydis*. A) Grün unterlegt sind jene Entwicklungsstadien, in denen der Pilz auf die Wirtspflanze angewiesen ist (Abb. aus Laborsammlung). B) Tumorentwicklung in einem Maiskolben (das Bild stammt aus Kahmann & Kämper, 2004).

Unter Laborbedingungen können die Zell-Zellerkennung, Fusion und Dikaryenbildung nachvollzogen werden. Die Konjugationshyphenbildung kann durch Stimulation mit synthetischem Pheromon induziert werden (Spellig et al., 1994). Die Ausbildung von dikaryotischen Filamenten nach der Zellfusion ist gut auf aktivkohlehaltigem Festmedium als weißes Luftmyzel zu sehen verursacht durch leere, luftgefüllte Abschnitte im distalen Bereich der Filamente (Day & Anagnostakis, 1971; Banuett & Herskowitz, 1994b).

1.3 Die genetische Kontrolle der pathogenen Entwicklung

Für die erfolgreiche Infektion von Maispflanzen durch *U. maydis* ist die Fusion zweier kompatibler Sporidien und die Ausbildung des dikaryotischen Filaments Voraussetzung. Dies wird genetisch durch zwei ungekoppelte Paarungstyploci, *a* und *b*, gesteuert. Der biallelische *a*-Locus kodiert für ein Pheromon-Rezeptorsystem, das für die Zell-Zell-Erkennung und die Zellfusion essentiell ist (Froeliger & Leong, 1991; Bölker et al., 1992; Spellig et al., 1994). Nach erfolgter Zellfusion ist der multiallelische *b*-Locus zusammen mit dem *a*-Locus für die Aufrechterhaltung des Dikaryons und die nachfolgende sexuelle Entwicklung notwendig (Holliday, 1961; Pulhalla, 1968; Banuett & Herskowitz, 1989, 1994b). Die sexuelle Entwicklung auf der Pflanze kann nur erfolgen, wenn sich beide Fusionspartner sowohl in den *a*- als auch in den *b*-Allelen unterscheiden (Rowell & DeVay, 1954; Holliday, 1961; Puhalla, 1968). Haben zwei Sporidien unterschiedliche Allele in den Paarungstyploci, so werden sie als „kompatible“ Paarungspartner bezeichnet.

1.3.1 Der *a*-Locus kodiert für ein Pheromon-Rezeptorsystem

U. maydis ist ein getrenntgeschlechtlicher (heterothallischer) Pilz mit einem tetrapolaren Paarungssystem (Rowell & DeVay, 1954). Das Erkennen des Paarungspartners findet in diesen Pilzen gewöhnlich über den Austausch von Pheromonen statt (Christensen, 1963). In *U. maydis* sind im biallelischen *a*-Locus die Komponenten dieses Zell-Zellerkennungssystems kodiert. Die beiden Allele des *a*-Locus, *a1* und *a2*, umfassen 4,5 kb (*a1*) bzw. 8,0 kb (*a2*) heterologe Sequenz und werden von homologen Sequenzabschnitten flankiert (Froeliger & Leong, 1991; Bölker et al., 1992). *a1* und *a2* kodiert jeweils für einen Pheromonrezeptor Pra (*pheromone receptor for a-pheromone*) und ein Vorläuferprotein für das Pheromon Mfa (*mating factor a*) (Bölker et al., 1992). Dieses Pheromon-Rezeptorsystem ist für die Erkennung zweier kompatibler Sporidien und die anschließende Zellfusion essentiell und die Deletion des Pheromon- oder des Pheromonrezeptorgens führt zur Sterilität (Bölker et al., 1992). Die gegenseitige Erkennung kompatibler Sporidien wird dabei durch die

unterschiedliche Spezifität der Pheromonrezeptoren für das jeweils komplementäre Pheromon gewährleistet, weshalb zwei Stämme mit gleichen *a*-Loci nicht miteinander fusionieren können. Für die erfolgreiche Zellfusion müssen beide Fusionspartner durch das komplementäre Pheromon stimuliert werden (Bölker et al., 1992). Die Vorläuferproteine von Mfa1 (40 aa) und Mfa2 (38 aa) werden posttranslational prozessiert und modifiziert. Die reifen Pheromone werden dann als 13 (Mfa1) bzw. 9 (Mfa2) Aminosäuren lange Peptide, die an ihren C-Termini farnesyliert und carboxymethyliert sind, sekretiert (Spellig et al., 1994). Die Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2 sind jeweils 357 und 346 Aminosäuren lang und weisen sieben Transmembrandomänen auf (Bölker et al., 1992). Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz können sie in die Klasse D der pilzlichen Pheromonrezeptoren eingeordnet werden (<http://www.gpcr.org/7tm/multali/multali.html>).

1.3.2 Der *b*-Locus kodiert für einen zentralen Transkriptionsfaktor der pathogenen Entwicklung

Der multiallelische *b*-Locus kodiert für zwei divergent transkribierte Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), die durch einen ca. 200 bp großen Promotorbereich getrennt sind (Gillisen et al., 1992). Sie kodieren für Homeodomänenproteine, die einen funktionellen Transkriptionsfaktor bilden, wenn die beiden Untereinheiten von verschiedenen Allelen stammen (Kämper et al., 1995). Durch den künstlich erzeugten, haploiden Stamm CL13, der ein chimäres *bE1/bW2*-Allel enthält, konnte gezeigt werden, dass ein funktionelles *bE/bW*-Heterodimer ausreichend ist für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* (Bölker et al., 1995). Dieser Stamm ist ohne vorherige Zellfusion pathogen und wird als solopathogener Stamm bezeichnet. Basierend auf diesen und anderen Experimenten wurde dem *b*-Heterodimer eine zentrale Rolle als Regulator der Pathogenität zugewiesen. Mittlerweile konnte eine Vielzahl direkt und indirekt *b*-regulierter Gene identifiziert werden, die für die weitere pathogene Entwicklung wichtig sind (Romeis et al., 2000; Brachmann et al., 2001; Scherer et al., 2006).

1.4 Die Pheromonantwort

Die Wahrnehmung von Pheromon geht in *U. maydis* mit einer morphologischen und einer transkriptionellen Veränderung einher, was zusammenfassend als Pheromonantwort bezeichnet wird. Sie ist Voraussetzung für die Erkennung und Fusion zweier kompatibler Sporidien und damit für die weitere pathogene Entwicklung.

Morphologisch ist nach Pheromonstimulation die Ausbildung von Konjugationshyphen zu beobachten. Dies sind dünne, meandernde Hyphen, die meist an einem Zellpol entstehen und gerichtet auf die Pheromonquelle zuwachsen (Snetselaar et al., 1996). Gleichzeitig arretieren die Zellen ihren Zellzyklus in der postreplikativen G₂-Phase (Garcia-Muse et al., 2003). Die Fusion der Konjugationshyphen an ihrer Spitze führt zur Bildung des dikaryotischen Filaments, für dessen Aufrechterhaltung ein aktives b-Heterodimer und die autokrine Pheromonstimulation nötig sind (Snetselaar & Mims, 1993; Banuett & Herskowitz, 1994b, 1989).

Transkriptionell wird durch kompatibles Pheromon die Expression der Gene des *a*- und des *b*-Locus induziert (Urban et al., 1996b). Die induzierte Expression von *mfa* bewirkt wahrscheinlich eine gesteigerte Pheromonstimulation des Kreuzungspartners, während die erhöhte Expression des Pheromonrezeptors die Perzeption des Pheromonsignals erleichtert. Durch diese positive Rückkopplung wird vermutlich das gerichtete Aufeinander-Zuwachsen der Konjugationshyphen ermöglicht (Snetselaar et al., 1996). Die Pheromon-induzierte Expression der *b*-Gene stellt sicher, dass unmittelbar nach der Zellfusion ausreichend b-Heterodimere für die Ausbildung eines stabilen Dikaryons vorhanden sind (Urban et al., 1996b). Nach der Zellfusion wird die Expression von *mfa* und *pra* zwar reprimiert, ist aber noch ausreichend für die autokrine Pheromonstimulation und die weitere Expression der *b*-Gene (Urban et al., 1996b).

1.5 Die Pheromonsignalweiterleitung

Die Bindung von Pheromon an den Pheromonrezeptor führt in *U. maydis* zur Aktivierung von zwei konservierten Signalwegen, einem cAMP-Signalweg und einer MAPK-Kaskade (Abb. 2). Der genaue Mechanismus der Signalübermittlung von dem Pheromonrezeptor an diese zwei Signalwege ist bisher nicht bekannt.

Die Hauptkomponenten des cAMP-Signalwegs sind die α - und die β -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins Gpa3 bzw. Bpp1 (Regenfelder et al., 1997; Krüger et al., 1998; Müller et al., 2004), die Adenylatzyklase Uac1 sowie die regulatorische und katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) Ubc1 bzw. Adr1 (Gold et al., 1997; Dürrenberger et al., 1998). Gpa3 aktiviert die Adenylatzyklase Uac1, die den Sekundärbotenstoff cAMP synthetisiert. Der steigende intrazelluläre cAMP-Spiegel führt in Folge zur Dissoziation der inhibitorischen PKA-Untereinheit Ubc1 und aktiviert dadurch die katalytische Untereinheit Adr1. Wie Gpa3 aktiviert wird, ist bisher nicht bekannt. Verschiedene Hinweise deuten auf

eine Funktion des cAMP-Signalwegs in der Pheromonsignalweiterleitung hin. Deletionsstämme in *Gpa3*, *Bpp1*, *Uac1* oder *Adr1* zeigen alle neben einem filamentösen Wachstum auch eine Reduktion der Paarungskompetenz und der *a*-Genexpression (Regenfelder et al., 1997, Dürrenberger et al., 1998; Krüger et al., 1998; Gold et al., 1994; Müller et al., 2003b). Die Aktivierung des cAMP-Signalwegs durch die konstitutiv aktivierte $G\alpha$ -Untereinheit *Gpa3^{QL}*, durch die Deletion der regulatorischen PKA-Untereinheit *Ubc1*, die Überexpression der katalytischen Untereinheit *Adr1* oder externe cAMP-Zugabe induziert dagegen die Expression der *a*-Gene (Krüger et al., 1998; Hartmann et al., 1999; Müller et al., 1999; Eichorn et al., 2006). Ein künstlich aktivierter cAMP-Signalweg alleine ist jedoch nicht ausreichend um die Bildung von Konjugationshyphen zu induzieren oder die Zellfusion zu erlauben. Die Effizienz der Konjugationshyphenbildung ist in Stämmen mit *Gpa3^{QL}* oder nach externer cAMP-Zugabe sogar reduziert (Müller, 2003). Somit ist der cAMP-Signalweg für die transkriptionelle Pheromonantwort notwendig.

Die Aktivierung der MAPK-Kaskade durch den Pheromonstimulus induziert die Konjugationshyphenbildung und verstärkt die Expression der *a*-Gene (Kaffarnik et al., 2003; Müller, 2003). Die MAPK-Kaskade besteht aus drei Serin-Threonin-Proteinkinasen, die sich sequentiell aktivieren (Abb. 2). Dieses Modul der Signalweiterleitung ist in eukaryotischen Zellen hoch-konserviert (Widmann et al., 1999). Die in *U. maydis* durch Pheromon stimulierte MAPK-Kaskade besteht aus der MAPKK-Kinase *Kpp4/Ubc4*, der MAPK-Kinase *Fuz7/Ubc5* und der MAP-Kinase (*mitogen activated protein kinase*) *Kpp2/Ubc3* (Banuett & Herskowitz, 1994a; Mayorga & Gold, 1999; Müller et al., 1999, 2003). In vegetativ wachsenden Zellen haben die MAPK-Kaskade und der cAMP-Signalweg eine antagonistische Wirkung auf die Zellmorphologie. So wurden in einem Ansatz zur Identifizierung von Suppressoren des filamentösen Wachstums von *uac1*-Deletionsmutanten die regulatorische PKA-Untereinheit *Ubc1*, alle Komponenten der MAPK-Kaskade und ein zusätzliches Protein, *Ubc2*, identifiziert (Mayorga & Gold, 1998; Andrews et al., 2000). Diese Proteine wurden daher mit „Ubc“ für *Ustilago bypassing cyclase* bezeichnet. Das identifizierte *Ubc2*-Protein zeigt Ähnlichkeit in seiner Domänen-Struktur zu dem Adaptorprotein *Ste50p* aus *S. cerevisiae*, indem es ein „sterile alpha-motif“ (SAM), eine Ras-Assoziationsdomäne (RA) und Src-Homologie Domänen (SH3) aufweist (Mayorga & Gold, 1999). Für *Ubc2* wurde daher eine ähnliche Funktion zu *Ste50p* als Adaptorprotein zur Signalweiterleitung über die MAPK-Kaskade postuliert (Mayorga & Gold, 1999). Ein putativer Interaktionspartner von *Ubc2* und/oder *Kpp4* ist das monomere G-Protein *Ras2* (Lee & Kronstad, 2002). *Ras2* ist epistatisch zu MAPK-Komponenten und die Expression

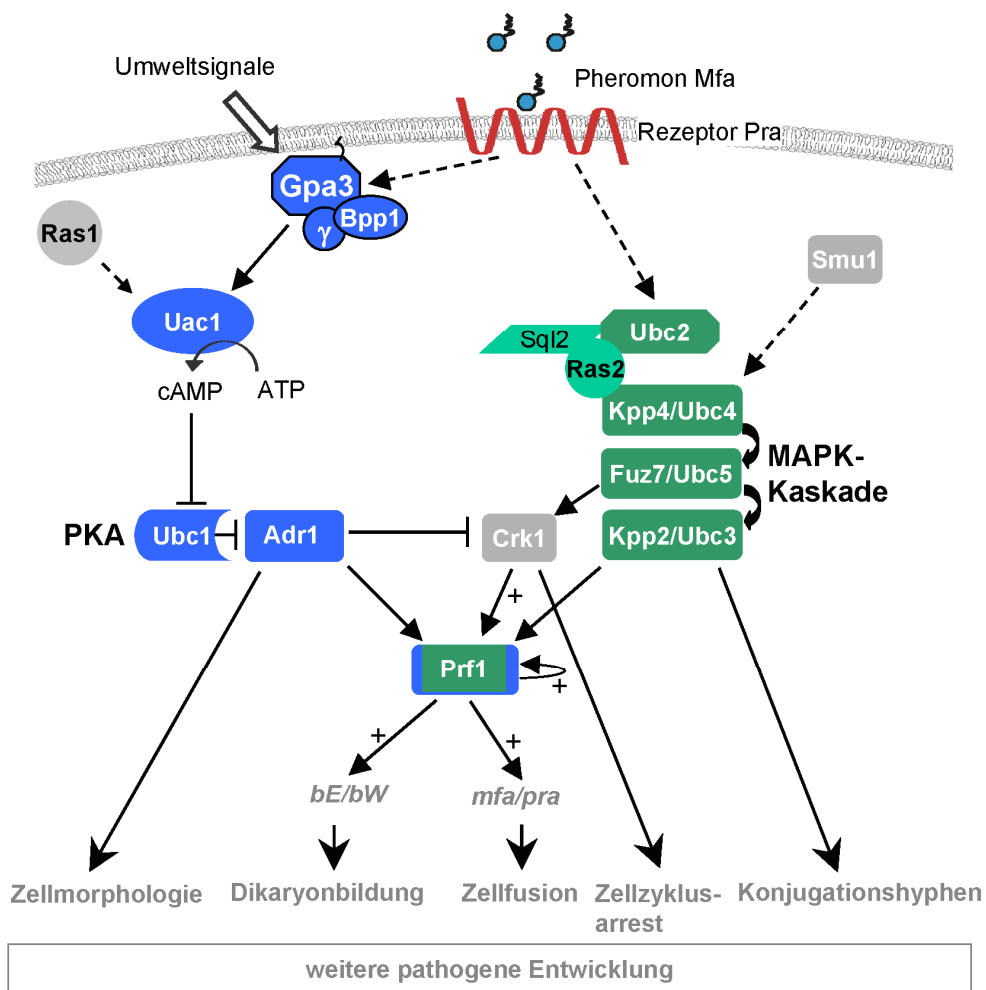


Abbildung 2. Der Pheromonsignalweg. Die Komponenten des cAMP-Signalwegs sind blau, die der MAPK-Kaskade grün dargestellt. Die grau markierten Proteine Ras1 und Smu1 haben noch keine eindeutig zugeordnete Funktion. Positive Interaktionen sind durch Pfeile angezeigt. Gestrichelte Pfeile stellen postulierte, bis jetzt nicht überprüfte Interaktionen dar. Ein + neben einem Pfeil zeigt transkriptionelle Aktivierung an.

einer konstitutiv aktiven Version führt zu induzierter Pheromongenexpression (Lee & Kronstad, 2002; Müller et al., 2003). Ein Aktivator von Ras2 ist vermutlich der CDC25-ähnliche Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sql2 (Müller et al., 2003). Die Deletion einzelner MAPK-Kaskade Komponenten führt in Paarungstests zu einem weitgehenden Verlust der Dikaryonbildung, wenn kompatible Deletionsstämme verwendet werden (Mayorga & Gold, 1999, 2001; Müller, 2003). Diese Deletionsstämme können jedoch noch mit Wildtypstämmen fusionieren und zeigen dann stabile Dikaryonbildung (Banuett & Herskowitz, 1994; Mayorga & Gold, 1999, 2001; Müller et al., 1999, 2003a).

Nach einem Pheromonstimulus führt die Aktivierung des cAMP-Signalwegs und der MAPK-Kaskade zur Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors Prf1 (*pheromone*

response factor 1; Hartmann et al., 1996, 1999) (Abb. 2). Der HMG-Box Transkriptionsfaktor (*high mobility group*) Prf1 ist für die basale und pheromoninduzierte Expression der *a*- und *b*-Gene essentiell und *prf1*-Deletionsmutanten sind steril (Hartmann et al., 1996). Die Pheromon-induzierte Expression wird dabei durch die Bindung von Prf1 an ein 9 bp langes, cis-aktives Sequenzmotiv, das *pheromone response element* (PRE) in den regulatorischen Promotorbereichen dieser Gene vermittelt (Urban et al., 1996b). Die Aktivität von Prf1 unterliegt sowohl einer transkriptionellen als auch einer posttranskriptionellen Kontrolle. Posttranskriptionell wird die Prf1-Aktivität über Phosphorylierung durch die MAP-Kinase Kpp2 als auch durch die katalytische PKA-Untereinheit Adr1 reguliert (Kaffarnik et al., 2003). Transkriptionell unterliegt die *prf1*-Expression einer komplexen Regulierung durch Umweltsignale wie Nährstoffverfügbarkeit und Pheromon. Im Promotorbereich von *prf1* befinden sich dazu regulatorische Elemente wie PRE-Bindestellen, ein UAS-Element (*upstream activating sequence*) und Bindestellen des Transkriptionsfaktors Rop1 (Hartmann et al., 1996, 1999; Brefort et al., 2005). Rop1 ist für die Expression von *prf1* in axenischer Kultur nötig, wird jedoch auf der Pflanzenoberfläche vermutlich durch andere Aktivatoren ersetzt (Brefort et al., 2005). Die Kinase Crk1 ist nötig für die *prf1*-Expression über die Aktivierung des UAS-Elements (Garrido et al., 2004). Durch genomweite Expressionsanalysen konnte mittlerweile eine Vielzahl an Pheromon-regulierten Genen identifiziert werden (Eichhorn, 2004; Zarnack, 2006).

1.6 Signalweiterleitung über G-Proteine

Alle Zellen besitzen die Fähigkeit verschiedenste Umweltsignale wahrzunehmen und sie intern zu verarbeiten um in geeigneter Weise darauf reagieren zu können. *U. maydis* ist als erfolgreicher Pflanzen-pathogener Pilz unter anderem auf die effiziente Wahrnehmung von Nährstoffen, Pheromon und Pflanzensignalen angewiesen um seinen Lebenszyklus vollenden zu können. Ein konserviertes System zur Wahrnehmung diverser Signale und der Signaltransduktion ins Zellinnere in Eukaryoten besteht aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR, *G-protein-coupled receptors*) und G-Proteinen. Durch die Bindung eines Liganden an den Rezeptor ändert dieser seine Konformation und aktiviert so ein heterotrimeres G-Protein. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β , γ), wobei die $G\alpha$ -Untereinheit die Guanin-Nukleotide GDP oder GTP binden kann sowie eine GTPase-Domäne besitzt. Durch die Konformationsänderung des aktivierten Rezeptors wird die Affinität der assoziierten $G\alpha$ -Untereinheit zum gebundenen GDP zugunsten des in der Zelle übermäßig vorhandenen GTP verschoben (Hoffman, 2005a). Die GTP-gebundene,

aktive Form der $G\alpha$ -Untereinheit dissoziiert vermutlich daraufhin von der als Komplex weiterbestehenden $\beta\gamma$ -Untereinheit. Es wurde jedoch auch Signaltransduktion ohne Dissoziation der Untereinheiten beobachtet (Hoffman, 2005a). Beide G-Protein-Untereinheiten können nun unterschiedliche Effektoren aktivieren wie z. B. die Adenylatzyklase, Phospholipase C, Ionen-Kanäle und Komponenten oberhalb der MAPK-Kaskade. Die Aktivierung dieser Proteine führt ihrerseits zur Neusynthese von Sekundärbotenstoffen und damit zu einer Amplifizierung des Eingangssignals. Die Signalgebung wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit beendet, wobei ein Phosphat abgespalten wird. Dieser Prozess kann durch GAP-Proteine (*GTPase activating protein*), auch als RGS-Proteine (*regulators of G-protein signaling*) bezeichnet, beschleunigt werden.

Neben den heterotrimeren G-Proteinen zählen in die Familie der GTP-bindenden Proteine auch die sogenannten „kleinen G-Proteine“. Sie sind vorwiegend als Monomere aktiv in Signalkaskaden und werden aufgrund phylogenetischer Gemeinsamkeiten in fünf Familien eingeteilt: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran (Wennerberg et al., 2005).

1.6.1 G-Proteine in *U. maydis*

In *U. maydis* konnten vier Gene, *gpa1–gpa4*, die für α -Untereinheiten heterotrimer G-Proteine kodieren, ein Gen für eine β -Untereinheit, *bpp1* und ein Gen für eine γ -Untereinheit *gpg1* identifiziert werden (Regenfelder et al., 1997; Müller et al., 2003b und unveröffentlicht). Deletionen dieser Gene zeigten nur einen phänotypischen Defekt für *gpa3* und *bpp1*, die beide als Aktivatoren des cAMP-Signalwegs eingeordnet werden konnten (Krüger et al., 1998; Müller et al., 2003b). *gpa3-* als auch *bpp1*-Deletionsmutanten wachsen filamentös, zeigen eine starke Reduktion der Paarungskompetenz und eine defekte basale und Pheromon-induzierte Expression des Pheromogens *mfa* (Regenfelder et al., 1997; Krüger, 1999; Müller, 2003). Der intrazelluläre cAMP-Spiegel ist in diesen Deletionsstämmen erniedrigt (Krüger, 1999) und die phänotypischen Defekte sowie die reduzierte Paarungskompetenz können durch externe cAMP-Zugabe aufgehoben werden (Krüger et al., 1998; Krüger, 1999; Müller et al., 2003b). Die vier $G\alpha$ -Untereinheiten lassen sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz phylogenetisch in vier Gruppen einteilen, für die gemäß dem System aus höheren Eukaryoten auch ähnliche Funktionen vermutet werden (Regenfelder et al., 1997; Bölker, 1998). *Gpa3* fällt in die Gruppe der Adenylatzyklase-stimulierenden $G\alpha$ -Untereinheiten ($G\alpha_s$), was mit seiner Funktion in *U. maydis* übereinstimmt. *Gpa1* wird zu den Adenylatzyklase-inhibierenden $G\alpha$ -Untereinheiten ($G\alpha_i$) und *Gpa2* in eine pilzspezifische Gruppe ($G\alpha_{11}$) eingeordnet. *Gpa4* bildet aufgrund der deutlichen Unterschiede in der

Aminosäuresequenz konservierter Bereiche eine eigene Gruppe. Wie in den meisten anderen Pilzen wurden auch in *U. maydis* diese G α -Untereinheiten nicht aufgrund eines Phänotyps, sondern über die gezielte Suche nach der Sequenz der konservierten Bereiche identifiziert (Regenfelder et al., 1997; Bölker, 1998).

In *U. maydis* wird aufgrund folgender Hinweise eine Beteiligung einer G α -Untereinheit an der Pheromonsignalweiterleitung angenommen: i) Der Pheromonrezeptor Pra1 ist zu 40% ähnlich zum Pheromonrezeptor Ste3p aus *S. cerevisiae*, der an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt ist (Bölker et al., 1992). ii) Genetische Analysen deuten auf die Teilnahme der G α -Untereinheit Gpa3 an der Weiterleitung des Pheromonsignals über den cAMP-Signalweg hin.

Pra1 weist die für GPCRs typische Proteintopologie mit sieben Transmembrandomänen und geladenen Aminosäuren in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife auf, die vermutlich für die Interaktion mit G α -Untereinheiten wichtig sind (Abb. 3). Neben den genannten Strukturmerkmalen weisen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren keine weiteren konservierten Domänen auf, die auf ihre Interaktionspartner für die Signalweiterleitung schließen lassen (Lefkowitz, 2000; Pierce et al., 2002).

Gpa3 spielt für die Pheromonantwort eine wichtige Rolle, was durch die künstliche Aktivierung oder die Inaktivierung dieser G α -Untereinheit gezeigt wurde (Regenfelder et al., 1997; Krüger et al., 1998). Gpa3 ist jedoch nicht ausschließlich für die Pheromonantwort wichtig, da *gpa3*-Deletionsmutanten zusätzliche phänotypische Defekte aufweisen, die nicht in *pral*-Deletionsmutanten auftreten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zwei alternative Modelle zur Funktion von Gpa3 aufgestellt (Krüger et al., 1998; Bölker, 1998). Zum einen wurde postuliert, dass Gpa3 an Nährstoffrezeptoren koppelt und stimuliert wird, daraufhin den cAMP-Signalweg aktiviert, was dann über den Transkriptionsfaktors Prf1 die Expression der Pheromogene indirekt beeinflusst. Dies stützt sich auf die Beobachtung, dass die Basalexpression des Pheromogens *mfa* auch durch Nährstoffbedingungen beeinflusst wird (Holliday, 1974; Banuett & Herskowitz, 1989; Spellig et al., 1994; Hartmann, 1999). Das Pheromonsignal würde dann durch eine andere G α -Untereinheit weitergeleitet werden, die bisher möglicherweise nicht identifiziert werden konnte aufgrund von funktioneller Redundanz zwischen den G α -Untereinheiten (Regenfelder et al., 1997). Als Alternative wurde vorgeschlagen, dass Gpa3 an verschiedene Rezeptoren koppelt und die Adenylatzyklase als Antwort auf Nährstoffsignale und Pheromon stimuliert.

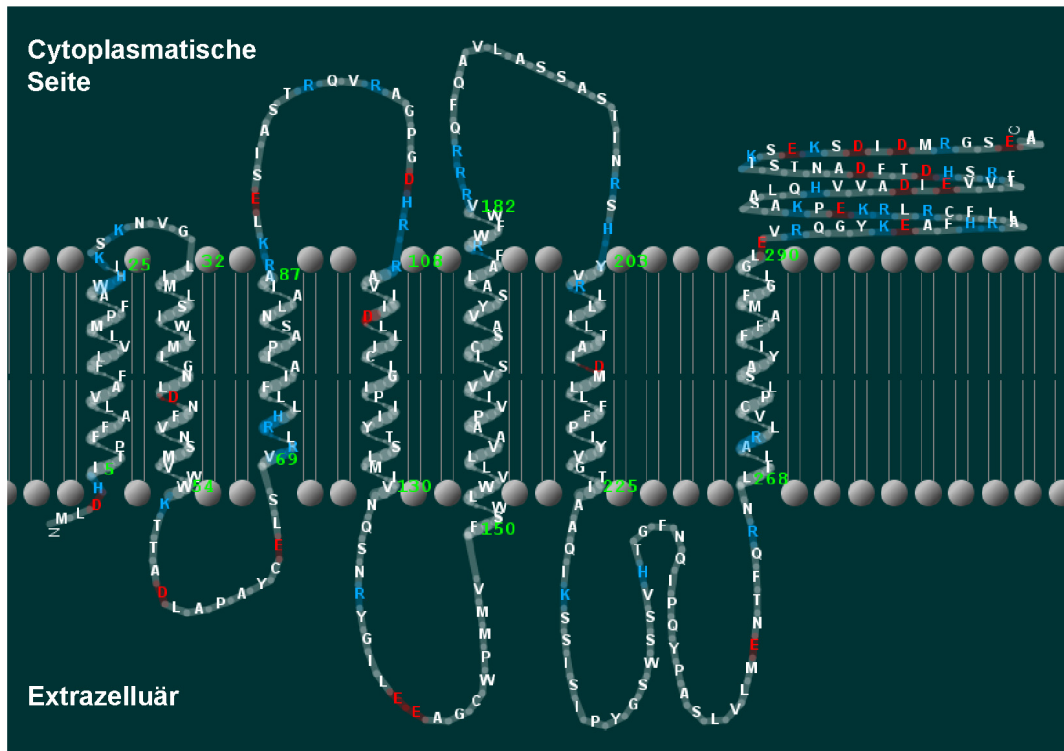


Abbildung 3. Vorhersage der topologischen Anordnung der Siebentransmembran-domänen des Pheromonrezeptors Pra1 aus *U. maydis*. In rot markiert sind Aminosäuren, die eine elektronegative Ladung aufweisen, in blau Aminosäuren mit einer elektropositiven Ladung. Die Topologie der Proteinschleifen und des C-Terminus sind nicht modelliert worden. Diese Abbildung wurde mit dem Programm TMRPres2D Version 0.91 erstellt.

1.6.2 G-Proteine in der Pheromonsignalweiterleitung in *S. cerevisiae* und *S. pombe*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* und die Spalthefe *S. pombe* sind die bisher best-untersuchten Pilze in Bezug auf die Pheromon-Signaltransduktion (Bardwell, 2005). In beiden Hefen werden das Pheromon- wie auch Nährstoffsignale durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wahrgenommen und intrazellulär über heterotrimere G-Proteine weitergeleitet (Abb. 4). In *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurden je zwei $G\alpha$ - und eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit identifiziert. Obwohl in beiden Hefen für die Nährstoffwahrnehmung ein cAMP-Signalweg und für die Pheromonantwort eine MAPK-Kaskade benutzt werden, unterscheidet sich deren Aktivierung.

Das Pheromonsignal wird jeweils durch einen GPCR – Ste2/Ste3 in *S. cerevisiae* und Mam2/Map3 in *S. pombe* – erkannt. Intrazellulär wird das Pheromonsignal in *S. cerevisiae* über ein heterotrimeres G-Protein, in *S. pombe* dagegen über die monomere $G\alpha$ -Untereinheit mit bisher unbekanntem Interaktionspartnern weitergeleitet (Abb. 4). In beiden Pilzen wird

nach Pheromonstimulation die MAPK-Kaskade induziert, was die morphologische Ausbildung der Paarungshyphen (*shmoo*) induziert, ähnlich zur Konjugationshyphenbildung in *U. maydis*. Welche Untereinheiten der G-Proteine die MAPK-Kaskade aktivieren ist wiederum in beiden Hefen unterschiedlich. In *S. cerevisiae* aktiviert die $\beta\gamma$ -Untereinheit Ste4/Ste18p die MAPK-Kaskade auf zweierlei Art (Whiteway et al., 1989; Nomoto et al., 1990). Zum einen bindet sie das Adaptorprotein Ste50p, das die drei Kinasen der Kaskade bindet und sie so in räumliche Nähe zueinander und zur Plasmamembran bringt. Zum anderen bindet sie die Proteinkinase Ste20p aus der Familie der *p21-activated* Kinasen, die vermutlich die MAPKKK Ste11p phosphoryliert (Leeuw et al., 1998). Eine zu Ste20p ähnliche Kinase, Smu1, wurde auch in *U. maydis* identifiziert und die Deletion des entsprechenden Gens führte zu einer reduzierten Pheromongenexpression (Smith et al., 2004). Es blieb jedoch unklar ob dieser Effekt über den cAMP-Signalweg oder die MAPK-Kaskade vermittelt wird (Kahmann & Kämper, 2004). Zusätzliche Zielproteine der $\beta\gamma$ -Untereinheit in *S. cerevisiae* sind Cdc24, ein GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*) von Cdc42, Far1 und Rho1, die das polare Wachstum regulieren. Die der $G\alpha$ -Untereinheit Gpa1 zugeschriebene Funktion liegt zum einen in der Inhibition der Signalgebung durch Bindung der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Kürzlich sind jedoch auch positive regulatorische Aufgaben von Gpa1 identifiziert worden. Die genomweite Analyse einer konstitutiv aktiven Version Gpa1^{QL}

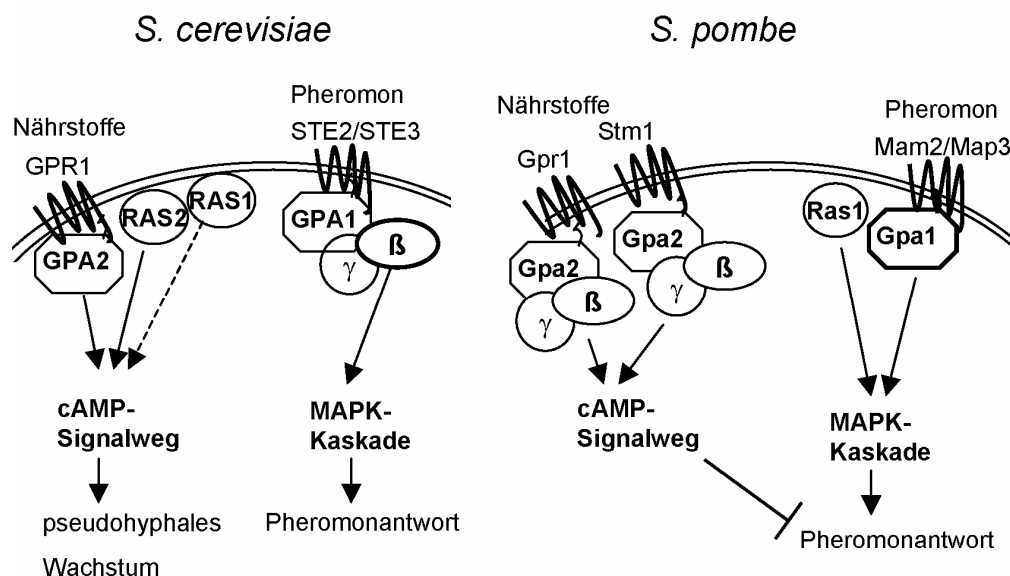


Abbildung 4. Unterschiedliche Funktionen der G-Proteine in *S. cerevisiae* und *S. pombe*. Hervorgehoben sind die Hauptkomponenten der Pheromonsignalweiterleitung. In *S. cerevisiae* aktiviert die $\beta\gamma$ -Untereinheit Ste4/Ste18p die MAPK-Kaskade, in *S. pombe* die $G\alpha$ -Untereinheit Gpa1.

zeigte, dass die $G\alpha$ -Untereinheit die Transkription von paarungsspezifischen Genen induziert (Guo et al., 2003) und zudem *shmoo*-Bildung in Abwesenheit von Pheromon induzieren kann. Weitere Zielproteine von Gpa1^{QL} sind die regulatorische und katalytische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase, Vsp15 und Vsp34, sowie ein ribosomales Bindeprotein Scp160 unbekannter Funktion (Guo et al., 2003; Slessareva et al., 2006).

In *S. pombe* scheint die $G\alpha$ -Untereinheit die MAPK-Kaskade zu aktivieren; ist sie deletiert führt dies zu Sterilität (Obara et al., 1991; Ladds et al., 2005). Direkte Interaktionspartner von Gpa1 sind bisher nicht bekannt. Zusätzlich zur $G\alpha$ -Untereinheit reguliert das einzige Ras-Protein in *S. pombe*, Ras1, die MAPK-Kaskade positiv (Xu et al., 1994; Masuda et al., 1995). Die Aktivierung von Ras wird hierbei wahrscheinlich indirekt über die Pheromon-induzierte Expression des Ras-GEF Ste6 erreicht (Hoffman, 2005a). Bisher wurde kein Ste50-ähnliches Adaptorprotein wie in *S. cerevisiae* identifiziert und die genaue mechanistische Verbindung zwischen dem Pheromonrezeptor und der Aktivierung der MAPK-Kaskade ist noch ungeklärt. Während *S. cerevisiae* unter nährstoffreichen Bedingungen paaren kann, ist für *S. pombe* der Glucose-/oder Stickstoffmangel Voraussetzung für die Paarung (Mochizuki & Yamamoto, 1992). Die Wahrnehmung dieser Nährstoffe wird über das zweite G-Protein Gpa2 und zwei identifizierte G-Proteingekoppelte Rezeptoren über den cAMP-Signalweg übermittelt (Abb. 4) (Welton & Hoffman, 2000; Chung et al., 2001).

Auf Nährstoffsignale hin wird der cAMP-Signalweg in *S. cerevisiae* durch eine monomere $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert, für die strukturell zur β -Untereinheit verwandte Proteine als Interaktionspartner identifiziert werden konnten (Abb. 4) (Harashima & Heitman, 2002; Batlle et al., 2003). In *S. pombe* aktiviert ein heterotrimeres G-Protein den cAMP-Signalweg, was der Situation in *U. maydis* entspricht. Diese spezifische Zuordnung einer $\beta\gamma$ -Untereinheit zu einem der Signalwege in Pilzen unterscheidet sich von Säugetieren, in denen die $\beta\gamma$ -Untereinheit vermutlich mit verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten interagieren kann (Lengeler et al., 2000). Parallel zur monomeren $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert ein Ras-Protein den jeweiligen Signalweg in *S. cerevisiae* und *S. pombe* (Hoffman, 2005a).

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

In *U. maydis* wurden vier $G\alpha$ -Untereinheiten *gpa1–gpa4* identifiziert und es war bisher nur möglich, Gpa3 Funktionen zuzuordnen. Aufgrund der Ähnlichkeit des Pheromon-Rezeptorsystems in *U. maydis* zu anderen Pilzen, wurde die Beteiligung einer der $G\alpha$ -Untereinheiten in der Pheromonsignalweiterleitung vermutet. Es blieb jedoch unklar ob dies Gpa3 oder eine andere $G\alpha$ -Untereinheit ist, die aufgrund von funktioneller Redundanz möglicherweise in Einzeldelentionsmutanten keinen Phänotyp hervorrief. In dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, ob die $G\alpha$ -Untereinheiten funktionell überlappende Aufgaben wahrnehmen bzw. welche von ihnen an den Pheromonrezeptor koppelt. Weiterhin sollten über genomweite Expressionsanalysen Zielgene der $G\alpha$ -Untereinheiten identifiziert werden um damit Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten. Parallel dazu sollte der Pheromonrezeptor Pra1 auf für die Signalweiterleitung wichtige Bereiche hin untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Funktionelle Analyse des Pheromonrezeptors Pra1

Zur Identifikation von für die Funktion wichtigen Domänen im Pheromonrezeptor Pra1 wurde dieser in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife und dem C-Terminus mutiert und nach Expression in *U. maydis* auf seine Funktionalität in der Pheromon-signalweiterleitung hin überprüft.

2.1.1 Pheromonsignalweiterleitung in Stämmen mit C-terminal verkürztem Pheromonrezeptor

Um Einblick in die Aufgaben zu erlangen, die der cytoplasmatische C-Terminus von Pra1 in der Pheromonsignalweiterleitung ausübt, wurden Stämme hergestellt, die C-terminal verkürzte Versionen des Rezeptors unter der Kontrolle des natürlichen *pra1*-Promotors exprimieren (FB1pra1¹⁻²⁹⁰:gfp bzw. FB1pra1¹⁻²⁹⁸:gfp) und auf ihre Pheromonantwort hin untersucht. In Pra1¹⁻²⁹⁰ fehlt der gesamte cytoplasmatische Bereich, während in Pra1¹⁻²⁹⁸ noch 8 Aminosäuren des C-Terminus vorhanden sind. Diese 8 Aminosäuren enthalten ein Tyrosin und ein Lysin, die auch in Pra2 an dieser Stelle konserviert sind. Die Fusion dieser Rezeptorversionen an Gfp ermöglichte es, die Proteinexpression mit dem Mikroskop und im Western-Blot nachzuweisen. Die Expression des Wildtyprezeptors Pra1 als Gfp-Fusion (FB1pra1¹⁻³⁵⁷:gfp) diente als Kontrolle. Die zur Transformation dieser Stämme verwendeten Plasmide wurden zuvor sequenziert und die genomische Integration in den *pra1*-Locus mittels diagnostischer PCR und Southern-Analyse verifiziert (nicht gezeigt). Anschließend wurde die Pheromonwahrnehmung und -sekretion sowie die Paarungskompetenz dieser Stämme untersucht. Die Pheromonwahrnehmung wurde nach Stimulierung mit synthetischem a2-Pheromon in diesen Stämmen quantitativ anhand der morphologischen Zellantwort (Konjugationshyphenbildung) bestimmt (Tab. 1). In Stämmen, die den Wildtyp-Rezeptor oder einen Gfp-fusionierten Wildtyprezeptor exprimierten, reagierten nach 4 h über 90% der Zellen auf Pheromon mit der Bildung von Konjugationshyphen. Das Fusionsprotein Gfp stört demzufolge die Signalweiterleitung nicht. Im Gegensatz dazu reagierten Stämme mit den Allelen *pra1*¹⁻²⁹⁰ und *pra1*¹⁻²⁹⁸ nicht auf Pheromon und es konnten nur in wenigen Einzelfällen Konjugationshyphen beobachtet werden. Eine verlängerte Inkubationszeit von 20 h ergab keine signifikante Veränderung, die Zellen zeigten also keine zeitliche Verzögerung in ihrer Pheromonantwort.

Tabelle 1. Mikroskopische Quantifizierung der Konjugationshyphenbildung.¹

Stimulierter Stamm ³	Anteil der Zellen mit Konjugationshyphen in % ²						
	Experiment 1			Experiment 2			
	3,5 h	4,5 h	5,5 h	4 h	5 h	6 h	20 h
FB1	81	>90	>90	94	ng ⁴	95	ng
FB1pra1 ¹⁻³⁵⁷ :gfp	78	92	>92	92	ng	95	ng
FB1pra1 ¹⁻³⁵⁷ :gfp	49	74	77	92	ng	94	ng
FB1pra1 ¹⁻²⁹⁸ :gfp	0	0,4	0	0,4	0,3	0,8	1,7
FB1pra1 ¹⁻²⁹⁸ :gfp	0	0	0	1	0,4	1,7	1,4
FB1pra1 ¹⁻²⁹⁰ :gfp	0	0	0,3	0,6	0,4	0	0
FB1pra1 ¹⁻²⁹⁰ :gfp	0	0,1	0	0	0,4	0	0,5

¹ Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit synthetischem a2-Pheromon stimuliert.

² Pro Zeitpunkt und Stamm wurden 300 – 500 Zellen untersucht.

³ mit Ausnahme von FB1 wurden je zwei unabhängig generierte Stämme getestet

⁴ ng: nicht gezählt

Die fluoreszenz-mikroskopische Analyse von Zellen des Pheromon-stimulierten Stammes FB1pra1¹⁻³⁵⁷:gfp zeigte eine Lokalisierung des Pheromonrezeptors an der Spitze der Konjugationshyphen sowie eine Anreicherung in den Vakuolen (Abb. 5). In Stämmen, die die Allele *pra1*¹⁻²⁹⁰ und *pra1*¹⁻²⁹⁸ exprimierten, war bis auf wenige Einzelzellen die beobachtete Fluoreszenz der Zellen gleich der Hintergrundfluoreszenz. Diese Beobachtung lässt sich durch eine defekte oder reduzierte Basalexpression von Pra1, durch eine fehlende Pheromon-induzierte Hochregulierung der *pra1*-Expression, ein nicht-stabiles Rezeptorprotein oder eine defekte Aktivierung der Konjugationshyphenbildung erklären. Diese Möglichkeiten wurden in den nachfolgenden Experimenten untersucht. Da Stämme mit den Allelen *pra1*¹⁻²⁹⁰ und *pra1*¹⁻²⁹⁸ ähnliche Defekte in der Pheromonwahrnehmung aufwiesen, wurden in diesen Experimenten nur Stämme mit dem Allelen *pra1*¹⁻²⁹⁰ verwendet.

Im ersten dieser Experimente wurde im Western-Blot mit einem Gfp-Antikörper nachgewiesen, dass die Expression von Pra1¹⁻³⁵⁷:gfp und Pra1¹⁻²⁹⁰:gfp in unstimulierten Zellen vergleichbar ist (Abb. 5A). Für Pheromon-stimulierte Zellen wurde im Western-Blot eine verstärkte Signalintensität der Bande von Pra1¹⁻³⁵⁷:gfp sowie eine Bande auf der Höhe von Gfp im Vergleich zu den unstimulierten Proben detektiert. Dies entspricht der Erwartung einer induzierten Neusynthese des Rezeptorproteins nach Aktivierung des Pheromon-signalwegs. Das detektierte Gfp-Protein stellt höchstwahrscheinlich ein Abbau-produkt des Fusionsproteins dar. In Pheromon-stimulierten Zellen, die Pra1¹⁻²⁹⁰:gfp exprimieren, konnte keine Zunahme des Rezeptorproteins im Vergleich zu unstimulierten

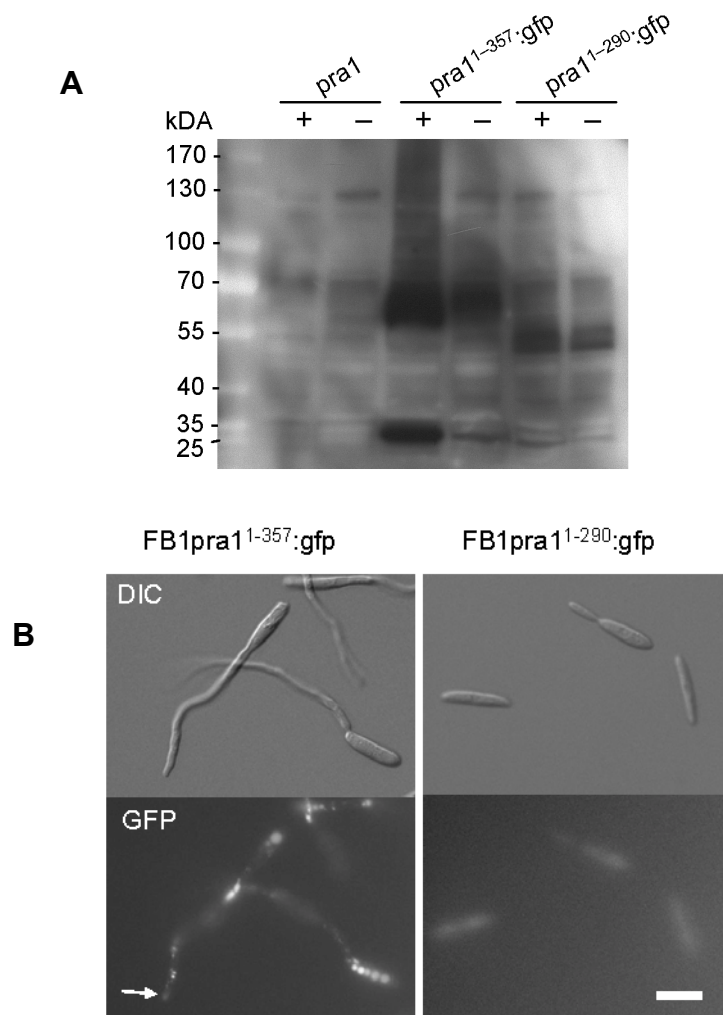


Abbildung 5. Expression von Pra1:gfp und Pra1¹⁻²⁹⁰:gfp nach 4,5 h Pheromonstimulation bei 28°C. A) Western-Blot-Nachweis der Pra1:gfp-Allele mit einem Gfp-Antikörper in Pheromon-behandelten (+) und DMSO behandelten, unstimulierten (-) Zellen. Zum Vergleich ist der Wildtypstamm FB1 gezeigt (erste zwei Spuren). B) Die Zellen wurden lichtmikroskopisch (DIC, "differential interference contrast") oder mit Fluoreszenzanregung (GFP) mikroskopiert. Der weiße Pfeil markiert die Hyphenspitze mit verstärkter Ansammlung von Pra1:gfp. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Zellen detektiert werden. Für die Pheromonsignalweiterleitung werden zwei Signalwege, der cAMP-Signalweg und eine MAPK-Kaskade benötigt, wobei für die Konjugationshyphenbildung die Aktivierung der MAPK-Kaskade ausreichend ist (Müller, 2003). Um zu entscheiden für welchen der beiden Signalwege der C-Terminus von Pra1 eine Rolle in der Aktivierung spielt, wurde die Stimulation mit synthetischem α 2-Pheromon in Anwesenheit von 6 mM cAMP wiederholt, was einen defekten cAMP-Signalweg ausgleichen kann. Wie bereits von Müller et al. (2004) gezeigt, reduziert die externe cAMP-Zugabe den Anteil der Zellen mit Konjugationshyphen im Wildtyp auf 17% und stellt die morphologische

Pheromonantwort in einem *gpa3*-Deletionsstamm wieder her (Tab. 2). Zellen, die keinen Pheromonrezeptor oder einen C-terminal deletierten Rezeptor exprimieren, bildeten auch in Anwesenheit von Pheromon und externem cAMP keine Konjugationshyphen (Tab. 2). Damit zeigten der *gpa3*-Deletionsstamm und der Stamm mit einer C-terminal deletierten Rezeptorversion unterschiedliche Defekte in der Pheromonantwort, was darauf hindeutet, dass der C-Terminus von Pra1 nicht für die Aktivierung des cAMP-Signalwegs benötigt wird.

Tabelle 2. Quantifizierung der Konjugationshyphenbildung.

Stimulierter Stamm	Anteil der Zellen mit Konjugationshyphen in % ¹	
	Pheromon - cAMP	Pheromon + 6 mM cAMP
FB1	> 90	17
FB1 Δ pra1	0	0
FB1 Δ gpa3	0	17
FB1pra1 ¹⁻³⁵⁷ :gfp	> 90	ng ²
FB1pra1 ¹⁻²⁹⁰ :gfp	0	0

¹ die Zellen wurden für 4 h mit synthetischem a2-Pheromon stimuliert;
pro Ansatz wurden mindestens 500 Zellen mikroskopiert

² nicht gezählt

Da Stämme mit C-terminal deletierten Pra1 nicht auf eine künstliche Pheromonstimulation reagierten, wurde in einem Konfrontationsexperiment untersucht, ob sie unter natürlichen Pheromonkonzentrationen Konjugationshyphen bilden bzw. selbst Pheromon sekretieren. Dazu wurden die zu testenden Stämme in geringem Abstand von dem kompatiblen Stamm FB2 auf einen mit Wasseragar beschichteten Objektträger getropft und für 20 h bei 22°C inkubiert. In allen Kombinationen war deutlich das Auswachsen von Konjugationshyphen in FB2 zu beobachten, die Pheromonsekretion scheint also nicht gestört (Abb. 6). In Übereinstimmung mit der Reaktion auf synthetisches Pheromon bildeten die Zellen der Stämme FB1 und FB1pra1¹⁻³⁵⁷:gfp auch in diesem Test Konjugationshyphen. Zellen, die den C-terminal deletierten Rezeptor exprimieren, formten keine Konjugationshyphen.

Für die Pathogenität von *U. maydis* entscheidend ist die Zell-Zell Erkennung beider Partner über das Pheromon-Rezeptor-System mit der nachfolgenden Zellfusion und der Bildung eines stabilen Dikaryons. Um die Paarungskompetenz des Stammes, der einen C-terminal deletierten Rezeptor exprimiert, zu testen, wurde dieser in Mischung mit dem kompatiblen

Wildtypstamm FB2 auf aktivkohlehaltigen PD-Festagar getropft. Die erfolgreiche Fusion mit FB2 war anhand der Bildung eines weißen Myzels sichtbar (Abb. 7A). Als Kontrollen dienten die Mischung kompatibler Wildtypstämme (FB1 mit FB2) sowie der Stamm ohne Pheromonrezeptor $FB1\Delta pra1$. Die noch vorhandene Fusionskompetenz im Stamm mit C-terminal deletiertem Pra1 deutet darauf hin, dass das verkürzte Rezeptorprotein noch partiell funktionell ist, da bei Fehlen des Pheromonrezeptors in einem der Fusionspartner die Paarung nicht mehr stattfinden würde (siehe Kombination von $FB1\Delta pra1$ mit FB2) (Bölker et al., 1992). Die Paarungskompetenz des Stammes $FB1pra1^{1-290}:gfp$ war darüber hinaus temperaturabhängig. Bei optimaler Paarungstemperatur von 22°C bildeten diese Stammkombinationen nach zwei Tagen ein weißes Myzel, während die Filamentbildung bei 28°C stark reduziert war. Wurde der aktivkohlehaltige PD-Festagar zusätzlich mit 6 mM cAMP

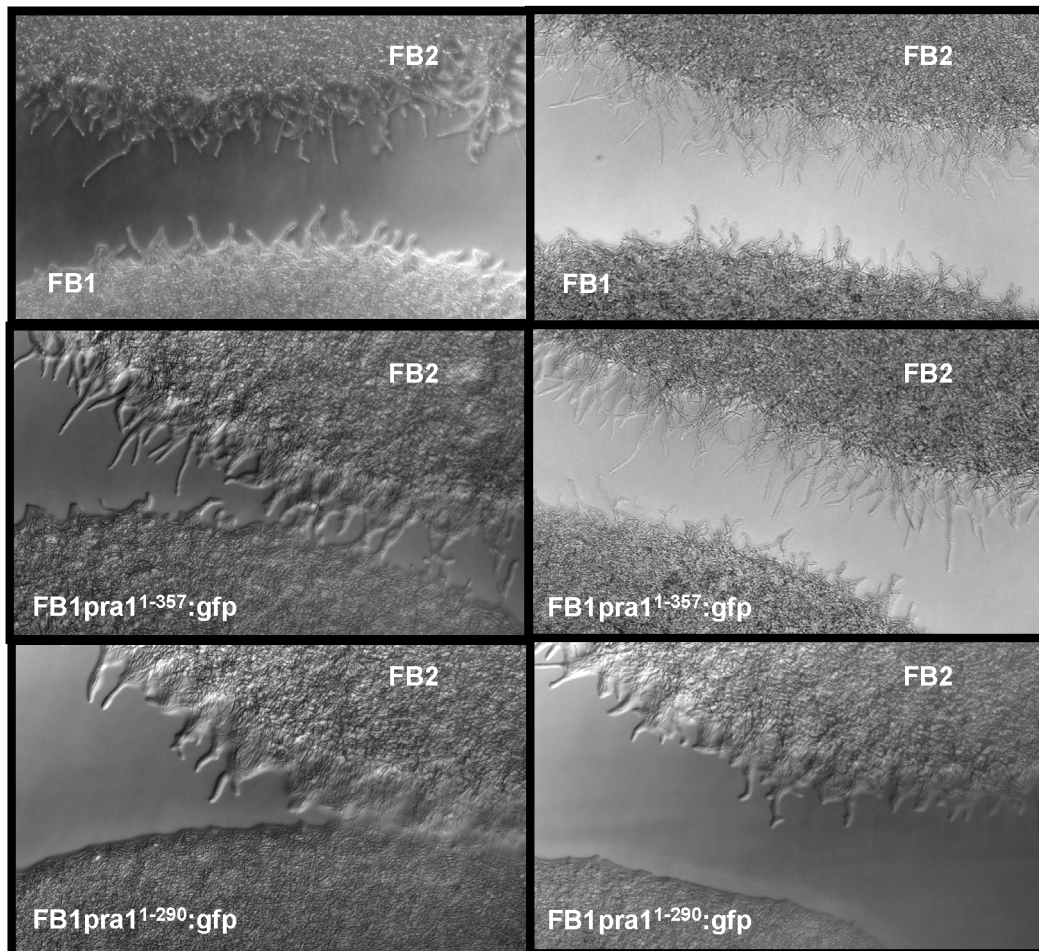


Abbildung 6. Induktion von Konjugationshyphenbildung in FB2 durch sekretiertes Pheromon der Teststämme. Die kleinsten Distanzen zwischen den aufgetropften Stämmen betragen von links oben nach rechts unten: FB1 und FB2 252 μm , FB1 und FB2 237 μm , $FB1pra1^{1-357}:gfp$ und FB2 113 μm , $FB1pra1^{1-357}:gfp$ und FB2 228 μm , $FB1pra1^{1-290}:gfp$ und FB2 56 μm und $FB1pra1^{1-290}:gfp$ und FB2 252 μm .

versetzt, war kein Unterschied bei 22°C zu beobachten (nicht gezeigt), die Reduktion der Paarung bei 28°C war jedoch annähernd aufgehoben. Diese temperaturabhängige Paarungskompetenz wurde auch in Deletionsmutanten der MAPK-Kaskade beobachtet (K. Zarnack, persönl. Mitteilung), was auf eine Rolle des C-Terminus in der Aktivierung der MAPK-Kaskade hindeutet.

Um auszuschließen, dass nach Stimulation mit synthetischem Pheromon die Konjugationshyphenbildung in Stämmen mit C-terminal deletiertem Pra1 durch die standardmäßige Inkubation bei 28°C verhindert wird, wurde die Stimulation bei 22°C mit und ohne 6 mM cAMP wiederholt. Das erhaltene Ergebnis entsprach der Stimulation bei 28°C (Abb. 7B). Somit führt die Deletion des C-Terminus von Pra1 zu einem partiellen Funktionsverlust: die Konjugationshyphenbildung ist gestört, Zellfusion mit einem kompatiblen Wildtypstamm ist jedoch noch möglich.

2.1.2 Der Einfluss der C-terminalen Deletion in Pra1 auf die transkriptionelle Pheromonantwort

Als weiteren Indikator für das Erkennen und die Weiterleitung des Pheromonsignals wurde die transkriptionelle Aktivierung des Pheromogens *mfal* untersucht. Die basale Expression von *mfal* in Stämmen, die den Wildtyprezeptor Pra1 als Gfp-Fusion (FB1pra1¹⁻³⁵⁷:gfp) oder C-terminal deletierten Pra1:gfp (FB1pra1¹⁻²⁹⁰:gfp) exprimieren, war reduziert im Vergleich zum Wildtyp FB1 (Abb. 7C). Die Stimulation mit synthetischem Pheromon führte zu einer Erhöhung der *mfal*-Transkriptmenge in FB1pra1¹⁻³⁵⁷:gfp und bestätigt, dass die Gfp-Fusion die Pheromonsignalweiterleitung nicht behinderte. Der Stamm FB1pra1¹⁻²⁹⁰:gfp zeigte eine Induktion der *mfal*-Expression, allerdings wurde das Niveau von FB1pra1¹⁻³⁵⁷:gfp nicht erreicht. Bei 28°C erreichte er bezogen auf die geringere Basalexpression eine ähnliche faktorielle Induktion wie im Wildtyp. Es wurde jedoch nur 10% (22°C) bzw. 30% (28°C) der Gesamt-*mfal*-Transkriptmenge des Wildtypstammes erreicht. Die induzierte *mfal*-Expression nach Pheromonstimulation bestätigt, dass Pra1 noch partiell funktionell ist.

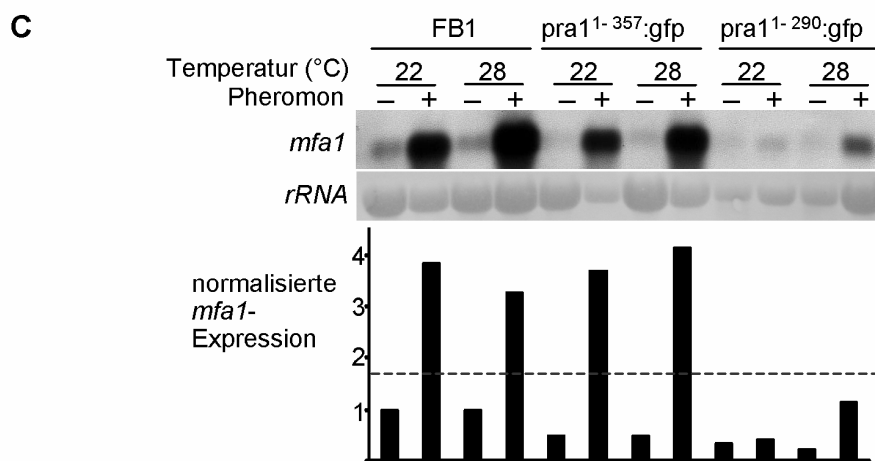
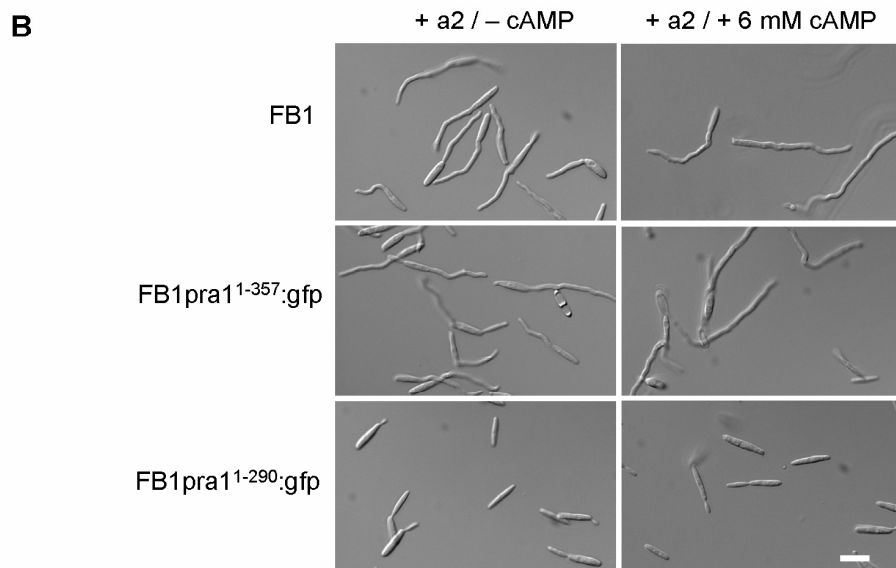
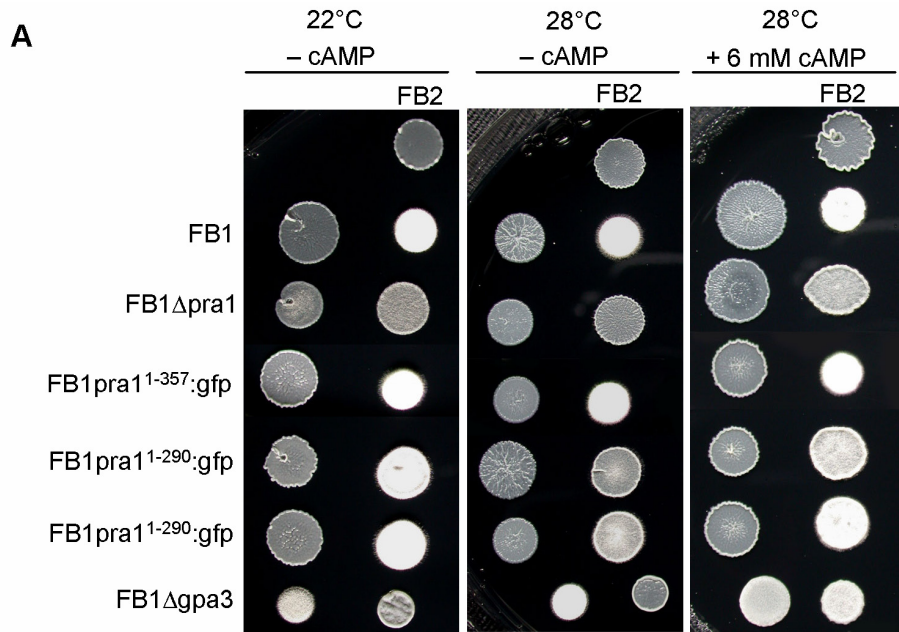


Abbildung 7. Das Paarungsverhalten, die Konjugationshyphenbildung und *mfa1*-Induktion in FB1pra1¹⁻²⁹⁰. A) Nachweis der Paarungskompetenz auf aktivkohlehaltigem PD-Festagar, der, wenn angegeben, mit 6 mM cAMP versetzt war. Die FB1-Teststämme wurden entweder alleine (erste Reihe) oder in Kombination mit dem kompatiblen Stamm FB2 (zweite Reihe) bei den angegebenen Temperaturen für zwei Tage inkubiert. Für FB1pra1¹⁻²⁹⁰ sind zwei unabhängig generierte Stämme gezeigt. B) Konjugationshyphenbildung nach 4,5 h Stimulation der FB1-Teststämme mit synthetischem a2-Pheromon. Die Ansätze wurden dafür mit oder ohne cAMP-Zugabe bei 22°C rotierend inkubiert. Der Größenstandard entspricht 10 µm und gilt für alle Bilder. C) *mfa1*-Expression nach Pheromonstimulation (+) oder DMSO-Behandlung (-) bei 22°C oder 28°C. Pro Spur wurden ca. 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Eine DIG-markierte *mfa1*-Sonde diente zur Detektion. Im Balkendiagramm sind die *mfa1*-Expressionswerte nach Normalisierung der ungleichen RNA-Ladmenge angegeben. Die *mfa1*-Basalexpression im Wildtypstamm bei 22°C wurde hierfür auf den Wert 1 gesetzt.

2.1.3 Geladene Aminosäuren in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife von Pra1 sind nicht essentiell für die Pheromonantwort

In G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde gezeigt, dass geladene Aminosäuren, die in der Nähe der Transmembranhelices in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife liegen, für die Kopplung und Aktivierung von G-Proteinen wichtig sind (Baldwin, 1994). Auch die dritte cytoplasmatische Schleife von Pra1 weist im Vergleich mit anderen GPCRs ähnliche Aminosäuresequenzen auf: 182-VRRRQFQ-188 am N-terminalen Ende und 199-NRSHYVR-205 am C-terminalen Ende (Abb. 8A). Die Substitution einzelner dieser Aminosäuren bzw. deren Deletion führten im Pheromonrezeptor Ste2p und in einem Nährstoffrezeptor, Gpr1p, in *S. cerevisiae* zum Funktionsverlust (Clark et al., 1994; Xue et al., 1998). Um die Bedeutung dieser Bereiche für die Funktion von Pra1 zu untersuchen, wurden die Aminosäuren 182-VRRR am N-terminalen Ende und 201-SHYV am C-terminalen Ende der dritten cytoplasmatischen Schleife über zielgerichtete Mutagenese durch Alanin ersetzt. Diese Rezeptorversion wurde als Gfp-Fusionsprotein in FB1 im natürlichen Locus exprimiert. Die eingeführte Mutation wurde über die Sequenzierung eines diesen Bereich umspannenden PCR-Amplifikats der genomischen DNA dieses Stammes verifiziert (siehe Material und Methoden). Im Paarungstest von FB1pra1^{(182A-185A) (201A-204A)}:gfp mit dem Wildtypstamm FB2 auf aktivkohlehaltigen Platten konnte kein Unterschied zur Paarung zweier Wildtypstämme beobachtet werden (Abb. 8B). Nach Stimulation mit synthetischem a2-Pheromon wurden in dieser Mutante Konjugationshyphen vergleichbar zum Wildtypstamm gebildet (Abb. 8D). In Übereinstimmung damit wurde in einem Konfrontationsansatz in beiden Stämmen Konjugationshyphen beobachtet (Abb. 8C). Die Veränderung der möglichen 'Gα-spezifischen' Bindestellen in Pra1 führte somit nicht zu einem Funktionsverlust in der Konjugationshyphenbildung oder der Paarungskompetenz.

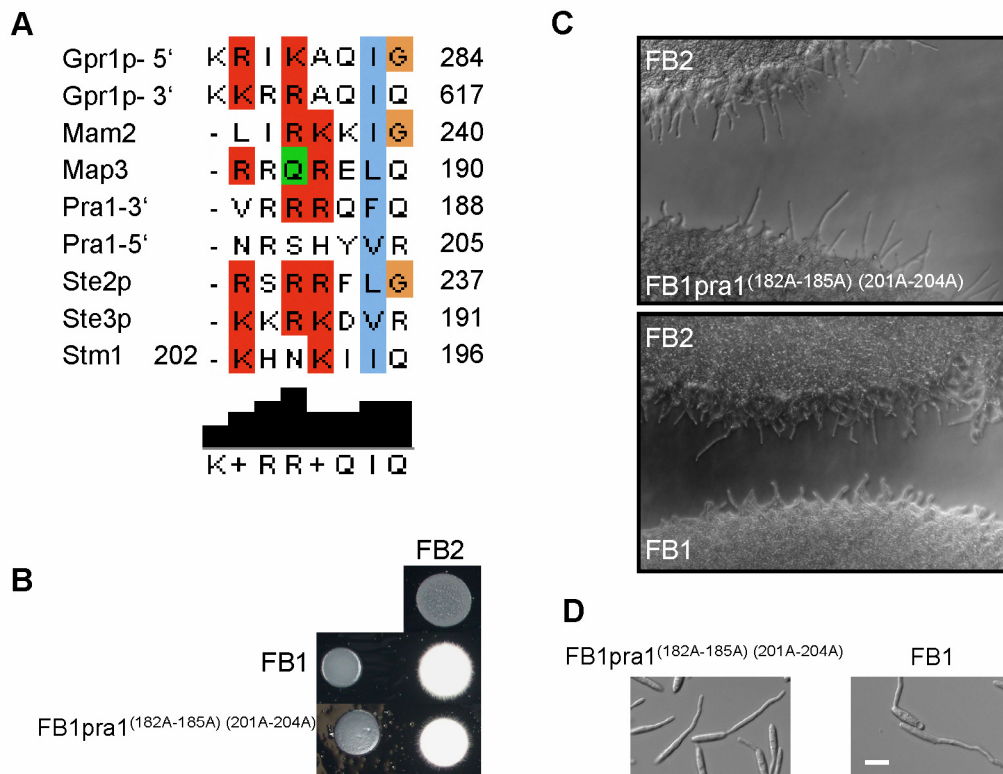


Abbildung 8. Einfluss des Austausches geladener Aminosäuren in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife von Pra1 auf die Pheromonantwort. A) Konsensus-Sequenz und Aminosäurepositionen der GPCR-Bereiche, die für die Interaktion mit G-Proteinen benötigt werden (modifiziert nach Chung et al., 2001): Sequenzen der Pheromonrezeptoren Ste2p und Ste3p von *S. cerevisiae*, Mam2 und Map3 von *S. pombe*, des Zuckerrezeptors Gpr1p von *S. cerevisiae*, des Stickstoffrezeptors Stm1 von *S. pombe* sowie die Sequenzen am Beginn und Ende der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife von Pra1 aus *U. maydis*. B) Paarungskompetenz auf aktivkohlehaltigen Platten im Vergleich zur Paarung zweier Wildtypstämme. C) Die angegebenen Stämme wurden in geringem Abstand voneinander (hier 312 µm obere Abb. und 252 µm untere Abb.) auf Wasseragar getropft und mit einem Tropfen Parafinöl überschichtet. Durch das sekretierte Pheromon des kompatiblen Partnerstammes wurde die Konjugationshyphenbildung induziert. D) Konjugationshyphen nach 5 h Stimulation mit synthetischem α 2-Pheromon. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

2.2 Untersuchungen zur direkten Interaktion des Pheromonrezeptors Pra1 mit den G α -Untereinheiten

2.2.1 *In vitro*-Synthese der G α -Untereinheiten und Isolation des Pheromonrezeptors aus *U. maydis*

Zur Untersuchung der direkten Interaktion zwischen dem Pheromonrezeptor und den vier G α -Untereinheiten von *U. maydis* in einem definierten, zellfreien System sollten diese Proteine *in vitro* synthetisiert und für eine Ko-Immunopräzipitation eingesetzt werden. Mit diesem biochemischen Ansatz konnte die Interaktion des Siebentransmembranrezeptors GCR1 aus *Arabidopsis thaliana* mit deren einziger G α -Untereinheit GPA1 demonstriert werden (Pandey & Assmann, 2004). Im ersten Schritt sollte die Bindungsfähigkeit des Pheromonrezeptors Pra2 mit den vier G α -Untereinheiten *gpa1-gpa4*, welche N-terminal an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert sind, jeweils einzeln getestet werden. Anschließend sollte der gebundene Proteinkomplex mit dem GAD-Antikörper gegen die GAL4-Aktivierungsdomäne präzipitiert werden. Als Positivkontrollen sollten die bekannten Interaktionen zwischen Pra2 und Cam1 (Vranes, 2002) sowie zwischen dem Pheromonrezeptor Ste2p und der G α -Untereinheit Gpa1p aus *S. cerevisiae* (ScGpa1p) dienen.

Es wurden acht verschiedene Konstrukte auf der Basis von existierenden Plasmiden hergestellt: Unter Einfügen passender Restriktionsschnittstellen wurden die oben beschriebenen Gene mittels PCR amplifiziert, GAD an *cam1* fusioniert und alle in den für die *in vitro*-Synthese geeigneten Vektor pCite2a (Novagen) kloniert. Die entsprechenden Plasmide pCite_GAD-*gpa1*, pCite_GAD-*gpa2*, pCite_GAD-*gpa3*, pCite_GAD-*gpa4*, pCite_GAD-*cam1* (cDNA Sequenz), pCite-*pra2* (cDNA Sequenz), pCite_GAD-*Scgpa1* und pCite-*ste2* sind detailliert in Material und Methoden beschrieben. Wesentliche Teile der Konstrukte auf diesen Plasmiden wurden durch Sequenzieren verifiziert. Für die *in vitro*-Transkription und -Translation mit ³⁵S-Methionin wurde der STP3-Synthese-Kit (Novagen) verwendet. Die G α -Untereinheiten wurden damit reproduzierbar in erwarteter Größe synthetisiert und nach Auftrennung über SDS-Page autoradiographisch detektiert (Abb. 9A). Es wurden mehrfach keine Syntheseprodukte für Pra2 (erwartete Größe 38–42 kDA), Ste2p (erwartete Größe 43–49 kDA) und Cam1 (erwartete Größe ~ 34 kDA) erhalten, obwohl das Synthese-Protokoll mehrmals modifiziert wurde. Folgende Modifikationen wurden getestet: i) wiederholte Aufreinigung der Plasmide, um eine RNase Kontamination bei der *in vitro*-Transkription auszuschließen, ii) Verwendung von zwei unabhängig hergestellten, verifizierten *pra2*-kodierenden Plasmiden, iii) Verwendung eines anderen Synthese-Kits

(Promega, TNT T7 Quick), iv) Variation der eingesetzten Plasmidmenge von 0,25–2,0 μg DNA, wodurch auch die Menge an eventuell vorhandenen störenden Salzen variiert wurde, und v) die Verwendung des Plasmids in linearisierter Form (hier wurde ein größeres, wahrscheinlich unspezifisches Produkt von ~ 67 kDa erhalten). Die Obergrenze für die synthetisierbare Proteingröße wurde bei den Rezeptor-kodierenden Sequenzen nicht überschritten, da ein vom Hersteller zur Verfügung gestelltes 119 kDa großes Kontroll-Protein exprimiert werden konnte. Um zu überprüfen, ob von *pra2*-Plasmiden ein Transkript erhalten werden kann, wurden Northern-Blot-Analysen (radioaktiv und nicht-radioaktiv) durchgeführt. Für einen Nachweis im Northern-Blot lag die erhaltene Transkriptmenge von *GAD-gpa1*, von *pra2* und von einem im Kit enthaltenen Kontrollgen jedoch unter der Detektionsgrenze (nicht gezeigt).

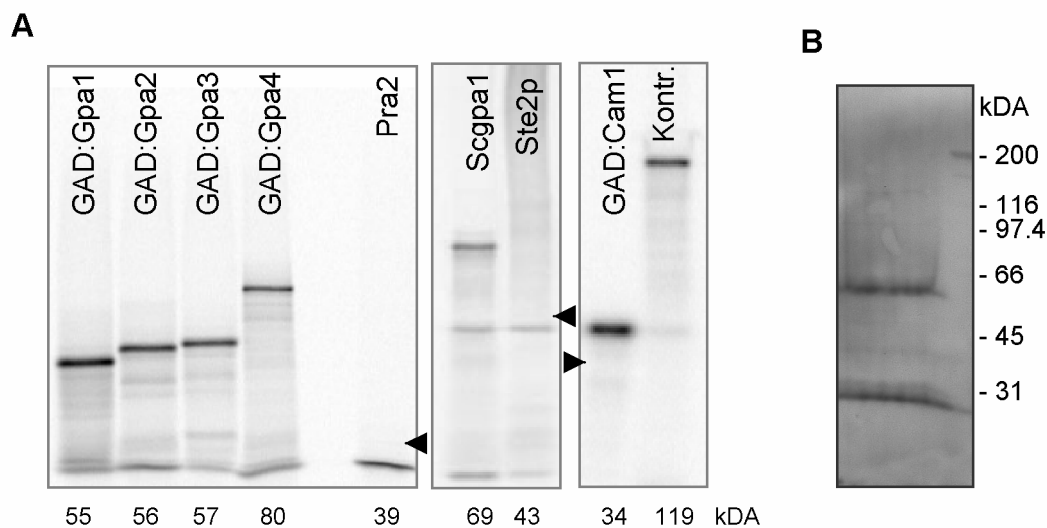


Abbildung 9. *In vitro*-Proteinsynthese mit radioaktiv markiertem Methionin ($\text{M}^{\text{S}35}$) und Nachweis von isoliertem Pra1:gfp aus *U. maydis*-Kultur. A) Autoradiogramme mit den erhaltenen Produkten der *in vitro*-Proteinsynthese. Die erwarteten Größen der Proteine sind unter den Spuren angegeben. Die Pfeile markieren den Bereich der erwarteten Größe für die nicht erhaltenen Proteine Pra2, Ste2p und Cam1, was anhand eines gefärbten Protein-Größenstandards (nicht gezeigt) abgeschätzt wurde. Laut Herstellerangaben ist bei ca. 42 kDa eine unspezifische radioaktiv-markierte Bande zu erwarten, die in ihrer Intensität zunimmt, wenn kein Produkt synthetisiert wird. B) Nachweis von Pra1:gfp bei ~ 62 kDa mit einem monoklonalen Gfp-Antikörper in isolierter Membranfraktion aus pheromonstimulierter *U. maydis*-Kultur.

Da der Pheromonrezeptor nicht *in vitro* synthetisiert werden konnte, wurde Pra1 als Gfp-Fusionsprotein aus je 100 ml Pheromon-stimulierter FB1pra1:gfp-Kultur angereichert. Es wurde eine Membranfraktion durch mehrere Zentrifugationsschritte erhalten, mit dem nicht-ionischen Detergenz DBM (n-dodecyl- β -D-maltoside) solubilisiert und über SDS-PAGE

aufgetrennt. Pra1:gfp konnte mit einem Gfp-Antikörper bei ~ 62 kDA (errechnete Größe ~ 67 kDA) detektiert werden (Abb. 9B). Dabei wurde zusätzlich eine Bande mit etwa 10fach intensiverem Signal bei ~ 26 kDA detektiert, die der Größe von Gfp entspricht. Diese Bande stellt sehr wahrscheinlich degradiertes Fusionsprotein dar. Die Pra1:gfp-Präparationen wurden anschließend für die Immunopräzipitation verwendet (siehe Abb. 10).

2.2.2 Versuch zum Nachweis der Interaktion von Pra1 mit einer $G\alpha$ -Untereinheit mittels Ko-Immunopräzipitation

Da beide zu testenden Protein-Interaktionspartner verschiedene Epitope tragen, konnte die Ko-Immunopräzipitation in zwei verschiedenen Kombinationen durchgeführt werden. Im ersten Ansatz (Abb. 10A) wurde Pra1:gfp an die Festphase (G-Protein-Agarose-Kügelchen) gekoppelt und dessen Bindungsfähigkeit an $G\alpha$ -Untereinheiten getestet. In diesem Ansatz

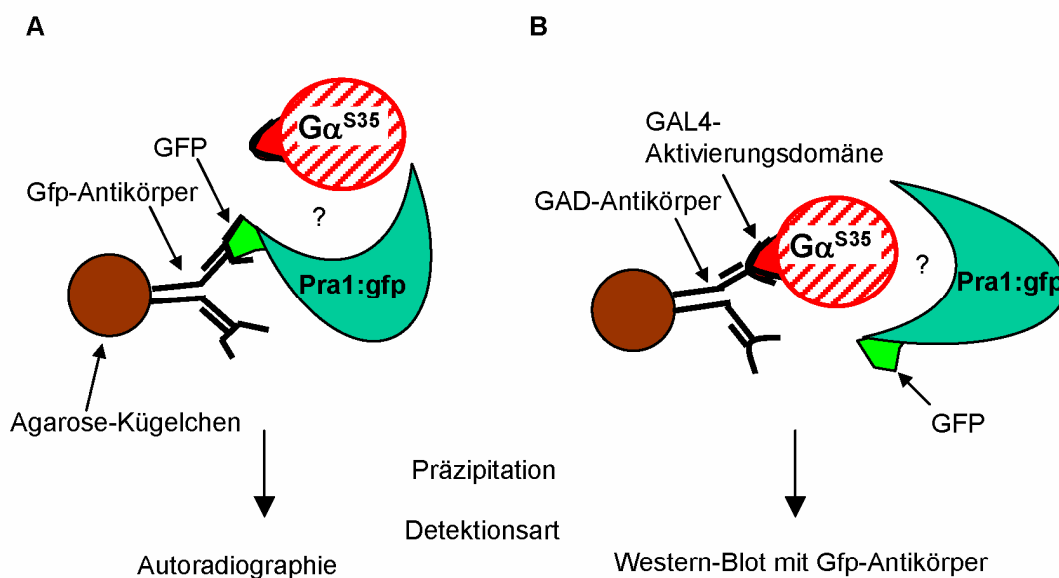


Abbildung 10. Schema der Ko-Immunopräzipitations-Strategien. A) In diesem Ansatz werden Gfp-Antikörper-gekoppelte Agarose-G-Kügelchen mit Pra1:gfp und einer der radioaktiv markierten $G\alpha$ -Untereinheiten gemischt. In der Negativkontrolle wird kein Pra1:gfp zugegeben. Nach Inkubation bei 4°C wird die Festphase durch Zentrifugation präzipitiert und nicht-gebundene Proteine durch Waschschrte entfernt. Die Detektion erfolgt mittels Autoradiographie nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE. B) In diesem Ansatz werden GAD-Antikörper, die kovalent an magnetische Agarose G-Festphase gekoppelt sind, mit den ^{35}S -markierten $G\alpha$ -Untereinheiten und Pra1:gfp gemischt. In der Negativkontrolle werden keine $G\alpha$ -Untereinheiten zugegeben. Nach Inkubation wird die Festphase präzipitiert und nicht-gebundene Proteine entfernt. Die Detektion der über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgt mit einem Gfp-Antikörper im Western-Blot.

zeigten die $G\alpha$ -Untereinheiten eine unspezifische Interaktion mit der Protein-G-Agarose-Festphase, an welche Gfp-Antikörper gekoppelt waren (Abb. 11). Die Erhöhung der Salz- und Detergenzkonzentration sowie die Zugabe von BSA als Kompetitor im Bindepuffer konnte diese unspezifische Interaktion nicht reduzieren (nicht gezeigt). Im zweiten Ansatz (Abb. 10B) zeigte sich in ähnlicher Weise in der Negativkontrolle eine unspezifische Interaktion. Die Negativkontrolle enthielt eine Pra1:gfp-Fraktion und magnetische Protein-G-Agarose-Kügelchen mit chemisch kovalent gekoppelten GAD-Antikörpern. Ohne Zugabe einer $G\alpha$ -Untereinheit konnte mit GAD-Antikörper-gekoppelter Festphase Pra1:gfp und Gfp präzipitiert werden (Abb. 11B). Die Signalintensität der Banden änderte sich auch nach Zugabe der $G\alpha$ -Untereinheiten nicht. Die Erhöhung der Salzkonzentration im Binde- und Waschpuffer bis zu 500 mM NaCl sowie die Verwendung von nicht-ionischem und ionischem Detergenz im Waschpuffer konnten die unspezifische Bindung nicht verhindern (nicht gezeigt). Um die Bindestellen der GAD-Antikörper-gekoppelten Festphase abzusättigen und dadurch möglicherweise unspezifische Bindung zu vermeiden, wurden in einer Vorbehandlung wiederholt *in vitro*-synthetisierte $G\alpha$ -Untereinheiten zugegeben. Dazu wurden zweimal ^{35}S -markierte und einmal nicht-radioaktiv markierte $G\alpha$ -Untereinheiten verwendet. Durch diese Vorbehandlung konnte jedoch weder die unspezifische Bindung verhindert werden noch war eine Veränderung in der Bindungsstärke zu sehen (nicht gezeigt). In diesem Experiment wurde neben Pra1:gfp auch Gfp in einem ähnlichen Verhältnis wie es in den Pra1:gfp-Präparationen vorhanden ist, präzipitiert. Daher könnte die unspezifische Interaktion durch die Verwendung von GAD-Antikörpern in Kombination mit dem Gfp-Epitop verursacht worden sein.

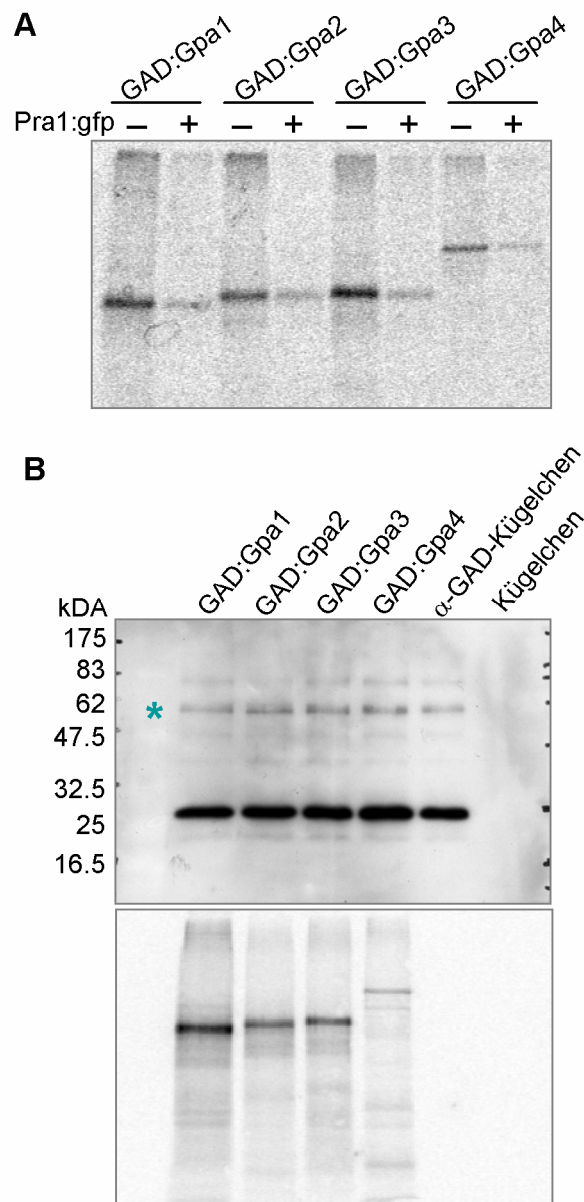


Abbildung 11. Unspezifische Interaktion der Bindepartner in den Ko-Immunopräzipitations-Ansätzen. A) Autoradiographischer Nachweis der über SDS-PAGE separierten radioaktiv-markierten $G\alpha$ -Untereinheiten nach der Präzipitation mit Gfp-Antikörpern und G-Agarose-Kügelchen. Die Ko-Immunopräzipitation wurde in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Pra1:gfp durchgeführt. In den Negativkontrollen ohne Pra1:gfp wurde die doppelte Menge an $G\alpha$ -Untereinheiten eingesetzt, weshalb hier ein stärkeres Signal zu beobachten war. B) Nachweis von Pra1:gfp bei ~ 62 kDA (*) mit einem Gfp-Antikörper im Western-Blot nach Auftrennung der immunpräzipitierten Komplexe über SDS-PAGE (obere Abb.). Pra1:gfp wurde entweder einzeln mit den $G\alpha$ -Untereinheiten, mit den GAD-Antikörpern gekoppelten Agarose-Kügelchen oder nur mit den Agarose-Kügelchen gemischt und immunopräzipitiert. Das Signal bei ~26 kDA entspricht der Größe von Gfp. Zur internen Kontrolle wurde der Western-Blot der oberen Abb. auf einem Phosphorimager exponiert (untere Abb.).

2.2.3 Test auf Interaktion von Pra1 und Gpa3 *in vivo* mit dem Split-Gfp-System

Zum Nachweis der vermuteten Interaktion des Pheromonrezeptors Pra1 mit der α -Untereinheit Gpa3 während der Pheromonantwort in *U. maydis* wurde das Split-Gfp-System (BiFC für *Bimolecular Fluorescence Complementation*) getestet. Dabei wurde das Reporterprotein Gfp in eine C-terminale und eine N-terminale nicht-fluoreszierende Hälfte geteilt und mit je einem putativen Interaktionspartner fusioniert. Interagieren die beiden Test-Proteine *in vivo* können die beiden Gfp-Hälften wieder ein funktionelles Gfp herstellen und die Fluoreszenz kann mit dem Mikroskop verfolgt werden.

Dafür wurde im Plasmid pPra1:gfp das Gfp-Gen gegen den für die N-terminale Gfp-Hälfte kodierenden Bereich ausgetauscht (die Split-Gfp-Plasmide wurden freundlicherweise von Christoph Basse zur Verfügung gestellt) und in den *pra1*-Locus des Stammes FB1 integriert. Die Integration wurde im Southern-Blot bestätigt (nicht gezeigt). Anschließend wurde in den *ip*-Locus (Loubradou et al., 2001) des Stammes FB1pra1:gfp-Nt das Konstrukt $P_{crg1}:gpa3:gfp-Ct$ integriert. Das *gpa3*-Gen ist hier an die C-terminale Gfp-Hälfte fusioniert und steht unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg1*-Promotors (Bottin et al., 1996). Die erhaltenen Stämme FB1pra1:gfp-Nt $ip[P_{crg1}:gpa3:gfp-Ct]$ wurden auf die korrekte Integration und die Anzahl der integrierten Kopien dieses Konstruktes mittels Southern-Blot-Analyse überprüft. Für die Analyse wurden FB1pra1:gfp-Nt-Stämme mit einer Einfach- (DG118 und DG119) oder Mehrfachintegration (DG115) von $P_{crg1}:gpa3:gfp-Ct$ verwendet. Diese Stämme wurden vor der Pheromonstimulation für eine Stunde in Arabinose-haltigem Medium kultiviert um die Expression von Gpa3:gfp-Ct zu induzieren. Nach Zugabe von $\alpha 2$ -Pheromon wurden über einen Zeitraum von 2 h in 10-minütigen Zeitintervallen Proben genommen und mikroskopiert. Zu keinem der Zeitpunkte war eine den basalen Fluoreszenzhintergrund übersteigende Gfp-Fluoreszenz sichtbar (nicht gezeigt). Nach 3,5 h begannen die Zellen mit dem Auswachsen von Konjugationshyphen, die nach 4 h deutlich entwickelt waren. Dies lässt darauf schließen, dass die Rezeptorfusion funktionell war. In diesem Experiment konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass das Gpa3-Gfp-Fusionsprotein funktionell ist, da in diesen Stämmen neben dem eingebrachten *gpa3:gfp-Ct* noch das endogene *gpa3*-Gen vorhanden war.

2.3 Charakterisierung der G-Proteine in *U. maydis*

2.3.1 Untersuchungen zur Redundanz der G α -Untereinheiten Gpa1–Gpa4

Es wird vermutet, dass Stämme, die Einzeldelationen der Gene für die G α -Untereinheiten *gpa1*, *gpa2*, *gpa4* tragen, keinen Phänotyp zeigen, weil sich diese möglicherweise funktionell ersetzen. Diese Arbeitshypothese wurde im Folgenden durch die Expression einer dominant negativen oder konstitutiv aktiven Version von Gpa1 sowie durch die Analyse von Mehrfachdeletionsmutanten in den G α -Untereinheiten getestet.

2.3.1.1 Test von Gpa1 auf funktionelle Redundanz

Gpa1 ist die einzige G α -Untereinheit, deren Expression nach Pheromonstimulation transient induziert wird (H. Eichhorn, persönl. Mitteilung) und könnte daher eine Funktion in der Pheromonantwort ausüben. Um darauf zu testen, wurde *gpa1* durch das *gpa1*^{G203A}-Allel ersetzt, welches für ein nicht-funktionelles Gpa1-Protein kodieren sollte. Dafür wurde in Gpa1 ein Glycin²⁰³ in der hochkonservierten GTPase-Domäne gegen ein Alanin durch zielgerichtete Mutagenese ausgetauscht. Die entsprechende Mutation in anderen G α -Untereinheiten verhindert die strukturelle Änderung im Protein, die durch GTP-Bindung induziert wird und für die Signalweiterleitung essentiell ist (Abb. 12A) (Miller et al., 1988; Kurjan et al., 1991). Zusätzlich wurde das Allel *gpa1*^{Q204L} durch den Austausch von Glutamin²⁰⁴ gegen Leucin in der GTPase-Domäne hergestellt. Der entsprechende Austausch führt in G α -Untereinheiten anderer Organismen zur konstitutiven Aktivität des Proteins. Die Gene *gpa1*^{wt} (Wildtyp-Version), *gpa1*^{G203A} oder *gpa1*^{Q204L} wurden C-terminal an einen Bereich fusioniert, der für ein 3×HA-Epitop kodiert und in den natürlichen *gpa1*-Locus von FB1- und FB2-Wildtypstämmen eingebracht (Abb. 12A). Die Aminosäuresubstitutionen wurden durch Sequenzieren des entsprechenden genomischen Sequenzabschnitts verifiziert. Die vergleichbare Expression aller drei Proteine wurde im Western-Blot mit HA-Antikörpern gezeigt (Abb. 12B). Zugleich konnte die erwartete Membran-Assoziation durch Trennung der löslichen Proteinfraction von der Membranfraction gezeigt werden. In Paarungstests waren alle Stämme (FB1*gpa1*^{wt}, FB2*gpa1*^{wt}, FB1*gpa1*^{GA}, FB2*gpa1*^{GA}, FB1*gpa1*^{QL}, FB2*gpa1*^{QL}) in der Lage mit kompatiblen Wildtyp- und Mutantenstämmen zu fusionieren und dikaryotisches Myzel auszubilden (Abb. 12C). Nach Stimulation mit synthetischem Pheromon war der Anteil der Zellen, die Konjugationshyphen bildeten, in allen Stämmen etwa gleich hoch (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass Gpa1 die Pheromonantwort nicht beeinflusst.

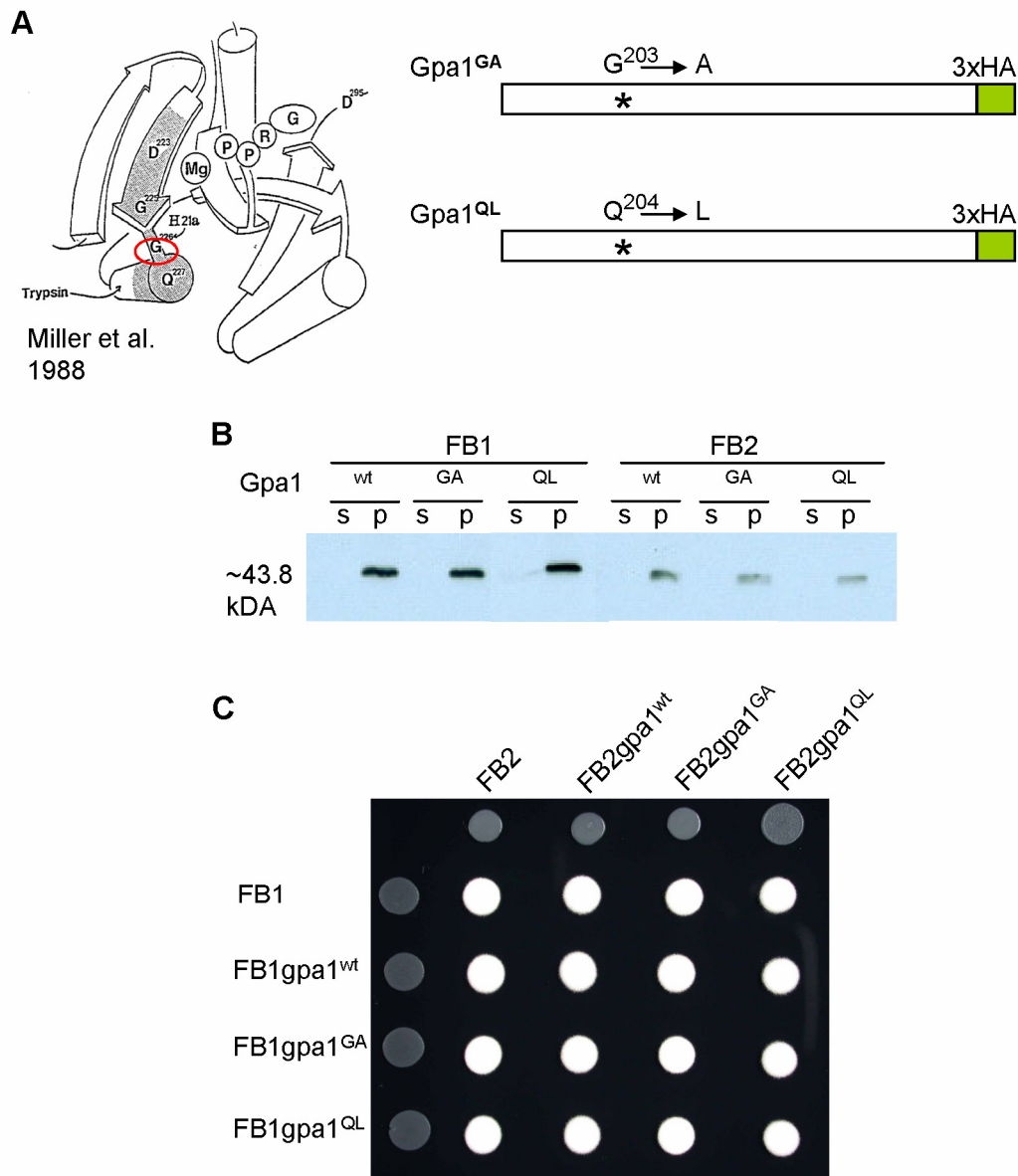


Abbildung 12. Charakterisierung von Stämmen, die das *gpa1*^{GA}- oder *gpa1*^{QL}-Allel exprimieren. A) Schematische Darstellung der räumlichen Anordnung der ausgetauschten Aminosäuren in der sogenannten „hinge region“ (Miller et al., 1988) (roter Kreis) und Schema der *gpa1*^{G203A}- und *gpa1*^{Q204L}-Allele. B) Nachweis der gleichmäßigen Expression und Lokalisation in der Membranfraktion (p) von Gpa1^{G203A} und Gpa1^{Q204L} im Western-Blot mit einem HA-Antikörper. Die Membranfraktion (p) wurde durch einstündige Zentrifugation des Gesamtprotein-Extrakts erhalten. In der löslichen Proteinfraction (s) konnte kein Gpa1 detektiert werden. Pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein geladen. C) Paarungskompetenz in Gpa1^{G203A} und Gpa1^{Q204L} exprimierenden Stämmen im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen.

Um festzustellen, ob Gpa1 eine Funktion nach der Pheromonsignalweiterleitung in der Pathogenität von *U. maydis* ausübt, wurden kompatible Stämme der jeweiligen Gpa1-Versionen in Maispflanzen injiziert und die Tumorbildung quantifiziert. Nach 14 Tagen hatten alle Stammkombinationen Tumore in ähnlicher Häufigkeit verursacht (Tab. 3). In den

meisten Tumoren wurden reife Sporen gebildet (Abb. 13). Somit konnte Gpa1 keine offensichtliche Funktion in der Pheromonsignalweiterleitung oder Pathogenität zugeschrieben werden.

Tabelle 3. Quantifizierung der Pathogenität anhand der gebildeten Tumore 14 Tage nach Infektion mit den angegebenen Stammkombinationen.

Stämme	infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumorbildung in %
FB1 × FB2	75	83
FB1gpa1 ^{GA} × FB2gpa1 ^{GA}	73	88
FB1gpa1 ^{QL} × FB2gpa1 ^{QL}	73	81

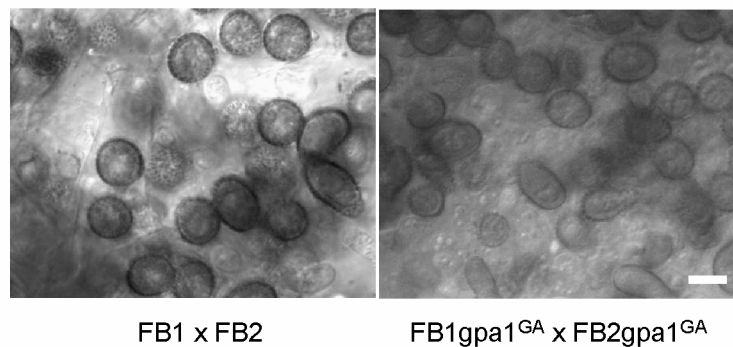


Abbildung 13. Sporenbildung in Tumoren von kompatiblen Kreuzungen der Stämme FB1 × FB2 und FB1gpa1^{GA} × FB2gpa1^{GA} 14 Tage nach Infektion. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

2.3.1.2 Phänotypische Analyse von *U. maydis*-Stämmen mit Deletion in *gpa1*, *gpa2* und *gpa4*

Für die Beantwortung der Frage ob sich Gpa1, Gpa2 und Gpa4 funktionell ersetzen und deshalb kein Phänotyp in Einzelmutanten beobachtet werden konnte, wurden Stämme hergestellt, die Deletionen in allen drei Gα-Untereinheiten aufweisen (schematisch dargestellt in Abb. 14A). Maispflanzen wurden dafür mit kompatiblen Mischungen bereits vorhandener Gα-Deletionsstämmen infiziert. Die gesuchten Dreifachmutanten wurden dann unter den Nachkommen der gekreuzten Stämme identifiziert. Für die Infektion wurden kompatible Kombinationen des Hygromycin-resistenten Stammes FB1Δ*gpa4* bzw. FB2Δ*gpa4* (Spellig, 1996) mit der FB1Δ*gpa1*Δ*gpa2* bzw. FB2Δ*gpa1*Δ*gpa2*-Doppelmutante, die Hygromycin- und Phleomycin-resistent ist (H. Teunissen, unveröffentlicht), verwendet. Nach 11 Tagen wurden bei beiden Kombinationen Pflanzentumore mit reifen Sporen

geerntet und nach Trocknen auf PD-Platten zum Keimen gebracht. Die aus den Sporen hervorgegangenen Sporidien wurden auf Hygromycin- und Phleomycin-Festmedien vereinzelte. Da in den beiden mutierten Allelen *gpa1* und *gpa4* die GTPase-Domäne durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt ist (Regenfelder et al., 1997), wurde mittels diagnostischer PCR das Vorhandensein beider mutierter Allele überprüft (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde das Fehlen von *gpa2* mittels diagnostischer PCR überprüft (nicht gezeigt). Aus 100 getesteten Einzelkolonien hatten 10 Stämme eine Dreifachmutation in *gpa1*, *gpa2* und *gpa4*, wie mittels Southern-Analyse verifiziert werden konnte (Abb. 14B). Hierfür wurde eine Dig-markierte Sonde, die den Bereich der Hygromycin-Resistenzkassette sowie 56 bp links und 45 bp rechts davon gelegene *gpa4*-Wildtypsequenz umfasst, verwendet. Die Sequenz der Hygromycin-Resistenzkassette auf dieser Sonde hybridisiert mit den entsprechenden Bereichen in $\Delta gpa1$ und $\Delta gpa4$. Zusätzlich wird auf diesem Southern-Blot auch $\Delta gpa2$ detektiert, da die Sequenz der Hygromycin-Resistenz mit der Phleomycin-Resistenzkassette kreuz-hybridisiert.

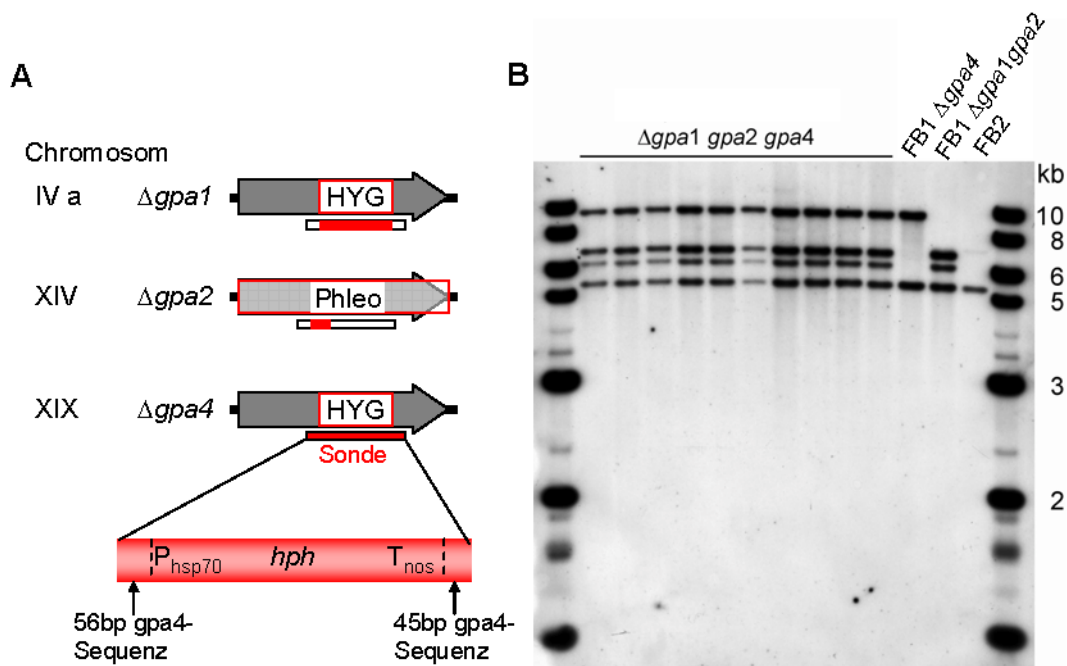


Abbildung 14. Herstellung der *gpa1 gpa2 gpa4*-Dreifachdeletionsmutanten. A) Deletierte Bereiche (roter Kasten) in den einzelnen $G\alpha$ -Untereinheiten, die auf verschiedenen Chromosomen liegen. In $\Delta gpa1$ wurden 0,1 kb und in $\Delta gpa4$ 0,6 kb des offenen Leserahmens deletiert und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt (Regenfelder et al., 1997). Der gesamte offene Leserahmen von *gpa2* wurde durch eine Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt (H. Teunissen, unveröffentlicht). In rot sind die hybridisierenden Bereiche der in B) verwendeten Sonde angegeben. B) Verifizierung der Dreifachdeletionsmutanten im Southern-Blot. Erwartete Bandengrößen nach Restriktion mit *Eco47III*: $\Delta gpa1$ 6340 bp, $\Delta gpa2$ 6051 bp, $\Delta gpa4$ 8987 bp, *gpa4* 6884 bp, *hsp70*-Promotor 5286 bp.

Die Bestimmung des Genotyps der erhaltenen Dreifachdeletionsmutanten erfolgte durch Kreuzung mit Teststämmen (siehe Material und Methoden) und lieferte eine annähernd gleichmäßige Verteilung der Genotypen. Es wurden je drei Stämme der Genotypen *a1 b1*, *a2 b2*, *a2 b1* und ein Stamm des Genotyps *a1 b2* erhalten. Für weitere Versuche wurden Dreifachdeletionsmutanten des *a1 b1* Genotyps mit der Stammbezeichnung DG82, DG84, DG99 und des *a2 b2* Genotyps mit der Stammbezeichnung DG86, DG93, DG95 verwendet.

Bei der phänotypischen Charakterisierung der Stämme DG82, DG84, DG99 (*a1 b1*) und DG86, DG93, DG95 (*a2 b2*) zeigten sich keine von Wildtypstämmen abweichenden Auffälligkeiten in Bezug auf Zellgröße oder -form, Koloniegröße oder -form und Wachstumsgeschwindigkeit (nicht gezeigt). Diese Stämme wurden in YEPS_L-oder CM-Glucose-Flüssigmedium und auf PD-Festmedium kultiviert. Nach Stimulation mit synthetischem Pheromon reagierten die Zellen mit der Bildung von Konjugationshyphen (Abb. 15B). Übereinstimmend damit verhielten sich im Paarungstest kompatible Kreuzungen der Dreifachdeletionsmutanten vergleichbar zu Kreuzungen der Wildtypstämme (Abb. 15A).

Da kein Einfluss von Gpa1, Gpa2 und Gpa4 auf die Pheromonantwort sowie die Zellfusion erkennbar war, wurde die pathogene Entwicklung der Dreifachdeletionsmutanten in der Wirtspflanze auf mögliche Beeinträchtigung hin untersucht. Sowohl in der ersten Phase der pathogenen Entwicklung, der Appressorienbildung und Penetration des Maisblattes, sowie später in der Proliferation unterschieden sich die Dreifachdeletionsmutanten nicht vom Wildtyp (Abb. 16A–B). Die Anzahl und Größe der gebildeten Tumore war nach Infektion mit kompatiblen Dreifachdeletionsmutanten vergleichbar zu Wildtyp-infizierten Pflanzen (Tab. 4). Die mikroskopische Überprüfung der Tumore auf Sporenbildung ergab einen geringeren Anteil sporentragender Tumore in der Dreifachdeletionsmutante (Tab. 4). In einer zweiten Pflanzeninfektion wurde eine ähnliche Reduktion sporentragender Tumore beobachtet (keine mikroskopische Quantifizierung). Die geernteten Sporen der Dreifachdeletionsmutante waren jedoch keimungsfähig und die aus ihnen hervorgegangenen Sporidien zeigten eine wildtypartige Zellform (Abb. 16C–D). Somit konnten *U. maydis*-Stämme ohne die Funktion der Gpa1, Gpa2 und Gpa4 $G\alpha$ -Untereinheiten den gesamten Lebenszyklus durchlaufen und zeigten neben der reduzierten Sporenbildung keine weiteren offensichtlichen phänotypischen Besonderheiten.

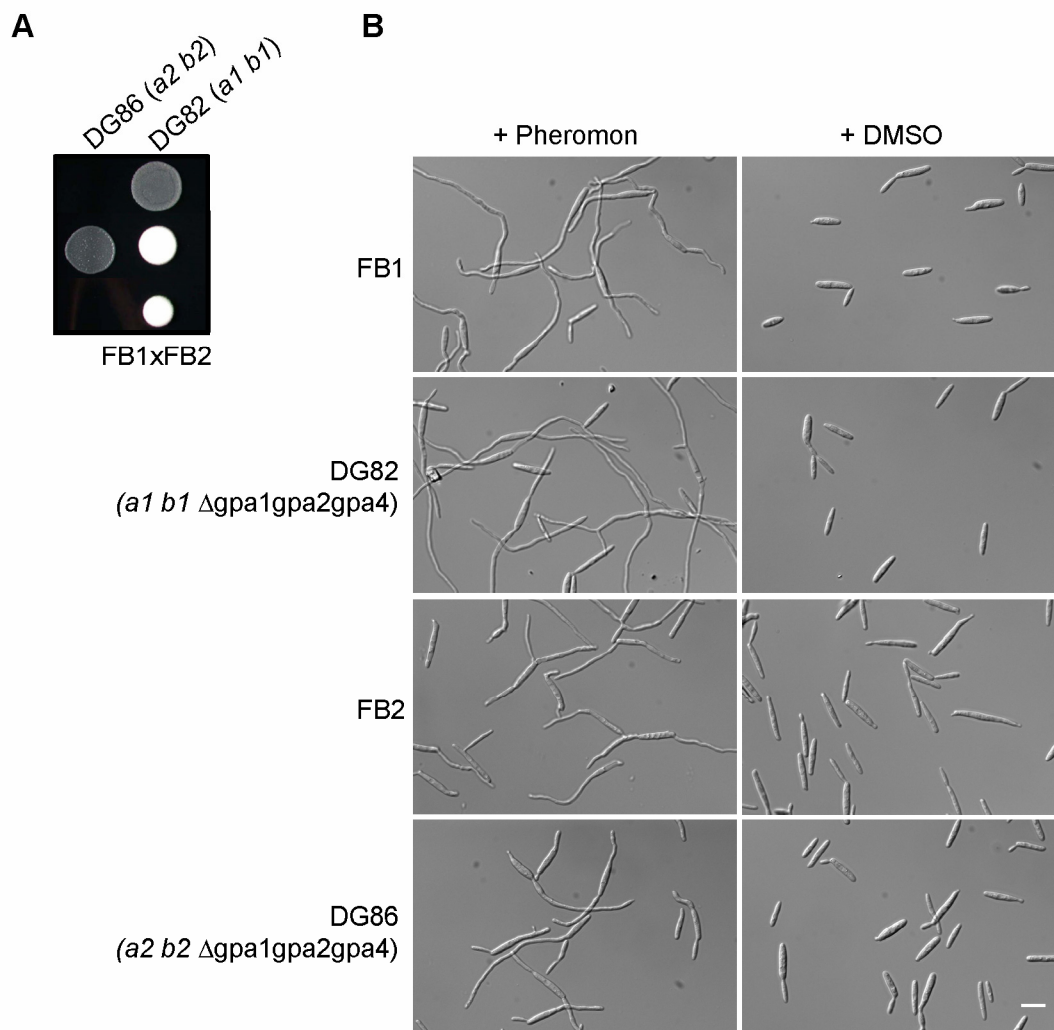


Abbildung 15. Charakterisierung der Dreifachdeletionsmutanten bezüglich Pheromonwahrnehmung und Zellfusion. A) Paarungstest auf aktivkohlehaltigem PD-Festagar. Die Fusion kompatibler Stämme ist an der Ausbildung eines weißes Myzels erkennbar. B) Konjugationshyphenbildung nach Stimulation mit synthetischem Pheromon. Im Kontrollexperiment wurde nur das Lösungsmittel DMSO in gleicher Konzentration zugegeben. Der Größenstandard entspricht 10 μ m.

Tabelle 4. Pathogenität von *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutanten.

verwendete Stammkombinationen	Infizierte Pflanzen	Anteil der Pflanzen mit Tumor in %	Anteil der Tumore mit Sporen in %
FB1 \times FB2	41	95	63
DG99 (<i>a1 b1</i> Δ <i>gpa1gpa2gpa4</i>) \times DG86 (<i>a2 b2</i> Δ <i>gpa1gpa2gpa4</i>)	52	94	29

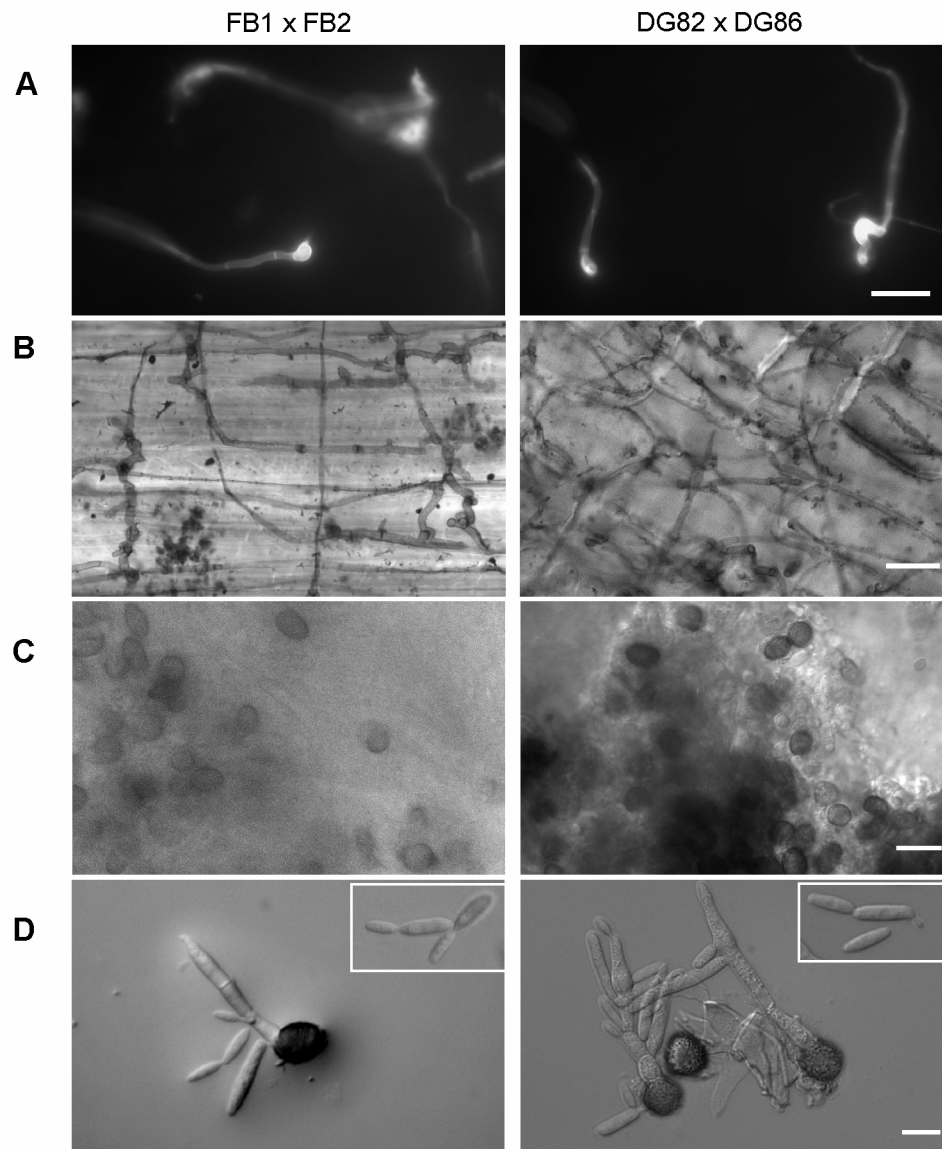


Abbildung 16. Vergleich der *gpa1 gpa2 gpa4*-Dreifachdeletionsmutante mit Wildtypstämmen während der pathogenen Lebensphase. A) Appressorienbildung auf der Blattoberfläche zwei Tage nach der Maisinfektion. Es wurde jeweils das dritte Blatt des Maiskeimlings geerntet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcuofluor angefärbte Pilzhyphen mittels Epifluoreszenzmikroskopie visualisiert. Der Größenstandard entspricht 50 μm . B) Lichtmikroskopische Aufnahmen proliferierender Pilzhyphen im Maisblatt fünf Tage nach Infektion. Die Pilzhyphen wurden dafür mit dem Farbstoff Chlorazol Black E angefärbt. Der Größenstandard entspricht 50 μm . C) Lichtmikroskopische Aufnahmen reifer Sporen im Tumorgewebe 25 Tage nach Infektion. Der Größenstandard entspricht 20 μm . D) Keimung geernteter Sporen auf PD-Agar nach einem Tag Inkubation bei 22°C. Die Bildausschnitte zeigen einzelne Sporidien. Der Größenstandard entspricht 10 μm .

2.3.1.3 Phänotypische Charakterisierung von *U. maydis*-Stämmen ohne funktionelle G α -Untereinheiten

Eine weitere Möglichkeit einer redundanten Funktion zwischen Gpa1, Gpa2, Gpa4 und Gpa3 besteht darin, dass Gpa3 teilweise durch eine der anderen G α -Untereinheiten funktionell ersetzt werden könnte. Würde dies der Fall sein, so sollte eine Deletionsmutante ohne G α -Untereinheiten unterschiedliche und vermutlich stärkere phänotypische Defekte als die *gpa3*-Einzeldelentionsmutante zeigen. Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurden $\Delta gpa1-4$ -Deletionsstämme (G α -Nullmutanten) hergestellt und auf phänotypische Defekte der *gpa3*-Deletionsmutante getestet.

Zur Herstellung von G α -Nullmutanten wurde in den Dreifachdeletionsmutanten DG99 (*a1 b1*) und DG86 (*a2 b2*) der gesamte offene Leserahmen von *gpa3* durch eine NAT-Resistenzkassette ersetzt. Parallel dazu wurde der Stamm FB1 $\Delta gpa3$ mit der Bezeichnung DG74 hergestellt. Um die Entstehung von Suppressormutationen zu vermeiden wurde bei der Herstellung und weiteren Kultivierung dieser Stämme Medium verwendet, das mit 6 mM cAMP versetzt war. Entsprechende Transformanden wurden mittels Southern-Analyse identifiziert (Abb. 17A). Die Deletionen in den restlichen G α -Untereinheiten wurde durch diagnostische PCR bestätigt (nicht gezeigt). Die erhaltenen *gpa1-gpa4*-Deletionsstämme mit den Stammbezeichnungen DG60, DG61 (*a1 b1*) und DG67, DG69 (*a2 b2*) wiesen typische Charakteristika von *gpa3*-Deletionsmutanten auf: verlangsamtes Wachstum, morphologisch aberrante Zellen (teils filamentös-verlängertes, teils hefeartiges Wachstum), Bildung von Zellaggregaten in Flüssigmedium sowie filamentöses Wachstum und eine kleine Koloniengröße auf Festmedium (Abb. 17B). Ähnlich zu *gpa3*-Deletionsmutanten war es möglich das filamentöse Wachstum auf Festagar durch externe cAMP-Zugabe zu revertieren (Abb. 17C).

Bezüglich der Pheromonantwort verhielten sich die Zellen der G α -Nullmutante wie Zellen der *gpa3*-Deletionsmutante. Nach Pheromonstimulation konnte keine Bildung von Konjugationshyphen beobachtet werden. Wurde 6 mM cAMP während der Pheromonstimulation zugegeben, bildeten 17% der Zellen Konjugationshyphen (Abb. 18). Auf aktivkohlehaltigen Platten, die mit 6 mM cAMP versetzt waren, wurde anschließend die Paarungskompetenz der Deletionsmutanten untersucht. Unter diesen Bedingungen wird das filamentöse Wachstum von haploiden Zellen der *gpa3*-Deletionsstämme unterdrückt und ermöglicht so die Unterscheidung zu dem dikaroytischen, weißlichen Myzel, das aus der Fusion zweier Sporidien hervorgeht.

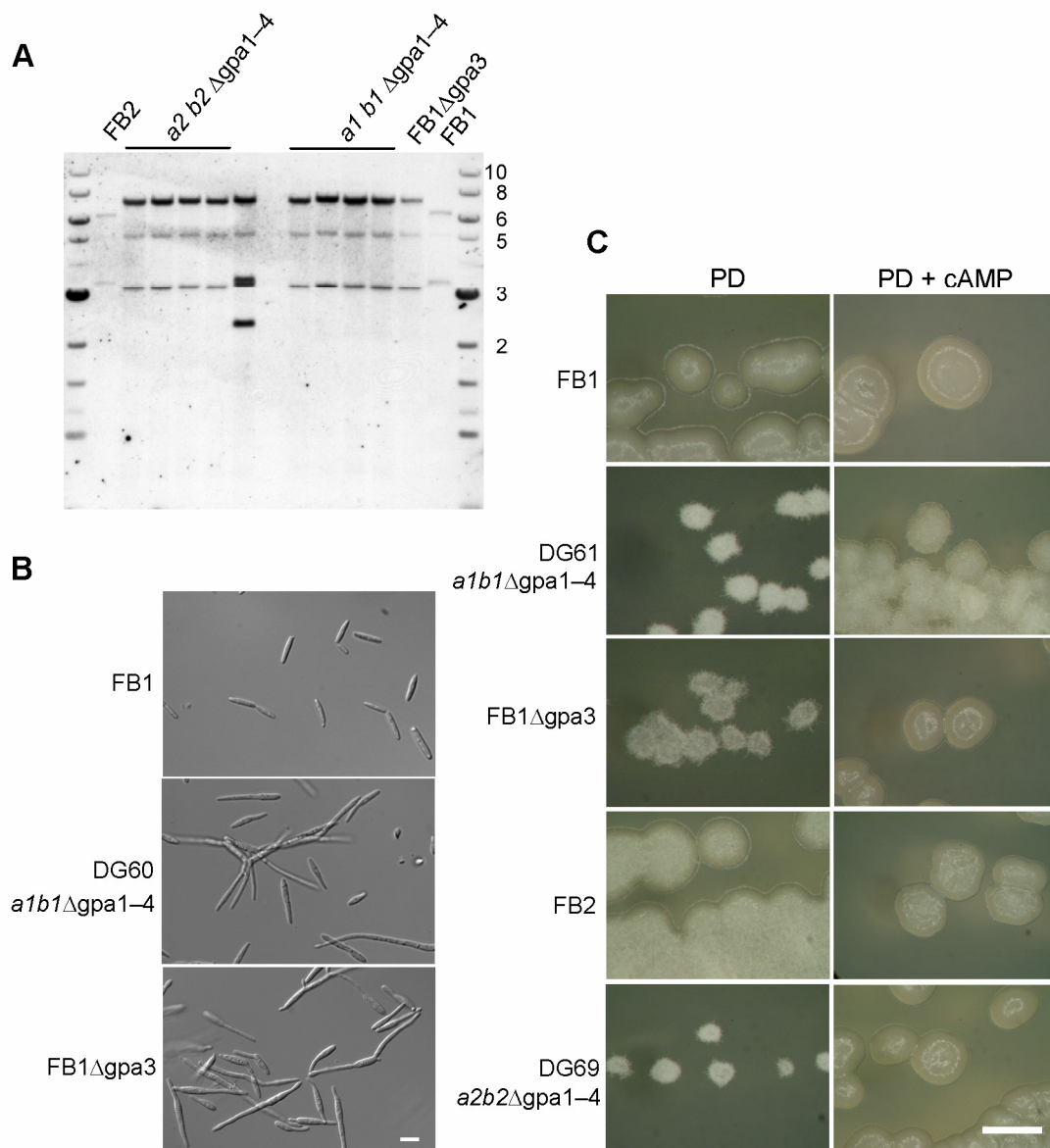


Abbildung 17. Phänotypische Charakterisierung der $G\alpha$ -Nullmutanten. A) Southern-Analyse zur Verifikation der *gpa3*-Deletion in $G\alpha$ -Nullmutanten. Erwartete Bandengrößen nach Restriktion mit *Bam*H I und *Acl* I: 7,2 kb, 3,1 kb und 5,1 kb aufgrund der Hybridisierung der Promotorsequenz der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase auf der NAT-Resistenzkassette mit dem endogenen Promotor. Im Wildtypstamm wurden 6,3 kb und 3,3 kb erwartet. B) Zellmorphologie der $G\alpha$ -Nullmutante in CM-Flüssigkultur im Vergleich zu einer *gpa3*-Deletionsmutante und einem Wildtypstamm. Der Größenstandard entspricht 10 μ m. C) Kolonienmorphologie der $G\alpha$ -Nullmutanten auf PD-Festagar +/- 6 mM cAMP. Der Größenstandard entspricht 500 μ m und bezieht sich auf alle Bilder.

Somit war die Ausbildung des dikaryotischen Myzels in Kreuzungen der $G\alpha$ -Nullmutanten bei cAMP-Zugabe nachweisbar (Abb. 19). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei ausreichend vorhandenem cAMP, keine $G\alpha$ -Untereinheit für die direkte Weiterleitung des Pheromonsignals und die Zellfusion benötigt wird. Dies schließt jedoch nicht aus, dass in

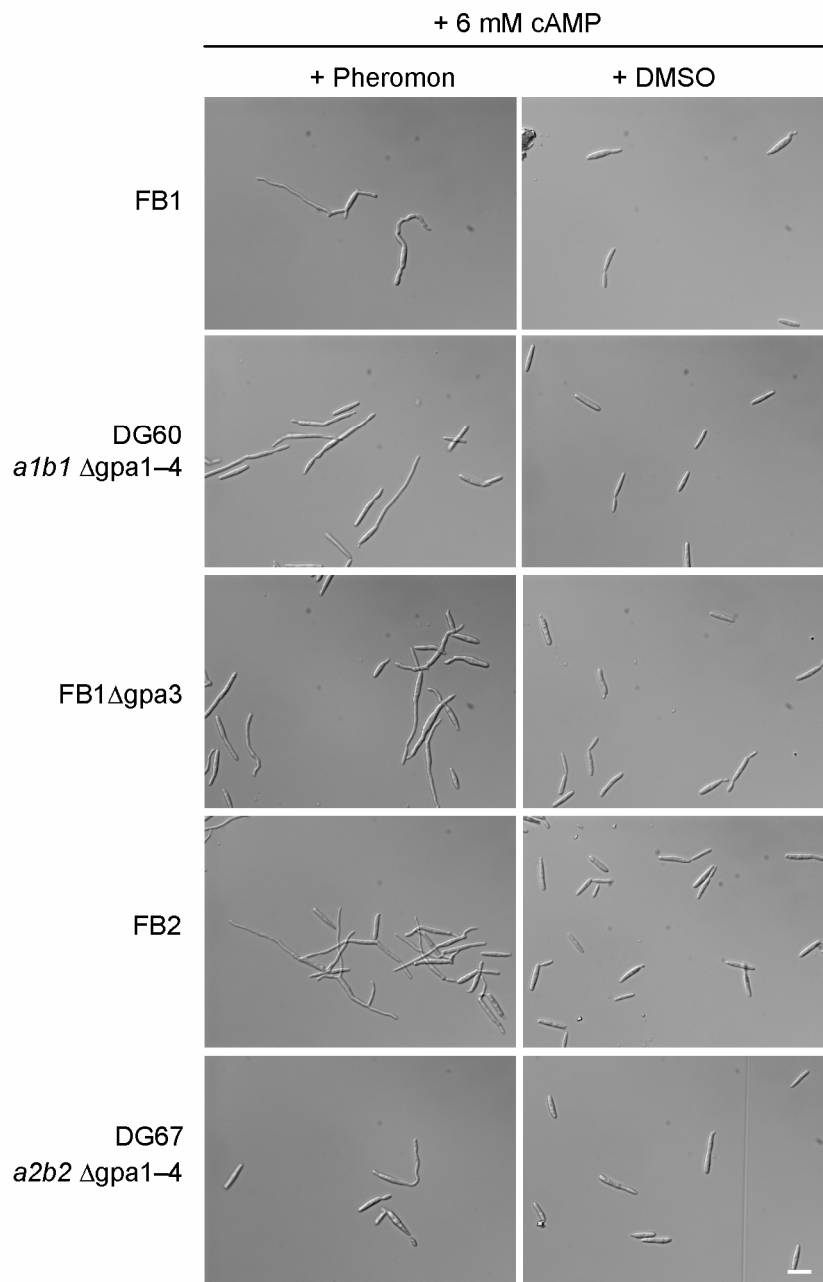


Abbildung 18. Pheromonstimulation in Anwesenheit von 6 mM cAMP ermöglicht die Bildung von Konjugationshyphen in $G\alpha$ -Nullmutanten. Als Kontrolle wurden die Zellen in cAMP-haltigem CM-Medium mit dem Lösungsmittel DMSO in gleicher Konzentration inkubiert. Der Größenstandard entspricht 10 μ m und gilt für alle Bilder.

Wildtyp-Zellen Gpa3 aktiv an diesem Prozess beteiligt ist, indem es den cAMP-Signalweg aktiviert. Kompatible Kreuzungen von *gpa3*-Deletionsmutanten sind apathogen (Enders, 1998), was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Infektion von 43 Pflanzen). Erwartungsgemäß verursachten auch kompatible Kreuzungen der $G\alpha$ -Nullmutanten keine

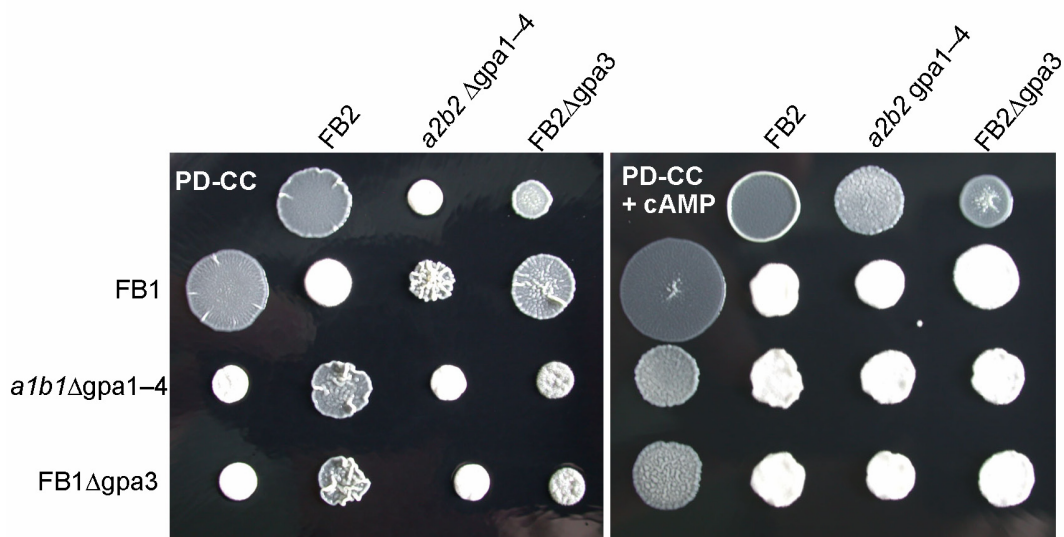


Abbildung 19. Nachweis der Paarungskompetenz auf aktivkohlehaltigem PD-Festagar +/- 6 mM cAMP nach zwei Tagen Inkubation bei 22°C

Tumorbildung in Mais (Infektion von 51 Pflanzen). Da auch ein solopathogener SG200Δgpa3-Stamm apathogen ist, sind vermutlich neben der Zellfusion noch weitere für die Infektion benötigten Funktionen defekt (Enders, 1998). Um zu untersuchen inwieweit diese Defekte während der frühen Stadien der pathogenen Entwicklung durch Zugabe von cAMP revertierbar sind, wurden $G\alpha$ -Nullmutanten und *gpa3*-Deletionsmutanten mit oder ohne cAMP-Zugabe in Maispflanzen injiziert. Dafür wurden alle für die Infektion benutzten Stämme in YEPS₁-Medium mit 6 mM cAMP bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8–1,0 vorkultiviert und in Wasser mit oder ohne 6 mM cAMP aufgenommen. Die auf eine OD = 1 eingestellten Zellsuspensionen wurden dann in Maiskeimlinge injiziert. Nach 1–2 Tagen konnte in der Infektion mit $G\alpha$ -Nullmutanten und *gpa3*-Einzelmutanten, die mit cAMP supplementiert wurden, Appressorienbildung beobachtet werden (Abb. 20A). Die mikroskopische Analyse des dritten Keimblattes fünf Tage nach Infektion ergab, dass in diesen Mutanten einzelne Hyphen die Blattoberfläche penetriert hatten und bis in das Mesophyll des Blattes vorgedrungen waren (Abb. 20B). Eine weitere Proliferation oder Tumorbildung konnte jedoch nicht beobachtet werden, und die sichtbaren Symptome gingen nicht über eine leichte Chlorose des infizierten Maisblattes hinaus. Wildtypstämme, die auf gleiche Weise mit cAMP vorkultiviert und injiziert wurden, zeigten eine normale pathogene Entwicklung (nicht gezeigt). Ohne cAMP injizierte *gpa3*-Deletionsmutanten und $G\alpha$ -Nullmutanten zeigten keine Appressorienbildung. Unter diesen Bedingungen wurde keine Penetration der Hyphen in das Maisblatt beobachtet, wenige Hyphen waren nach 5 Tagen noch auf der Blattoberfläche zu finden. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die $G\alpha$ -Nullmutante in allen

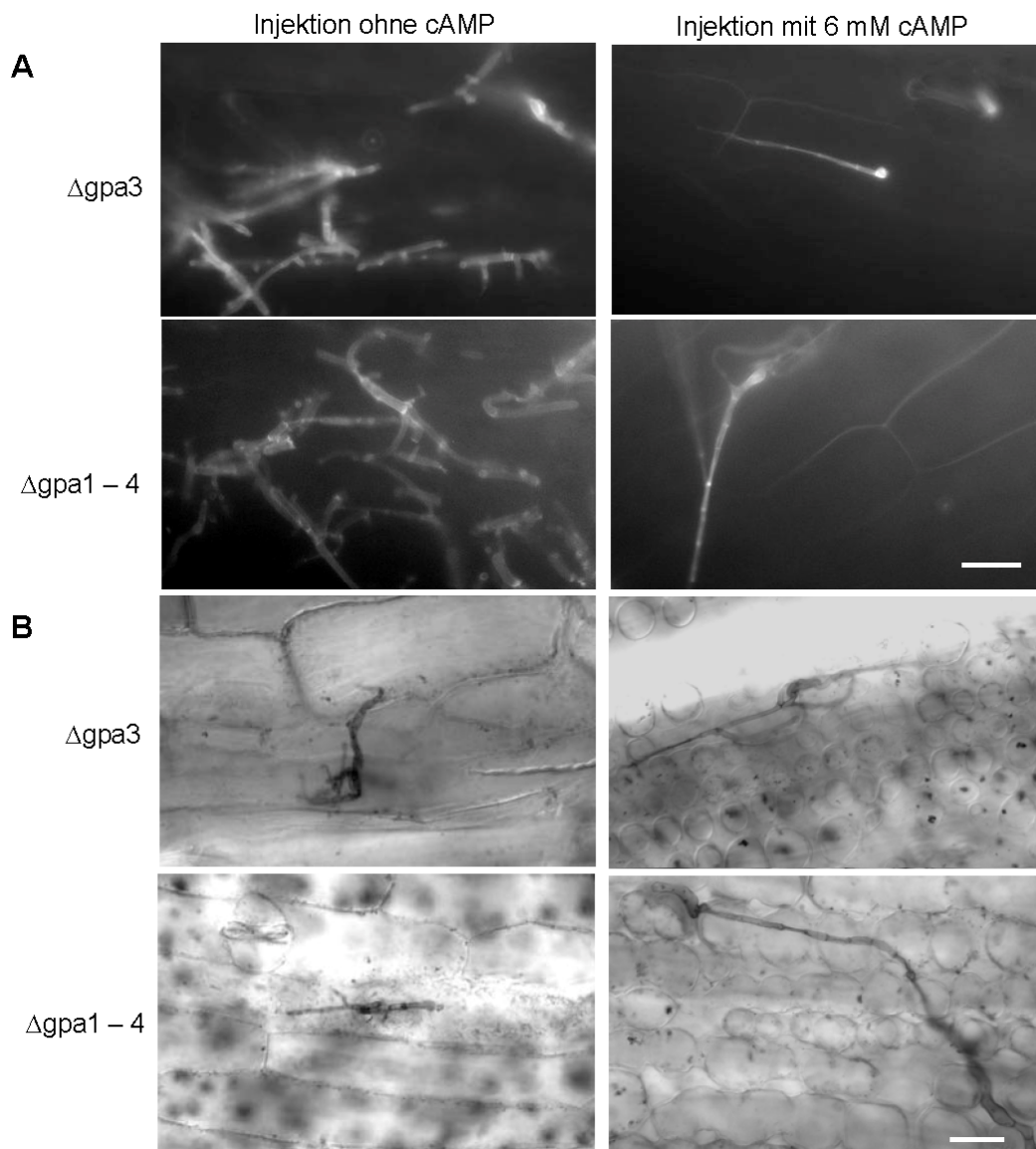


Abbildung 20. Wachstum von kompatiblen Kreuzungen der *gpa3*-Deletionsstämmen und *gpa1-gpa4*-Deletionsstämmen auf der Pflanzenoberfläche und Penetration in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von cAMP. Die Stämme wurden vor der Infektion mit Wasser gewaschen und entweder in Wasser (linke Bilderreihe) oder in Wasser mit 6 mM cAMP (rechte Bilderreihe) in Maispflanzen injiziert. A) Nach zwei Tagen wurden die Pilzstrukturen auf der Blattoberfläche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcuofluor angefärbt und mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie visualisiert. Der Größenstandard entspricht 50 μm und bezieht sich auf alle Bilder. B) Clorazol Black E-gefärbte Pilzstrukturen fünf Tage nach Infektion. Der Größenstandard entspricht 50 μm .

getesteten Eigenschaften wie die *gpa3*-Deletionsmutante verhält. Die Zellen dieser Stämme zeigten eine bisher unbeschriebene filamentöse Zellmorphologie auf der Blattoberfläche, die im folgenden Abschnitt genauer beschrieben ist (Abb. 20A).

2.3.1.4 Die Bildung von knospenden Filamenten in Stämmen mit cAMP-Mangel

Zellen der $G\alpha$ -Nullmutante wie auch der *gpa3*-Deletionsmutante, die ohne cAMP-Zugabe in Maispflanzen injiziert wurden, zeigten auf der Blattoberfläche einen bisher unbekanntem Phänotyp: sie wuchsen filamentös mit zusätzlichen knospentartigen Strukturen entlang des Filaments (Abb. 21A). Eine genauere Untersuchung der räumlichen Anordnung dieser knospentartigen Strukturen mit dem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop zeigte, dass diese Strukturen in der Regel parallel zur Blattoberfläche oder vom Blatt weg-zeigend wachsen (Abb. 21A). In Anwesenheit von cAMP wurde dieser Phänotyp unterdrückt. Um zu testen ob dieser Phänotyp speziell durch Pflanzensignale verursacht wird, wurden *gpa3*-Deletionsmutanten (DG74 und ER2-19) und $G\alpha$ -Nullmutanten (DG60 und DG67) alleine oder in kompatiblen Mischungen auf verschiedenen Festmedien getestet. Dieser Phänotyp konnte nicht auf aktivkohlehaltigem PD-Festagar, Ammonium- oder Nitrat-Minimalmedium und Milch-Festagar beobachtet werden (nicht gezeigt). Da die Maisblattoberfläche eine hydrophobe Oberfläche hat, wurden die Stämme auf Parafilm, der eine ähnliche Hydrophobizität aufweist, getestet. Interessanterweise konnte hier der gleiche Phänotyp wie auf der Blattoberfläche reproduziert werden, unabhängig davon ob ein Gemisch der Kreuzungspartner oder haploide Kulturen eingesetzt wurden. Durch Fokussieren verschiedener optischer Ebenen konnte licht-mikroskopisch die Orientierung der Knospen parallel oder entgegengesetzt zur Oberfläche, wie bereits auf der Blattoberfläche beobachtet, bestätigt werden (Abb. 21B). Wildtypstämme hingegen zeigten unverzweigte Filamente auf diesen Oberflächen (nicht gezeigt). Zur Unterscheidung ob die Hydrophobizität oder eine harte Oberfläche für die Ausbildung der knospentenden Filamente entscheidend ist, wurden die Stämme auf der harten, nicht-hydrophoben Oberfläche eines Glas-Objektträgers in Wassertropfen inkubiert. Hier konnte dieser Phänotyp jedoch nicht beobachtet werden. Ein spezielles Pflanzensignal zur Induktion dieser Knospen kann demzufolge ausgeschlossen werden.

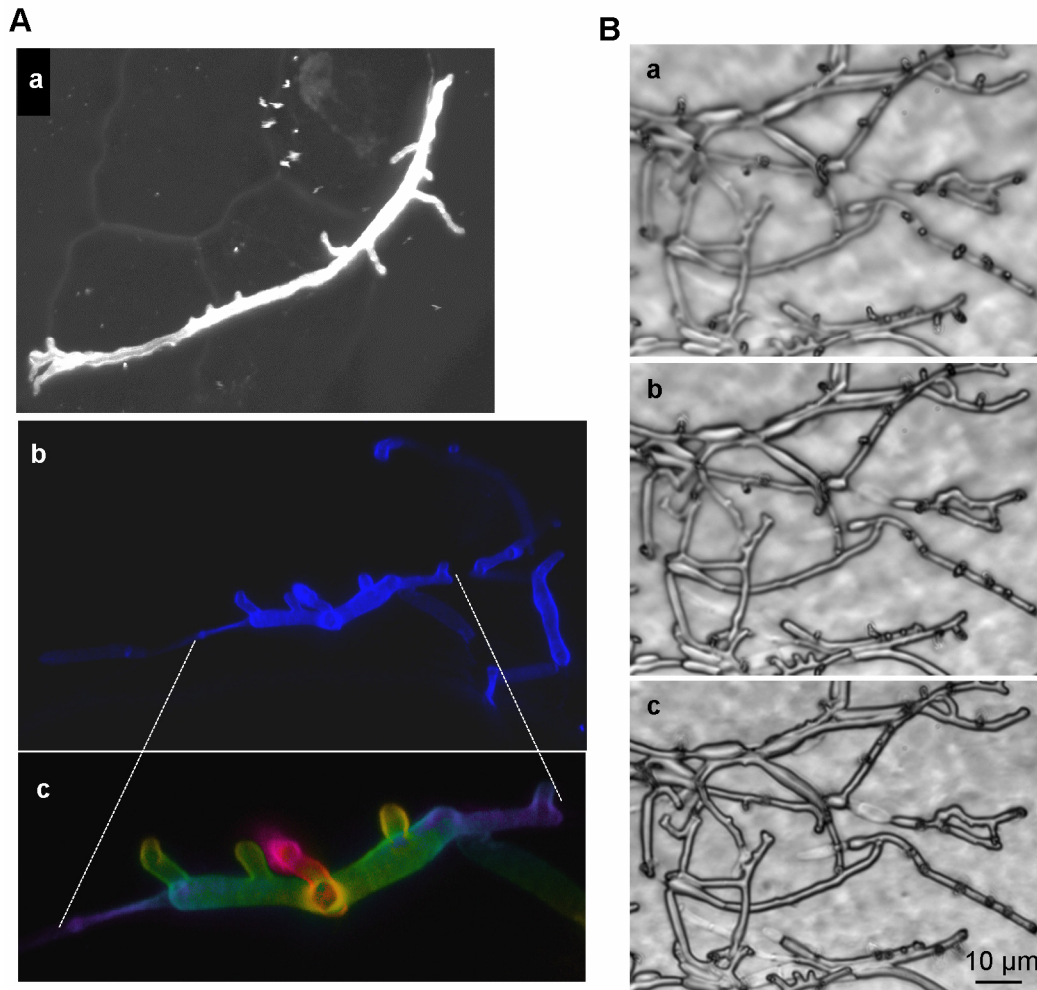


Abbildung 21. Mikroskopie von knospenden Filamenten mit knospentypischen Auswüchsen in *gpa3*-Deletionsstämmen. A) Epifluoreszenz-Aufnahmen von „knospenden Filamenten“ auf der Blattoberfläche nach Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcuofluor. a) Konfokale Aufnahme eines Calcuofluor-gefärbten Filaments auf der Blattoberfläche. Die Ränder der oberen Pflanzenschicht sind aufgrund der Autofluoreszenz sichtbar. b) Dreidimensionale Aufnahme eines aufliegenden Filaments mit einem vergrößerten Ausschnitt in c). Diese Aufnahme wurde mit Falsch-Farben koloriert um die räumliche Orientierung zu verdeutlichen. Die unterste Ebene ist blau dargestellt und die höchste Ebene rot. B) Lichtmikroskopische Aufnahmen von *gpa3*-Deletionsstämmen nach zwei Tagen Inkubation auf Parafilm in einer feuchten Petrischale bei 28°C. Die Aufnahmen a)–c) sind verschiedene optische Fokussierungsebenen in zunehmender Distanz zum Objekt.

2.3.2 Wachstum der $G\alpha$ -Deletionsmutanten unter verschiedenen Stressbedingungen

$G\alpha$ -Untereinheiten üben in anderen Pilzen auch Funktionen in der Stressantwort aus (Yang & Borkovich, 1999; Han et al., 2004). Um eine mögliche Funktion der *U. maydis*- $G\alpha$ -Untereinheiten in anderen Signalwegen aufzudecken, wurden die *gpa1 gpa2 gpa4*-Dreifachdeletionsmutanten und $G\alpha$ -Nullmutanten verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt.

2.3.2.1 Wachstum unter oxidativem Stress

Die Sensitivität auf oxidativen Stress wurde mithilfe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bestimmt. Dafür wurden mit 30% H_2O_2 getränkte Filterscheiben auf eine Agarplatte mit zuvor ausplattierten Zellen gelegt. Anhand des Durchmessers der wachstumsinhibierten Zone wurde die Sensitivität des getesteten Stammes bestimmt. Pro Genotyp wurden je zwei Stämme getestet. Die Dreifachdeletionsmutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp etwas kleinere, jedoch statistisch nicht signifikant unterschiedliche, wachstumsinhibierte Zonen (Abb. 22). In den $G\alpha$ -Nullmutanten war die inhibierte Wachstumszone vergleichbar zum Wildtyp (Abb. 22).

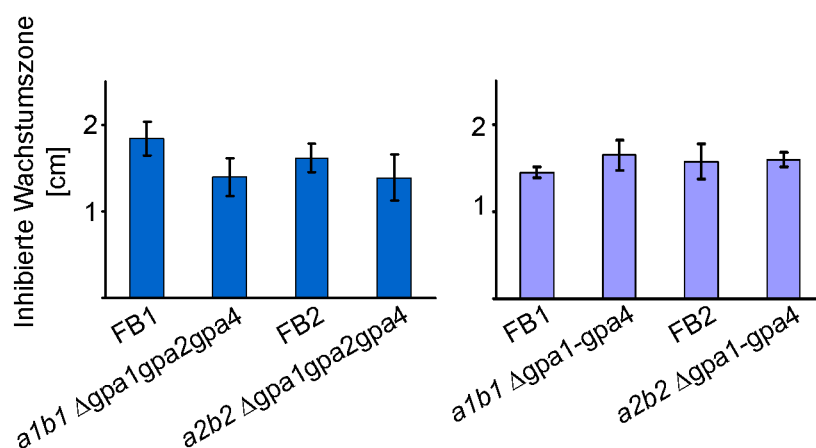


Abbildung 22. H_2O_2 -Sensitivität der $G\alpha$ -Dreifachdeletionsmutanten (linkes Diagramm) und $G\alpha$ -Nullmutanten (rechtes Diagramm). Gemessen wurde der Durchmesser der durch H_2O_2 verursachten wachstumsinhibierten Zone auf PD-Agar nach zwei Tagen Inkubation bei 28°C. Die Replikatanzahl war n=12 (linke Abb.) und n=8 (rechte Abb.).

2.3.2.2 Wachstum bei erhöhter Temperatur

Um die Temperaturtoleranz der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutanten und $G\alpha$ -Nullmutanten zu testen wurde das Wachstum dieser Stämme bei erhöhten Temperaturen (37°C und 42°C) untersucht. Dafür wurden die zu testenden Stämme mit einer OD_{600} von 0,8 und in drei weiteren 10fach-Verdünnungen auf PD-Festagar getropft und bei 28°C, 37°C und 42°C für 2 Tage inkubiert. Nach zwei Tagen wurde kein Wachstum der Stämme, die bei 42°C inkubiert wurden, beobachtet (nicht gezeigt). Bei 37°C zeigten die Dreifachdeletionsmutanten und Wildtypstämme im Vergleich zur Inkubation bei 28°C reduziertes Wachstum (Abb. 23). In den $G\alpha$ -Nullmutanten wie auch in den *gpa3*-Deletionsmutanten hingegen war in einer 10fach größeren Zellverdünnung als im Wildtyp noch geringes Wachstum bei 37°C erkennbar. Dies deutet auf eine leicht erhöhte Temperaturreistenz in diesen Stämmen hin.

2.3.2.3 Wachstum unter osmotischem Stress

Die $G\alpha$ -Dreifachdeletionsmutanten und die $G\alpha$ -Nullmutanten sowie der Wildtyp wurden in vier Verdünnungsstufen auf PD-Festagar, der mit steigender Salzkonzentration von 0 mM, 250 mM, 500 mM, 1M und 1,5 M Natriumchlorid versetzt war, aufgetropft und bei 28°C inkubiert. Nach zwei Tagen war mit steigender Salzkonzentration ein abnehmendes Wachstum zu beobachten, dass sich in den Dreifachdeletionsmutanten nicht vom Wildtyp unterschied (Abb. 23 und nicht gezeigt). Dies deutet auf vergleichbare Sensitivität gegenüber osmotischem Stress hin. Die $G\alpha$ -Nullmutanten und *gpa3*-Deletionsmutanten zeigten eine stärkere Abnahme des Wachstums mit erhöhter Salzkonzentration als die Wildtypstämme und kein Wachstum in der größten Verdünnungsstufe bei 1 M NaCl. Da diese Mutanten jedoch bereits auf normalem PD-Festagar langsamer und filamentöser wachsen, konnte dieser Effekt nicht direkt mit den Wildtypstämmen verglichen werden.

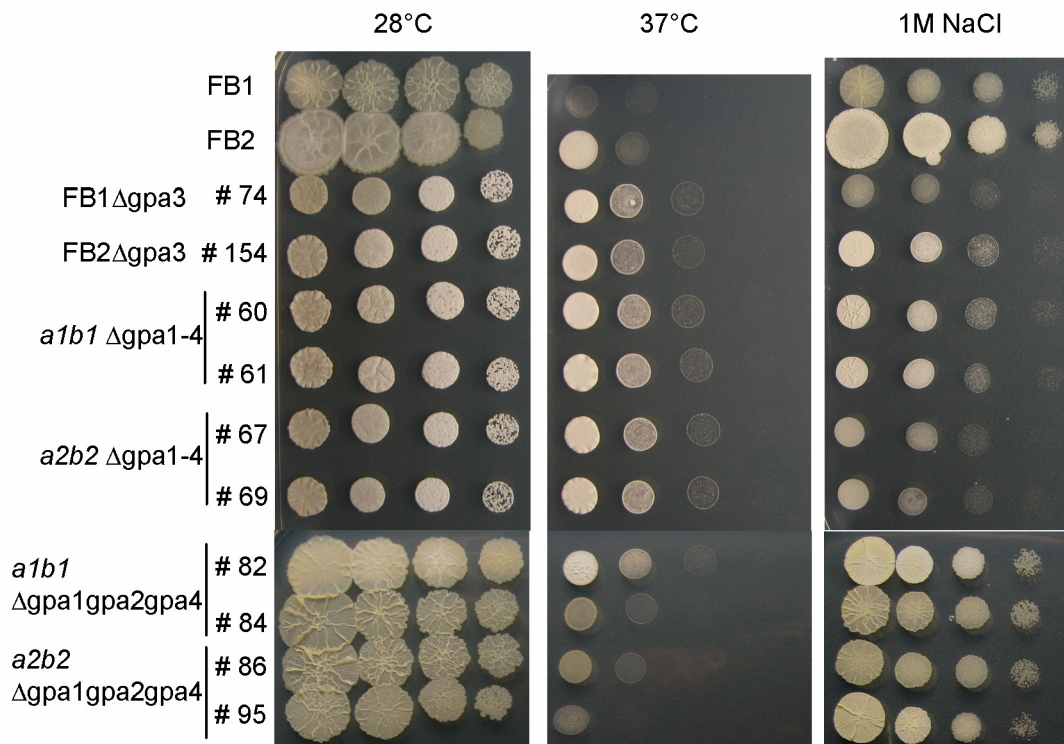


Abbildung 23. Wachstum der $G\alpha$ -Dreifachdeletionsmutanten und $G\alpha$ -Nullmutanten bei erhöhter Temperatur oder unter osmotischem Stress. Die angegebenen Stämme wurden von einer Konzentration von $OD_{600} = 0,8$ ausgehend in 10er Schritten verdünnt auf PD-Platten getropft und unter den angegebenen Bedingungen für zwei Tage inkubiert. Von den Teststämmen wurden je zwei unabhängig hergestellte Mutanten getestet. Für den Test auf osmotischen Stress wurden PD-Platten benutzt, die mit 1M NaCl versetzt waren.

2.4 Transkriptomanalysen zur funktionellen Charakterisierung der $G\alpha$ -Untereinheiten

Da Stämme mit einer Deletion in *gpa1*, *gpa2* und *gpa4* keinen offensichtlichen Phänotyp zeigten, wurde versucht, über genomweite Expressionsanalysen diesen $G\alpha$ -Untereinheiten eine Funktion zuzuordnen. Hierfür wurde zunächst die Auswirkung der Expression von konstitutiv aktiven $G\alpha$ -Allelen auf die Genexpression untersucht. Anschließend wurden die Expressionsprofile der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutante und der *gpa3*-Deletionsmutante ermittelt und analysiert.

2.4.1 *U. maydis*-Stämme mit induzierbarer Expression von konstitutiv aktiven $G\alpha$ -Untereinheiten

Konstitutiv aktive Versionen der $G\alpha$ -Untereinheiten Gpa1, Gpa2 und Gpa3 wurden durch den gezielten Austausch von Glutamin zu Leucin in der hochkonservierten GTPase-Domäne

DxxGQ über zielgerichtete Mutagenese hergestellt (Abb. 24). Dieser Aminosäureaustausch führt in $G\alpha_s$ (Adenylatzyklase-stimulierende $G\alpha$ -Untereinheit) und $G\alpha_i$ (Adenylatzyklase-inhibierende $G\alpha$ -Untereinheit) zu einer starken Reduzierung der intrinsischen GTPase-Aktivität wodurch die $G\alpha$ -Untereinheit länger in der GTP-gebundenen, aktiven Form bleibt (Kaziro et al., 1991; Dohlman et al., 1996). In *U. maydis* führte diese Mutation in *gpa3* zu einer erhöhten Transkription von *mfa1* (Regenfelder et al., 1997), $Gpa3^{QL}$ ist demnach funktionell. Da *Gpa4* kein konserviertes Glutamin in seiner GTPase-Domäne aufweist, wurde stattdessen das hochkonservierte Arginin³⁹² gegen ein Cystein ausgetauscht, was in anderen $G\alpha$ -Untereinheiten ($G\alpha_s$ und $G\alpha_i$) ebenfalls zu einer reduzierten GTPase-Aktivität führt (Noel et al., 1993 und enthaltene Referenzen). Diese vier $G\alpha$ -Allele wurden jeweils in den *ip*-Locus (Loubradou et al., 2001) des Wildtypstammes FB1 integriert, sodass das endogene $G\alpha$ -Allel erhalten blieb. Um die konstitutiv aktiven $G\alpha$ -Untereinheiten kontrolliert in *U. maydis* exprimieren zu können, wurden sie unter die Kontrolle des Promotors der Arabinase *crg1* (P_{crg1}) gesetzt. Dieser Promotor wird durch Arabinose aktiviert und durch Glucose reprimiert (Bottin et al., 1996; Brachmann et al., 2001). Stämme mit einer Einfach-Integration in den *ip*-Locus wurden durch Southern-Blot-Analyse identifiziert (nicht gezeigt). Nach 3 h Wachstum in induzierendem Arabinose-Array-Minimalmedium wurde die Induktion der jeweiligen Transkripte in den Stämmen $FB1P_{crg1}:gpa1^{QL}$, $FB1P_{crg1}:gpa2^{QL}$, $FB1P_{crg1}:gpa3^{QL}$ und $FB1P_{crg1}:gpa4^{RC}$ mittels Northern-Analyse nachgewiesen (Abb. 25A). Die Zellen zeigten vor und nach induzierter Expression der konstitutiv aktiven $G\alpha$ -Untereinheiten keine von Wildtypzellen abweichende Morphologie (Abb. 25B). Auch nach längerer Induktion (5 h und 7 h) zeigte sich keine morphologische Änderung (nicht gezeigt). Für den Stamm $FB1P_{crg1}:gpa3^{QL}$ wurde zunächst ein „multiple budding“-Phänotyp (Gold et al., 1994) erwartet, der auftritt wenn die Zellen zuviel cAMP erhalten. Allerdings induziert auch die konstitutive Expression von $gpa3^{QL}$ in FB1 und SG200 diesen Phänotyp ebenfalls nicht (Enders, 1998; Krüger et al., 2000; Müller et al., 2004). Darüberhinaus zeigten FB1-Wildtypzellen den „multiple budding“-Phänotyp in dem hier verwendeten Arabinosehaltigen Medium bei cAMP-Stimulation nicht (Kap 2.4.3). Aus diesen Gründen wurde der Stamm $FB1P_{crg1}:gpa3^{QL}$ nicht in die sich anschließende Microarray-Analyse einbezogen.

Abbildung 24. Sequenz-Alignment von *gpa1* (um10177), *gpa2* (um02517), *gpa3* (um04474) und *gpa4* (um05385). Rot umrandet ist die GTP-Bindedomäne GxGxxGKST und die GTPase-Domäne DxxGQ. Die Sterne markieren die in den konstitutiv aktiven $G\alpha$ -Versionen ausgetauschten Aminosäuren: in *Gpa1*, *Gpa2* und *Gpa3* das Glutamin in der GTPase-Domäne und in *Gpa4* das Arginin³⁹².

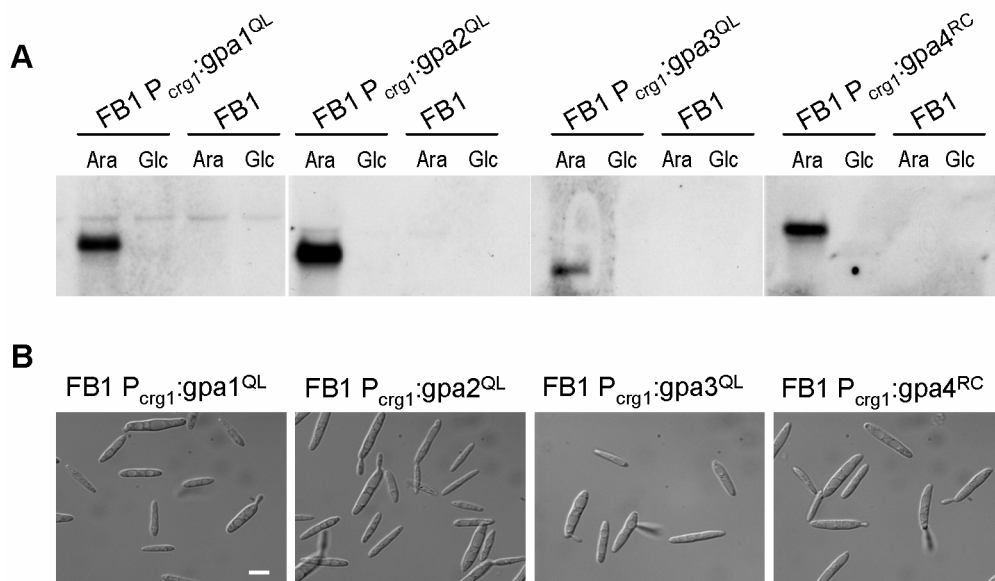


Abbildung 25. Expression der konstitutiv aktiven $G\alpha$ -Allele und Morphologie der Zellen nach Arabinose-Induktion. A) Northern-Blot-Nachweis der Transkripte der $G\alpha$ -Allele in induzierendem (Arabinose) oder in reprimierendem (Glucose) Array-Minimalmedium mittels Digmarkierten, spezifischen Sonden. Die Transkripte der Wildtyp-Allele von *gpa1* und *gpa2* wurden als größere, schwächere Bande detektiert. B) Zellen nach 3 h Wachstum in induzierendem Medium. Der Größenstandard entspricht 10 μm .

2.4.2 Die Auswirkungen der induzierten Expression von konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten auf die Genexpression

Für die Microarray-Analyse wurden die Stämme FB1P_{crg1}:gpa1^{QL}, FB1P_{crg1}:gpa2^{QL}, FB1P_{crg1}:gpa4^{RC} und FB1 in Array-Minimalmedium, das Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthält, vorkultiviert. Pro Stamm wurden dafür drei Vorkulturen angesetzt (biologische Triplikate). Zur induzierten Expression der konstitutiv aktiven G α -Allele wurden diese Vorkulturen einmal mit induzierendem Arabinose-Array-Minimalmedium gewaschen und weiter in induzierendem Medium kultiviert. Es wurden Proben vor der Induktion sowie 3, 6 und 12 h nach der Induktion genommen.

Für die RNA-Isolation und nachfolgende Analyse wurde jeweils eine der 3 h-Proben (nach Induktion) in einem Vorexperiment verwendet. Folgende Gründe sprachen für die Wahl dieses Zeitpunktes: Für den *crg1*-Promotor wurde gezeigt, dass die Expression eines Transkripts bereits eine Stunde nach Induktion stark erhöht ist (Brachmann et al., 2001). Dieser zeitliche Verlauf der P_{crg1}-kontrollierten Expression wurde in Microarray-Analysen bestätigt (Eichhorn, 2005). Zusätzlich gab es die Beobachtung, dass in Array-Minimalmedium die stärkste Expression von P_{crg1}-kontrollierten Genen 3–5 h nach Induktion erreicht wird (J. Kämper, persönl. Mitteilung). Die Microarray-Analyse wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die analysierten Proben zeigten eine Hybridisierungs-Effizienz von 80% zu den auf dem Microarray-Chip (Affymetrix) repräsentierten 6795 Oligonucleotid-Sonden („Probesets“), was eine erfolgreiche RNA-Isolation sowie die erfolgreiche Durchführung der weiteren Amplifikation, RNA-Markierung und Detektion belegt. Die erhaltenen Expressionswerte wurden mit der Affymetrix-Software MAS5 normalisiert um einen Vergleich zwischen verschiedenen Microarray-Experimenten zu erlauben und spiegeln theoretisch die in der Probe vorhandenen Transkriptmengen der Gene wieder.

Unter den getesteten Bedingungen waren nur wenige Gene in den induzierten Stämmen im Vergleich zum Wildtyp FB1 differentiell exprimiert (Abb. 26). Dabei wurden alle Gene, deren Expressionswerte sich mindestens 2fach unterschieden, als differentiell reguliert betrachtet. Insgesamt waren in FB1P_{crg1}:gpa1^{QL} neben *gpa1*^{QL} 18 Gene mindestens 2fach stärker exprimiert (Tab. 5). Darin enthalten sind sechs Gene, deren Fluoreszenzsignal in einer der Proben nahe der Hintergrundfluoreszenz liegt, was keine statistisch abgesicherte Aussage erlaubt. Sieben Gene waren in FB1P_{crg1}:gpa1^{QL} mindestens 2fach geringer exprimiert als in FB1.

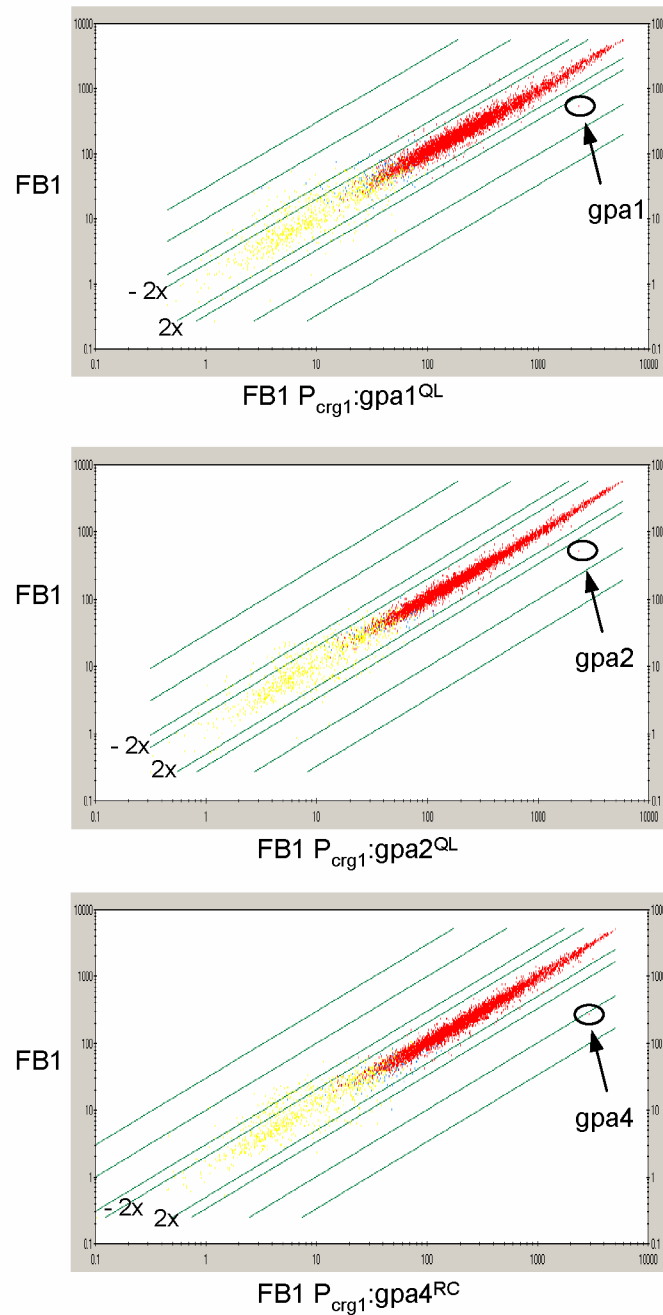


Abbildung 26. Genexpression nach Induktion der konstitutiv aktiven Allele $gpa1^{QL}$, $gpa2^{QL}$ und $gpa4^{RC}$. In den Streudiagrammen sind die detektierten Fluoreszenzsignale aller sich auf dem *U. maydis*-Microarray befindlichen „probe sets“ des jeweiligen induzierten Stammes gegen die des Wildtypstammes aufgetragen. Jedes Gen wird hierbei durch einen Datenpunkt repräsentiert. Rot gekennzeichnete Datenpunkte repräsentieren Signalintensitäten von Gentranskripten, bei denen in beiden Microarrays ein im Vergleich zum Hintergrund signifikantes Fluoreszenzsignal detektiert wurde. In blau sind Signalintensitäten von Gentranskripten dargestellt, bei denen nur in einem der Experimente ein signifikantes Signal detektiert wurde. In gelb sind Signalintensitäten angezeigt, für die in beiden Experimenten ein Wert gemessen wurde, der sich nicht signifikant von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Grenzlinien sind eingezeichnet, an denen der faktorielle Unterschied der Datenpaare abgeschätzt werden kann. Die Datenpunkte der induzierten $G\alpha$ -Untereinheiten sind umrandet.

Tabelle 5. Differenziell exprimierte Gene nach induzierter Expression von *gpa1^{QL}* in FB1P_{org1:gpa1^{QL}} im Vergleich zu FB1.

Probenet	MUMDB ¹	Funktion/ Annotation MUMDB ²	x-fach ³
W80um133G_at	um10177	Gpa1	4,1
W95um113G_at	um03485	conserved hypothetical protein	4,1 ^M
C45um082G_at	um03177	related to peroxisomal membrane protein 20	3,1
C75um085G_at	um11229	conserved hypothetical protein	3,1 ^M
C10um125G_at	um05325	conserved hypothetical protein	2,8
W105um164G_at	um00455	related to MIR1-Mitochondrial phosphate carrier protein	2,8 ^A
W60um232G_at	um04526	hypothetical protein	2,8
C20um006G_at	um02300	related to alpha-amylase	2,7 ^A
C70um146G_at	um10861	related to Reticuline oxidase precursor	2,5
C35um211G_at	um04575	conserved hypothetical protein	2,5 ^M
C60um135G_at	um01656	probable sugar transporter	2,5
C89um182G_at	um11795	related to glutathione s-transferase 3	2,4
C140um074G_at	um01805	conserved hypothetical protein	2,3
C15um098G_at	um10031	related to embryonic protein DC8	2,3
W45um110G_at	um00573	putative protein	2,2 ^A
C140um175G_at	um02707	hypothetical protein	2,1
C5um143G_at	um03678	conserved hypothetical protein	2,1
C75um157G_at	um02172	related to methylglyoxal reductase (NADPHdependent)	2,1
C45um140G_at	um03776	putative protein	2,0
W110um098G_at	um00158	conserved hypothetical protein	-2,1
C25um042G_at	um05690	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	-2,1
W26um190G_at	um00336	putative protein	-2,1
W60um134G_at	um05104	putative protein	-2,4
W45um057G_at	um06085	conserved hypothetical protein	-2,4
W55um164G_x_at	um00466	hypothetical protein	-2,8
W55um164G_at	um00466	hypothetical protein	-3,4
C65um118G_at	um11051	putative protein	-3,4
C63um118G_at	um11051	putative protein	-3,6

¹ <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>

² Gene mit mehreren Probensets sind mehrfach aufgeführt.

³ Faktorielle Änderung (x-fach) der Genexpression in FB1P_{org1:gpa1^{QL}} im Vergleich zu zwei biologischen Replikaten des Wildtypstammes FB1. Die Berechnung der faktoriellen Änderung mit Signalwerten, die nahe der Hintergrund-Signalintensität liegen ist gekennzeichnet mit ^A für "absent call" und ^M für „marginal call“.

In FB1P_{crG1}:gpa2^{QL} waren neun Gene neben *gpa2*^{QL} mindestens 2fach stärker exprimiert und zwei Gene mindestens 2fach geringer exprimiert als in FB1 (Tab. 6). Darunter befinden sich fünf Gene, deren Fluoreszenzsignal in einer der Proben nahe der Hintergrundfluoreszenz liegt. In FB1P_{crG1}:gpa4^{RC} waren neben *gpa4*^{RC} vier Gene mindestens 2fach stärker exprimiert und kein Gen mindestens 2fach geringer exprimiert als in FB1 (Tab. 7). Da nur je ein Replikate der Teststämme analysiert wurde, können keine statistisch abgesicherten Aussagen getroffen werden. Insgesamt war keine Gruppe funktionell-zusammengehöriger Gene differentiell reguliert, was Rückschlüsse auf die Funktion der jeweiligen G α -Untereinheit erlaubt hätte.

Tabelle 6. Differentiell exprimierte Gene nach induzierter Expression von *gpa2*^{QL} in FB1P_{crG1}:gpa2^{QL}.

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/ Annotation MUMDB	x-fach ²
C45um161G_at	um02517	Gpa2	4,4
W95um113G_at	um03485	conserved hypothetical protein	3,6 ^M
W60um232G_at	um04526	hypothetical protein	2,5
C55um052G_at	um04445	related to IST2 - Plasma membrane protein	2,4
C35um211G_at	um04575	conserved hypothetical protein	2,4 ^M
W45um110G_at	um00573	putative protein	2,3 ^A
W5um113G_at	um03506	conserved hypothetical protein	2,2 ^A
C140um175G_at	um02707	hypothetical protein	2,1
C10um125G_at	um05325	conserved hypothetical protein	2,1
W105um164G_at	um00455	related to MIR1-Mitochondrial phosphate carrier protein	2,1 ^A
W60um134G_at	um05104	putative protein	-2,0
C30um217G_at	um04503	related to Alpha-N-acetylgalactosaminidase precursor	-2,2

¹ <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>

² Faktorielle Änderung (x-fach) der Genexpression in FB1P_{crG1}:gpa1^{QL} im Vergleich zu zwei biologischen Replikaten des Wildtypstammes FB1. Die Berechnung der faktoriellen Änderung mit Signalwerten, die nahe der Hintergrund-Signalintensität liegen, ist gekennzeichnet mit ^A für "absent call" und ^M für „marginal call“. Diese Werte sind statistisch nicht abgesichert.

Tabelle 7. Differenziell exprimierte Gene nach induzierter Expression von $gpa4^{RC}$ in $FB1P_{crg1:gpa4^{RC}}$ im Vergleich zur Genexpression im Wildtypstamm FB1.

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/ Annotation MUMDB	x-fach ²
W55um041G_at	um05385	Gpa4	10,7
W45um110G_at	um00573	putative protein	2,1
W140um132G_at	um05170	probable formate dehydrogenase	2,1
C20um006G_at	um02300	related to alpha-amylase	2,1
C140um175G_at	um02707	hypothetical protein	2,0

¹ <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>

² Faktorielle Änderung (x-fach) der Genexpression in $FB1P_{crg1:gpa1^{QL}}$ im Vergleich zu zwei biologischen Replikaten des Wildtypstammes FB1.

2.4.3 Der Einfluß von Arabinose auf die Ausbildung des „multiple budding“-Phänotyps in FB1 in cAMP-haltigem Medium

Der „multiple budding“-Phänotyp tritt auf, wenn die Zellen mit cAMP überstimuliert werden und ist zu sehen an der sternförmigen Anordnung mehrerer Zellen an einem Zellpol (Gold et al., 1994; Krüger et al., 1998). Um zu untersuchen ob das Ausbleiben des „multiple budding“-Phänotyps nach induzierter Expression von $gpa3^{QL}$ im Stamm $FB1P_{crg1:gpa3^{QL}}$ durch das verwendete Arabinose-Array-Minimalmedium verursacht wurde, wurden cAMP-Stimulationsexperimente mit dem Wildtypstamm FB1 in verschiedenen Flüssigmedien durchgeführt. FB1 zeigt in Anwesenheit von 15 mM cAMP ebenfalls „multiple budding“. $FB1P_{crg1:gpa3^{QL}}$ und FB1, deren Medium mit 15 mM cAMP versetzt war, zeigten in Anwesenheit von 1% Arabinose weder in CM-Vollmedium noch in Array-Minimalmedium zu keinem der überprüften Zeitpunkte von 3, 5, 7 und 20 h nach cAMP-Zugabe „multiple budding“. Bei Zugabe von 1% Glucose statt Arabinose, bildeten FB1-Zellen dagegen diesen Phänotyp aus (Abb. 27).

2.4.4 Differentielle Genregulation in $G\alpha$ -Deletionsmutanten

2.4.4.1 Transkriptomanalyse von $FB1\Delta gpa1$

Um den Einfluss von Gpa1 auf die basale Genexpression zu testen und dadurch gegebenenfalls Gpa1 eine Funktion zuzuordnen zu können, wurde eine Transkriptomanalyse der $gpa1$ -Deletionsmutante in Glucose-Array-Minimalmedium durchgeführt. Glucose wurde als

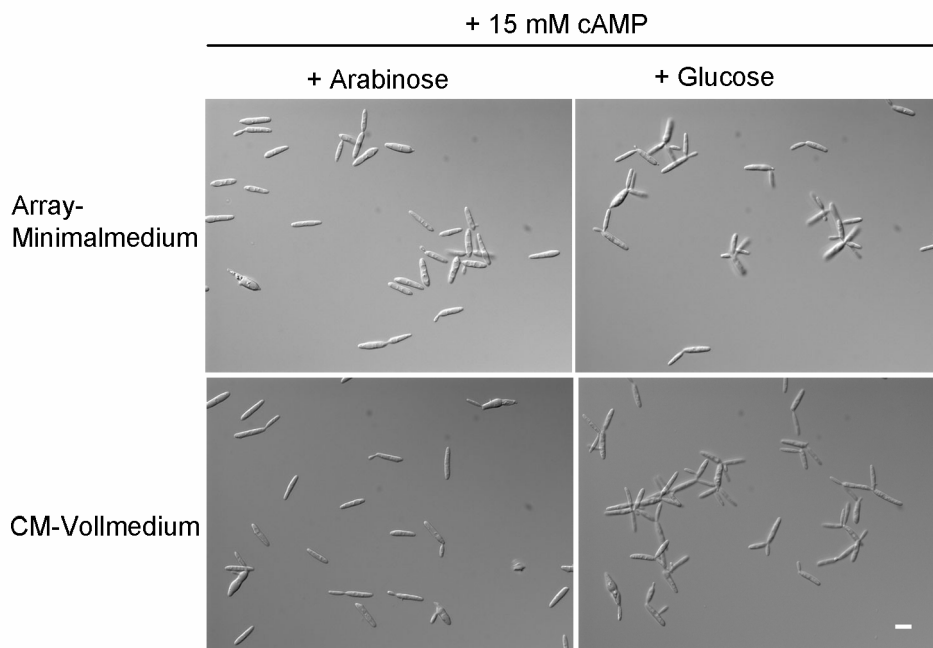


Abbildung 27. Der „multiple budding“-Phänotyp von FB1 in Gegenwart von cAMP nach 5 h Inkubation bei 28°C. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Zuckerquelle gewählt, da in vorangegangenen Versuchen nach Induktion der konstitutiv aktiven $G\alpha$ -Untereinheiten in Arabinose-haltigem Medium keine signifikante transkriptionelle Änderung auftrat (siehe Kap 2.4.2). $Gpa1$ selbst ist in beiden Array-Minimalmedien unabhängig von der Zuckerquelle gleich exprimiert (Array-Daten; Abb. 25A). Der für diese Analyse benutzte Stamm $FB1\Delta gpa1$ ist von Regenfelder et al. (1997) beschrieben worden. Der offene Leserahmen von $Gpa1$ ist in diesem Stamm durch eine 100 bp-Deletion unterbrochen und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt, so dass die essentiellen Bereiche für die Funktion der $G\alpha$ -Untereinheit fehlen.

Für die Transkriptionsanalyse wurden je drei in Glucose-Array-Minimalmedium angezogene Vorkulturen (biologische Replikate) von $FB1\Delta gpa1$ und dem Wildtypstamm FB1 in frisches Glucose-Array-Minimalmedium überführt. Nach 3, 6, 9 und 24 h wurden Proben genommen. Die Zellen von $FB1\Delta gpa1$ unterschieden sich nicht von Wildtyp-Zellen in der Wachstumsgeschwindigkeit oder der Zellmorphologie (nicht gezeigt). Für die weitere Analyse wurde Gesamt-RNA von den nach 3 h abgenommenen Proben isoliert und wie in Material und Methoden detailliert beschrieben für die Hybridisierung der Microarrays aufbereitet. Für alle Replikate wurde eine hohe Hybridisierungseffizienz von ~80% zu den 6795 Microarray-„Probesets“ erzielt. Nach Normalisierung und Berechnung der Expressionswerte mit der Affymetrix-Software MAS5.0 wurden die Daten statistisch analysiert. Für alle Expressions-

änderungen zwischen FB1 Δ gpa1 und dem Kontrollstamm FB1 wurde eine korrigierte Fehlerwahrscheinlichkeit, der sogenannte „P_{adj}“, der einen Vergleich verschiedener Microarray-Datensätze ermöglicht, mit dem Programm-Paket Bioconductor R berechnet. Alle differentiell exprimierten Gene mit einem Signifikanzniveau von $P_{adj} \leq 0,01$ wurden anschließend mit dem Programm dChip (Li & Wong, 2001) auf mindestens 2fach unterschiedliche Genexpression gefiltert. Zu beachten ist, dass in dieser Analyse auch Gene enthalten sind, die in einem Stamm nahe der Detektionsgrenze liegen können und in MAS5.0 mit einem „absent call“ oder „marginal call“ gekennzeichnet sind, jedoch zum Vergleichsstamm signifikant unterschiedlich exprimiert werden.

Diese Analyse ergab sechs differentiell regulierte Gene in FB1 Δ gpa1 (Tab. 8). Darin enthalten ist das bakterielle *hph*-Gen (Hygromycin B Phosphotransferase aus *E. coli*), das in FB1 Δ gpa1 für die Hygromycin-Resistenz verantwortlich ist und in FB1 fehlt. Das *gpa1*-Gen wurde nicht als differentiell reguliert detektiert, da nicht der gesamte offene Leserahmen deletiert ist, sondern ein 100 bp großer Bereich in der essentiellen GTPase-Region (Regenfelder et al., 1997). Das *gpa1*-Transkript kann bis zu diesem Bereich abgelesen und wahrscheinlich detektiert werden. Die im Vergleich zu den anderen Genen hohen Expressionsunterschiede von um03792 und des *hph*-Gens ergeben sich rechnerisch aus den Expressionswerten in FB1 ($3 \pm 0,4$ und $12 \pm 6,9$), die nahe dem Detektionslimit liegen, und der geringen Expression in FB1 Δ gpa1 ($78 \pm 7,9$ und $190 \pm 30,9$). Aufgrund der insgesamt geringen Expression von um03792, einem sepB-ähnlichem Protein (siehe Diskussion), kann ohne eine weitere experimentelle Verifizierung keine Aussage über dessen transkriptionelle Regulation in FB1 Δ gpa1 getroffen werden. Weitere induzierte Gene sind das *Heat shock*-Protein Hsp20 und die hochaffine Natrium/Kalium-Pumpe Acu1 (Benito et al., 2004). Der Vergleich der differentiell regulierten Gene in diesem Stamm und in FB1gpa1^{QL} ergab keine Gene, die in beiden Stämmen dereguliert waren. Insgesamt können aufgrund der geringen Anzahl differentiell regulierter Gene sowie deren funktionelle Heterogenität keine Rückschlüsse auf eine Funktion von Gpa1 gezogen werden.

Tabelle 8. Differentiell regulierte Gene in FB1 Δ gpa1.

Probenset	MUMDB ¹	MUMDB Annotation	Veränderung der Expression (x-fach)	P _{adj}
EST03um092_at	um03792	related to sepB protein	22,5	0,000
C20um097G_at	um03881	related to Heat shock protein Hsp20	4,5	0,002
W200um019G_at	um06433	Acu1 (K, P-type ATPase)	4,1	0,003
W130um209G_at	um00027	putative protein, sekretiert ²	3,2	0,000
C55um125G_at	um05314	conserved hypothetical Ustilago-specific protein, sekretiert ²	2,3	0,001
hyg_at	-	bacterial hygromycin resistance gene	10,0	0,000

¹ <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>

² Die hier angegebenen TargetP-Voraussagen entstammen den Berechnungen der MUMDB (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>; Stand 04.2007).

2.4.4.2 Transkriptomanalyse der *gpa1 gpa2 gpa4*-Dreifachdeletionsmutante

Da das Transkriptionsprofil einer *gpa1*-Deletionsmutante sich nicht erheblich vom Wildtypstamm unterscheidet, sollte nun durch Expressionsanalyse der Dreifachdeletionsmutante DG99 (*alb1* Δ gpa1gpa2gpa4) festgestellt werden, ob der Funktionsverlust in diesen α -Untereinheiten sich generell auf die basale Transkription auswirkt. Die Dreifachdeletionsmutante war im selbem Versuchsansatz wie der Stamm FB1 Δ gpa1 in drei biologischen Replikaten in Glucose-Array-Minimalmedium kultiviert und beprobt worden. Die Zellen zeigten in diesem Medium wildtypartige Zellmorphologie und Wachstumsgeschwindigkeit (nicht gezeigt).

Für die Microarray-Analyse wurden die 3 h-Proben für die Extraktion der Gesamt-RNA benutzt. Die Proben wurden weiter wie für den Stamm FB1 Δ gpa1 (Kap. 2.4.4.1) beschrieben aufbereitet und analysiert. Alle Replikate zeigten eine hohe Hybridisierungseffizienz von 79% zu den auf dem Microarray vorhandenen 6795 Probensets. Die weitere Datenanalyse erfolgte wie in Kap. 2.4.4.1 beschrieben. Insgesamt waren in der Dreifachdeletionsmutante 45 Probensets, davon eines ohne zugewiesene Genannotation, auf einem Signifikanzniveau von P_{adj} < 0,01 mindestens 2fach differentiell exprimiert im Vergleich zum Wildtypstamm FB1 (Tab. 9). Hierbei ist zu beachten, dass es sich in diesem Vergleich nicht um Stämme mit dem gleichen genetischen Hintergrund handelt, da die Dreifachdeletionsmutante aus einer Kreuzung hervorging und genetisch teilweise dem FB2-Wildtypstamm entspricht. Die berechneten Expressionswerte für *gpa2* und *gpa4* in der Dreifachdeletionsmutante waren erwartungsgemäß reduziert (18fach und 4fach), und die Hygromycin- und Phleomycin-Resistenzen induziert. Diese Transkripte werden als differentiell detektiert, da in der statistischen Analyse auch Signalwerte, die nahe der Detektionsgrenze liegen miteinbezogen

werden. Biologisch können solche Signalwerte darauf zurückzuführen sein, dass das entsprechende Gen in einem der Vergleichsstämme nicht exprimiert wird.

Zur leichteren Identifizierung funktioneller Zusammenhänge wurden die differentiell regulierten Gene in folgende Kategorien eingeteilt: Signalweiterleitung, zellulärer Transport, Metabolismus und Stressantwort (Tab. 9). Da für G α -Untereinheiten vor allem eine Funktion in der Signalweiterleitung erwartet wird, ist diese Kategorie im Folgenden genauer erläutert. Interessanterweise ist in der Dreifachdeletionsmutante die Basalexpression des Transkriptionsfaktors Rop1, der für die Expression von pheromoninduzierten Genen in axenischer Kultur essentiell ist, reduziert (Brefort et al., 2005). Rop1 wird in axenischer Kultur insbesondere für die Expression des Transkriptionsfaktors Prf1 benötigt, der an die PRE-Elemente (*pheromone responsive elements*; Urban et al., 1996b) in den Promotoren seiner Zielgene bindet und die Pheromonantwort steuert (Hartmann et al., 1996). In der Dreifachdeletionsmutante sind acht dieser bekannt Prf1-/pheromonabhängig-regulierten Gene reduziert exprimiert (Urban et al., 1996a; Zarnack, 2006). Darunter ist der Transkriptionsfaktor Prf1 und Gene, die für Proteine der Pheromonreifung (um11228, um05348), -sekretion (um10528) und -wahrnehmung (um02383) kodieren sowie an der transkriptionellen Regulation in der Paarung (*bE1* und *bW1*) beteiligt sind. Ein weiteres Transkript eines hypothetischen Proteins (um02410) wurde ebenfalls in diese Gruppe eingeteilt, da es Prf1/pheromonabhängig induziert wird und PRE-Elemente im Promotor aufweist (Zarnack, 2006). Aufgrund der verminderten Expression von Genen, deren Proteine für die Pheromonreifung (CAAX Prenylprotease 2, Ram1 Proteinfarnesyltransferase) und Sekretion (Ste6) benötigt werden, wurde eine verminderte Pheromonsekretion in diesem Stamm vermutet. Dies wurde wie im Abschnitt 2.4.4.4 beschrieben mit einem Pheromon-Testerstamm untersucht und zeigte keine Beeinträchtigung der Pheromonantwort.

Ein Transkript, von dem keine pheromonabhängige Regulation bekannt ist, und das für ein Protein mit Homologie zu einer Phosphatidylinositol-3-Phosphat-5-Kinase kodiert (um06239) ist in der Dreifachdeletionsmutante reduziert exprimiert. In *S. cerevisiae* wurde eine Aktivierung dieser Kinase durch Gpa1p gezeigt (Slessareva et al., 2006); in *U. maydis* ist dies bisher nicht untersucht worden. Des Weiteren ist die Expression von drei Proteinen mit einer Transportfunktion und Proteinen verschiedener Stoffwechselwege reduziert. 15 weitere bisher nicht annotierte Gene sind differentiell exprimiert. Allerdings erschwert die Heterogenität der Funktionen dieser Proteine eine klare Aussage zu den Prozessen, die in der Dreifachdeletionsmutante beeinträchtigt sein könnten.

Zur Identifizierung von Genen, deren Expression durch die $G\alpha$ -Untereinheit Gpa1 reguliert wird, wurden die Transkriptome von FB1 Δ gpa1 und DG99 (*alb1* Δ gpa1gpa2gpa4) verglichen. Das einzige in beiden Stämmen differentiell regulierte Gen ist um03792. Die Expressionsvergleiche beziehen sich dabei auf denselben Wildtypstamm FB1, in dem um03792 nahe der Detektionsgrenze liegt. Zur Überprüfung ob die induzierte Expression von um03792 in Zusammenhang mit dem Fehlen von funktionellem Gpa1 steht, wäre eine weitere experimentelle Bestätigung notwendig.

Anschließend wurden die differentiell regulierten Gene im Stamm DG99 (*alb1* Δ gpa1gpa2gpa4) mit differentiell regulierten Genen in FB1gpa1^{QL} (Tab. 5), FB1gpa2^{QL} (Tab. 6) und FB1gpa4^{RC} (Tab. 7) verglichen um möglicherweise spezifisch durch die $G\alpha$ -Untereinheiten regulierte Gene zu identifizieren. Der Vergleich mit FB1gpa1^{QL} ergab fünf Gene, die in beiden Stämmen differentiell reguliert waren. Hierbei zeigten die folgenden Transkripte ein inverses Expressionsmuster, indem sie in einem Stamm induziert und im anderen Stamm reprimiert waren: um03485, um11229, um05325, um10861, um01656. Drei dieser Transkripte kodieren für Proteine unbekannter Funktion, eines für einen putativen Zuckertransporter und eines für ein Reticulin-Oxidase-Vorläuferprotein. Im Vergleich zu FB1gpa2^{QL} (Tab. 6) waren zwei Transkripte dereguliert: um03485 und um05325, die beide für Proteine unbekannter Funktion kodieren. Im Vergleich zu FB1gpa4^{RC} (Tab. 7) zeigte sich keine Überlappung der differentiell regulierten Gene.

Tabelle 9. Differentiell regulierte Gene in DG99 (*a1b1* Δ gpa1gpa2gpa4) im Vergleich zu FB1.

Proteinset	MUMDB ¹	MUMDB Annotation/Funktion	FB1 EW ²	SF ³	<i>a1b1</i> Δ gpa1gpa2gpa4 EW ²	SF ³	Expressions- unterschiede ⁴ x-fach
Signalweiterleitung							
W25um110G_at	um00577	b mating type locus, bE1 allele	88.7	7.3	9.1	4.5	-5.3
W40um030G_at	um10528	related to STE6 - ABC transporter	300.3	31.3	37.2	9.6	-5.4
W40um026G_at	um02383	Pra1 - a2-pheromone receptor Pra1	1265.1	94.0	233.0	21.8	-4.5
C20um110G_at	um00578	b mating type locus, bW1 allele	98.9	11.9	18.4	0.2	-4.3
W25um216G_at	um06025	Rop1 HMG-box transcription factor	688.0	32.7	192.4	13.6	-3.1
C112um175G_at	um02713	Prf1 - pheromone response factor Prf1	623.4	65.8	185.2	17.1	-2.7
C83um085G_at	um11228	related to CAAX prenyl protease 2	625.6	32.9	253.8	6.0	-2.2
W55um007G_at	um05348	related to RAM1 - protein farnesyltransferase	322.7	17.6	120.7	7.9	-2.3
W120um091G_at	um02410	hypothetical protein	451.9	27.8	140.0	8.0	-2.8
W22um241G_at	um06239	related to phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase	322.1	33.0	130.5	4.9	-2.0
EST03um092_at	um03792	related to sepB protein	3.0	0.2	97.9	1.4	29.6
Transporter, Permeasen							
W65um267G_at	um06138	probable PTR2 - Di- and tripeptide permease	387.7	24.2	93.2	6.6	-3.6
C60um135G_at	um01656	probable sugar transporter	337.1	30.1	92.4	4.9	-3.1
C40um002G_at	um03908	probable TPO1 - Vacuolar polyamine-H ⁺ antiporter	284.1	9.3	96.5	9.7	-2.5
Metabolismus							
C55um108G_at	um01173	related to KTI12 (TOT4) protein	151.8	15.3	15.8	0.9	-7.9
C100um172G_s_at	um02888	related to ADH6 - NADPH-dependent alcoholdehydrogenase	258.7	68.9	22.9	9.0	-5.3
C65um167G_at	um04247	related to Cholinesterase precursor	540.6	67.7	122.8	16.0	-3.3
W30um062G_at	um04922	related to 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	648.7	97.2	193.6	4.1	-2.5
C15um276G_at	um05995	related to Acid phosphatase precursor	218.7	11.5	81.3	5.3	-2.4
C70um146G_at	um10861	related to Reticuline oxidase precursor	154.2	37.8	40.3	2.2	-2.3
W25um008G_at	um04362	related to Cytochrome P450 8B1	206.9	9.7	77.0	9.0	-2.2
C5um077G_at	um10840	probable MIS1 - C1-tetrahydrofolate synthase	1791.5	61.5	777.2	24.4	-2.1
C85um276G_at	um06010	Leu1 - alpha-isopropylmalate isomerase	293.1	15.7	676.2	30.8	2.1

Proteinset	MUMDB ¹	MUMDB Annotation/Funktion	FBI EW ²	SF ³	<i>abl1</i> Δgpa1, gpa2, gpa4 EW ²	SF ³	Expressions- unterschiede ⁴ x-fach
Proteinfaltung/Stressantwort							
W100um192G_at	um00205	related to HSP12 - heat shock protein	906.1	190.1	268.5	17.1	-2.2
Funktion unbekannt							
C10um125G_at	um05325	conserved hypothetical protein	715.6	144.9	62.0	1.3	-7.7
C110um002G_at	um03923	conserved hypothetical protein	95.4	27.2	7.1	1.6	-6.7
W70um006G_at	um11403	conserved hypothetical protein	229.7	73.9	19.7	2.2	-5.4
C85um091G_at	um02416	conserved hypothetical protein	84.7	26.6	8.2	2.0	-4.7
C75um085G_at	um11229	conserved hypothetical protein	243.2	65.5	37.6	2.7	-3.6
C23um051G_at	um03817	putative protein	83.1	28.6	9.8	2.3	-3.5
C10um084G_at	um06261	conserved hypothetical protein	540.4	34.2	191.1	19.4	-2.3
W35um084G_at	um06256	hypothetical protein	340.0	11.9	128.7	8.7	-2.3
C40um203G_at	um04984	conserved hypothetical protein	234.9	11.0	100.6	1.5	-2.2
W1um060G_at	um02139	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	304.8	13.2	126.3	6.5	-2.2
W95um113G_at	um03485	conserved hypothetical protein	247.0	106.2	36.1	2.7	-2.0
W160um021G_x_at	um10221	conserved hypothetical protein	106.6	13.0	294.4	17.7	2.2
W160um021G_at	um10221	conserved hypothetical protein	107.0	7.8	327.2	10.3	2.7
C40um236G_at	um10403	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	25.6	1.6	123.0	5.5	4.2
W20um256G_at	um05781	hypothetical protein	62.5	3.6	374.5	31.4	5.0
C15um206G_at	um06497	putative protein	41.2	12.0	342.0	49.1	5.2
Kontrollen							
C45um161G_at	um02517	Gpa2	928.7	10.3	46.8	2.9	-18.0
W55um041G_at	um05385	Gpa4	387.9	8.1	87.5	2.5	-4.2
hyg_at		bacterial hygromycin resistance gene	11.9	4.0	97.5	18.1	4.6
phleo_at		bacterial phleomycin resistance gene	51.7	8.8	205.3	21.8	2.9

¹ <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>² EW = Expressionwert³ SF = Standardfehler⁴ alle angegebenen Expressionsunterschiede sind auf einem Signifikanzniveau eines korrigierten $P_{adj} < 0,01$ gefiltert.

2.4.4.3 Vergleich der Genexpression in DG99 (*a1b1* Δ *gpa1gpa2gpa4*) mit FB1 Δ *gpa3*

Der Vergleich der Gene, die sowohl in DG99 (*a1b1* Δ *gpa1gpa2gpa4*) als auch in FB1 Δ *gpa3* differentiell in Bezug auf den Wildtypstamm FB1 exprimiert werden, ergab fünf koregulierte und zwei invers regulierte Transkripte. In beiden Stämmen sind die Transkripte der Proteine Ste6, bW1, Ram1 und Cytochrom P450 8B1 reduziert und von einem putativen Protein (um06497) induziert. Dies könnte auf eine duale Regulierung dieser Transkripte durch den Gpa3-aktivierten cAMP-Signalweg bzw. durch eine der G α -Untereinheiten Gpa1, Gpa2 oder Gpa4 hindeuten. Alternativ könnten dies Unterschiede im genetischen Hintergrund der zwei verglichenen nicht-isogenen Stämme sein. Invers reguliert sind die Transkripte von einem hypothetischen Protein (um03923) und einem putativen Zuckertransporter (um01656).

2.4.4.4 Untersuchung der Pheromonekretion in DG99 (*a1b1* Δ *gpa1gpa2gpa4*)

In der genomweiten Analyse der Dreifachdeletionsmutante DG99 (*a1b1* Δ *gpa1gpa2gpa4*) wurde eine reduzierte Expression von Genen, die an der Pheromonreife und Sekretion beteiligt sind, festgestellt. Um zu testen, ob dieser Stamm weniger Pheromon sekretiert, wurde der diploide Pheromon-Testerstamm FBD12-17 (*a2a2b1b2*) verwendet, der nach Wahrnehmung von a1-Pheromon ohne vorhergehende Zellfusion filamentös wächst (Banuett & Herskowitz, 1989) und zur Demonstration reduzierter Pheromonekretion verwendet wurde (Brachmann, 2001; Becht et al., 2005). Die Dreifachdeletionsmutante wurde in serieller Verdünnung zusammen mit einer gleichbleibenden Konzentration von FBD12-17 auf aktivkohlehaltige PD-Platten getropft. Zusätzlich wurden serielle Verdünnungen der Einzeldelentionsmutanten von *gpa1*, *gpa2* und *gpa4* und zum Vergleich FB1 getestet. Es konnte jedoch für keinen der Stämme eine Reduktion in der induzierten Filamentbildung beobachtet werden (Abb. 28). Dies deutet darauf hin, dass die reduzierte Expression dieser Gene unter den getesteten Bedingungen nicht zu einer Reduktion der Pheromonekretion führt. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der Paarungskompetenz dieser Stämme.

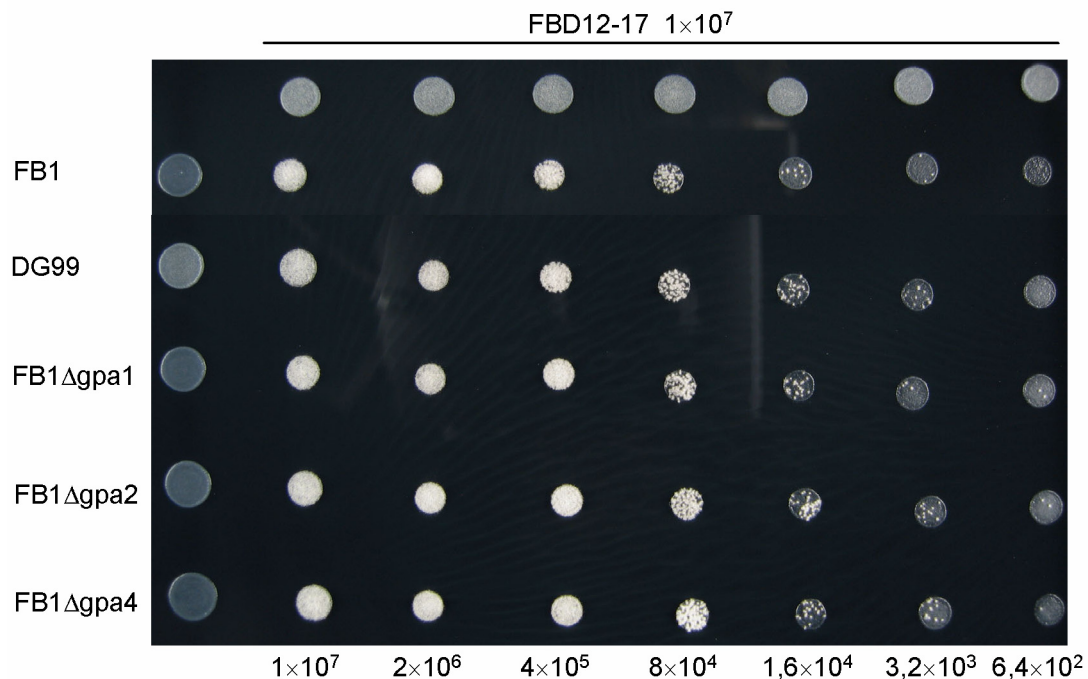


Abbildung 28. Gleichmäßige Induktion von filamentösem Wachstum im Pheromon-Testerstamm FBD12-17 durch die getesteten Stämme. Serielle 5fach Verdünnungen (unter dem Bild angegeben) der getesteten Stämme wurden zusammen mit einer OD = 1 von FBD12-17 auf aktivkohlehaltigen PD-Festagar getropft und bei 22°C einen Tag inkubiert.

2.4.4.5 Transkriptomanalyse von FB1Δgpa3

Zur Identifizierung von Genen deren Basalexpression durch Gpa3 reguliert wird, wurde das Expressionsprofil des Stammes FB1Δgpa3 (Stammbezeichnung DG74) im Vergleich zum Wildtypstamm FB1 analysiert. Aufgrund des niedrigeren internen cAMP-Spiegels in *gpa3*-Deletionsstämmen (Enders, 1998), wurde in der Transkriptomanalyse vor allem die veränderte Expression von cAMP-abhängigen Zielgenen erwartet. Durch den Vergleich zu früheren Transkriptomanalysen, in denen cAMP-abhängig regulierte Gene identifiziert wurden, sollte diese Analyse einen genaueren Einblick in die Signal- und Stoffwechselwege, die über Gpa3 reguliert werden, ermöglichen. Nicht zuletzt sollte der Vergleich mit den deregulierten Genen der *gpa1 gpa2 gpa4*-Dreifachdeletionsmutante eine weitere Eingrenzung von Gpa3/cAMP-spezifisch regulierten Genen erlauben.

Für die Transkriptomanalyse wurde der Stamm FB1Δgpa3 in Glucose-Arrayminimalmedium ohne cAMP-Zugabe kultiviert. Hierbei zeigten ein Teil der Zellen eine filamentös-verlängerte Form, was für Deletionsmutanten im cAMP-Signalweg charakteristisch ist (siehe Abb. 17). Insgesamt wurde die Genexpression von je drei biologischen Replikaten von FB1Δgpa3 mittels Microarray-Analyse (siehe Kap. 2.4.3.1) untersucht und mit dem

Referenz-Stamm FB1 verglichen. Die Auswertung differentiell regulierter Gene erfolgte nach Normalisierung und statistischer Analyse auf einem Signifikanzniveau von $P_{\text{adj}} < 0,01$. Insgesamt konnten in FB1 Δ gpa3 im Vergleich zu FB1 165 Probensets identifiziert werden, deren Signalintensitäten mindestens zweifach erhöht oder erniedrigt war (Tab. 10). Diese teilten sich auf 93 induzierte und 72 reprimierte Transkripte auf. Darin enthalten sind die Transkripte für die NAT-Resistenz (Nourseothricin) sowie *gpa3*.

Als primäre Validierung wurden die gewonnenen Daten mit publizierten Datensätzen zur cAMP-regulierten Genexpression in *U. maydis* verglichen. Im FB1 Δ gpa3-Transkriptom war die Expression der Gencluster für Eisenaufnahmesysteme (beschrieben in Eichhorn et al. 2006), und des sogenannten „*cab*-locus“ (beschrieben in Brachmann et al. 2001), reduziert. Somit konnte die cAMP-regulierte Basalexpression dieser geclusterten Gene bestätigt werden. In FB1 Δ gpa3 war die Expression eines weiteren Genclusters mit Genen für die Biosynthese von Mannosylerythritol-Lipiden (MEL) (Hewald et al., 2006) induziert. Das ebenfalls zu diesem Cluster gehörende Gen um03114 war 1,6fach induziert. Für dieses Gencluster war bisher nur die Induktion der Expression unter Stickstoffmangel bekannt (Spöckner et al., 1999; Hewald et al., 2006).

Darüberhinaus wurden neun der in *U. maydis* mittels serieller Genexpressionsanalyse (SAGE) identifizierten Zielgene der Proteinkinase A auch in FB1 Δ gpa3 als differentiell reguliert identifiziert (Larraya et al., 2005) (Tab. 10). Diese beinhalten Gene verschiedener Stoffwechselwege sowie das filament-spezifisch exprimierte Repellent-Protein *rep1* (Wösten et al., 1996), das in FB1 Δ gpa3 stark induziert ist. Zusätzlich zu *rep1* ist in FB1 Δ gpa3 die Expression von zwei als Hydrophobine beschriebenen Genen, *hum2* und *hum3*, induziert (Teertstra et al., 2006).

Zur leichteren Identifizierung funktioneller Zusammenhänge der differentiell regulierten Gene in FB1 Δ gpa3 wurden diese in funktionelle Kategorien eingeteilt. Dafür wurde zunächst eine FunCat-Analyse (*functional classification of proteins*, <http://mips.gsf.de/projects/funcat>) mittels der Datenbank MUMDB durchgeführt und anschließend eine manuelle Einteilung aufgrund von Publikationsdaten zu einzelnen Genen vorgenommen. Weitere Vergleiche zu früheren transkriptomweiten Analysen cAMP- und pheromonabhängiger Genexpression sind in Kap 2.4.4.6 und 2.4.4.7 beschrieben. Die meisten der differentiell regulierten 161 Gene in FB1 Δ gpa3 konnten in die funktionellen MUMDB-Kategorien Metabolismus, zellulärer Transport und Nicht-Klassifizierte eingeordnet werden (Tab. 11). Hierbei enthielten die Unterkategorien Kohlenhydrat/Zucker-Stoffwechsel mit 21 Genen (13%) sowie Kohlen-

hydrat-/Zucker-Transport mit 9 Genen (6%) die meisten Einträge. Die genauere Analyse dieser Gengruppe ergab, dass Gene, die normalerweise der transkriptionellen Reprimierung durch Glucose unterliegen, in FB1 Δ gpa3 induziert waren (in Tab. 10 gekennzeichnet mit CCR für „carbon catabolite repression“). Diese kodieren zum einen für Proteine, die an der Zuckeraufnahme und dem Zuckermetabolismus beteiligt sind. Zum anderen sind aus anderen Pilzen bekannte Glucose-reprimierte Enzyme weiterer Stoffwechselwege induziert. Das Arabinase-Gen *crg1*, für dessen Promotor die Glucose-Repression in *U. maydis* experimentell bestätigt wurde (Bottin et al., 1996), zeigte in diesen Experimenten in FB1 eine Expression, die nahe der Detektionsgrenze lag und eine 74fach erhöhte Expression in FB1 Δ gpa3. Insgesamt deutet die starke Expression dieser zehn Gene in FB1 Δ gpa3 auf eine gestörte Wahrnehmung der im Medium ausreichend vorhandenen Glucose hin. In FB1 Δ gpa3 waren darüber hinaus Gene, deren Expression in anderen Pilzen von der vorhandenen Stickstoffquelle abhängt, im Vergleich zu FB1 differentiell reguliert. Dies sind die hochaffine Ammoniumpermease Ump2 (Smith et al., 2003), eine putative Urea-Permease, ein putatives FUN34 Protein, zwei Homologe der Allantoat-Permease DAL5 und ein Homolog der DAL2-Allantoinase aus *S. cerevisiae*. Da die Expression dieser Gene zum Teil induziert zum Teil reduziert ist, deutet dies nicht auf einen Stickstoffmangel hin, sondern möglicherweise auf eine Verschiebung im Stickstoffmetabolismus als Folge des cAMP-Mangels in dieser Mutante.

Tabelle 10. Differenziell exprimierte Gene in FB1 Δ gpa3 auf einem Signifikanzniveau von $P_{adj.} < 0,01$.

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/Annotation MUMDB	Expressionsänderung x-fach	FunCat ²		
				1.05	20	CCR ³
Eisenaufnahme						
C120um049G_at	um00105	Fer1 - Iron transport multicopper oxidase	-4.2		+	
W125um049G_at	um10023	Fer2 - High-affinity iron permease	-7.3			
W170um132G_at	um10188	Sid1 - L-Ornithine N5-oxygenase	-3.5			
C158um132G_at	um10189	Sid2 Ferrichrome siderophore peptide synthetase	-4.6			
C160um132G_at	um10189	Sid2 Ferrichrome siderophore peptide synthetase	-2.6			
W25um222G_at	um01439	Fer9 - related to FRE3 - Ferric reductase, reduces siderophore-bound iron prior to uptake	-5.7			
W27um222G_at	um01439	Fer9 - related to FRE3 - Ferric reductase, reduces siderophore-bound iron prior to uptake	-26.0			
C20um222G_at	um11873	Fer10 - hypothetical protein	-3.0			
cab-locus						
W21um256G_at	um05782	capsule-associated protein-like protein *	-3.4			
C25um256G_at	um05783	related to UDP-galactose transporter	-7.0		+	
W35um256G_at	um05785	acyl transferase-like protein *	-4.0			
W40um256G_at	um05786	related to UDP N-acetylglucosamine transporter	-5.0		+	
W45um256G_at	um05787	conserved hypothetical protein	-2.3			
W54um256G_at	um05789	conserved hypothetical protein	-3.9			
C30um256G_at	um11585 ⁴	related to capsular associated protein	-4.7			
Repellentproteine/Hydrophobine						
W120um002G_at	um03924	Rep1 - repellent protein 1 precursor *	75.0			
W55um030G_at	um04433	Hum3 - hypothetical protein	10.6			
W70um170G_at	um11562	Hum2 - related to Hydrophobin	41.9			
Mannosylerythritol-Lipid Synthese (MELs)						
C110um021G_at	um03115	Mmf1 - related to Sge1 drug resistance protein	2.6		+	
C115um021G_at	um03116	Mac1 - predicted protein	2.5			
C120um021G_at	um03117	Emt1 - Glycosyltransferase	5.4			
W130um021G_at	um10636	Mac2 - Predicted protein	5.4			
Signalweiterleitung						
C20um110G_at	um00578	bW1 - b mating type locus	-2.9			
W55um007G_at	um05348	related to RAM1 - protein farnesyltransferase, beta subunit	-2.3			
W40um030G_at	um10528	related to STE6 ABC transporter	-2.0			

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/MUMDB Annotation	Expressionsänderung	FunCat ²		CCR ³
			x-fach	1.05	20	
Transport						
von Kohlenhydraten						
C85um257G_at	um05764	related to Malic acid transport protein	28.5	+	+	+
W45um126G_at	um10072	probable monosaccharide transporter	3.2	+	+	+
C85um097G_at	um11514	probable High-affinity glucose transporter (strong similarity to Hxt15p and Hxt17p)	3.1	+	+	+
C60um135G_at	um01656	probable sugar transporter *	4.1		+	
andere Substrate						
W45um084G_at	um06253	probable DUR3 - Urea permease	6.9		+	
C65um192G_at	um00196	probable FUN34 - transmembrane protein involved in ammonia production	5.1	+	+	
W45um057G_at	um06085 ⁵	conserved hypothetical protein	3.0	+	+	
C90um024G_at	um01528	conserved hypothetical protein	3.2		+	
W45um171G_at	um00056	probable neutral amino acid permease	2.5		+	
W10um232G_at	um04538	probable DAL5 - Allantoate and ureidosuccinate permease	-4.0		+	
C65um280G_at	um00374 ⁶	probable DAL5 - Allantoate and ureidosuccinate permease	-3.0		+	
C15um066G_at	um04197	related to purine-cytosine permease	-3.2		+	
W155um099G_at	um05889	Ump2 - High Affinity Ammonium transporter	-2.4		+	
C85um201G_at	um00842	probable aflatoxin efflux pump AFLT	-2.0		+	
C80um003G_at	um01965	related to ferroportin 1	-2.2		+	
W25um089G_at	um10815	conserved hypothetical protein	-2.2		+	
monovalente Kationen						
W200um019G_at	um06433	Acu1 - K, P-type ATPase	4.8		+	
C45um186G_at	um04742	related to stomatin	2.9		+	
C55um069G_at	um05038	Acu2 - K, P-type ATPase (mediates high-affinity potassium or sodium uptake)	2.3		+	
Metabolismus						
Kohlenhydrat-Metabolismus						
W45um025G_at	um04133	related to NAD(P)H-dependent oxidoreductase	7.6	+		
C20um268G_at	um04481	related to ADH2 - Alcohol dehydrogenase II	4.3	+		+
C5um158G_at	um01775	conserved hypothetical protein *	-2.2	+		
C26um005G_at	um05848	related to galactoside O-acetyltransferase	-2.4	+		
W140um132G_at	um05170	probable formate dehydrogenase	-2.7	+		
Arabinose-Metabolismus						
crg1_cDNA_at	um03416	Crg1 carbon source-regulated protein (putative arabinase)	74.7	+		+
C160um117G_at	um11944	probable GCY1 galactose-induced protein of aldo/keto reductase family	3.0	+		+
C50um228G_at	um01921	probable XKS1 xylulokinase	2.2			+
Polysaccharid-Metabolismus						
C85um108G_at	um01165	related to Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	10.3			

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/MUMDB Annotation	Expressionsänderung x-fach	FunCat ²		
				1.05	20	CCR ³
W35um022G_at	um00118	probable UDP-glucose 6-dehydrogenase	-2.1	+		
W85um096G_at	um03949	probable 4-alpha-glucanotransferase / amylo-1,6-glucosidase (glycogen-debranching enzyme)	-2.2	+		
Citratzyklus						
C45um172G_s_at	um02899	probable aconitase	2.6	+		
W60um108G_at	um01172	probable SDH1 - succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein precursor, mitochondrial	2.1	+	+	
Aminosaccharid-Metabolismus (N-Glycan Biosynthese)						
W80um124G_at	um10232	probable cytochrome b5	2.3		+	
W30um243G_at	um10484	related to ALG7UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase	2.0	+		
W20um235G_at	um05152	conserved hypothetical protein	-2.4			
C15um235G_at	um05153	related to MNT4 - putative alpha-1,3-mannosyltransferase	-3.0			
Purin-Metabolismus						
W30um228G_at	um01926	related to DAL2 - allantoinase	2.1			
C115um163G_at	um00672	probable urate oxidase (uricase)	-2.2			
Aminosäure-Metabolismus						
W170um056G_at	um01858	conserved hypothetical protein	4.0			
C90um073G_at	um05740	probable ILV3 - dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial precursor	2.1			
W30um074G_at	um01830	related to alpha-aminoacidate reductase	-2.1			
C50um031G_at	um03568	related to regulatory protein alcR	-2.2			
Sekundärmetabolismus						
C125um013G_at	um03524	related to peroxisomal amine oxidase (copper-containing)	28.1			
W130um013G_at	um03523	probable aldehyde dehydrogenase	5.2	+	+	
C200um003G_at	um10454	related to 4-coumarate-CoA ligase	3.0			
W90um063G_at	um05361	related to Laccase I precursor	2.4			
C59um169G_at	um11700	conserved hypothetical protein	2.2		+	
W25um008G_at	um04362	related to Cytochrome P450 8B1	-2.7		+	
DNA Synthese und Reparatur/ RNA Degradation						
W160um074G_at	um10881	probable ribonuclease T1	6.6			
C50um232G_at	um04529	related to POL1 - DNA-directed DNA polymerase alpha, 180 KD subunit	2.4			
Zellwandaufbau/-umstrukturierung						
W50um094G_at	um00891	related to cell wall protein UTR2	5.4			
C20um086G_at	um06190	related to Chitinase	5.3			
C30um217G_at	um04503	related to Alpha-N-acetylgalactosaminidase precursor	4.5	+		

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/MUMDB Annotation	Expressionsänderung		CCR ³
			x-fach	FunCat ² 1.05 20	
C45um177G_at	um11922	related to Chitin deacetylase precursor	3.6		
W95um036G_at	um02758	related to Chitinase A precursor	2.4		
Pflanzenzellwand abbauende Enzyme					
C110um127G_at	um04884	related to cellulase	4.2		+
C65um135G_at	um01655 ⁷	related to lipase family	4.0		+
C110um222G_at	um01422	probable Lipase B precursor	2.1		+
C85um108G_at	um01165 ⁹	related to Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	10.3		
W90um063G_at	um05361 ⁹	related to Laccase I precursor	2.4		
sekretierte Proteinase					
C105um137G_at	um10281	related to extracellular aspartic proteinase	4.5		
C85um035G_at	um06118	related to Tripeptidyl-peptidase I precursor	2.3		
Energiehaushalt/Respiration					
C97um209G_at	um10002	related to NADH-dependent flavin oxidoreductase	5.4		+
C40um015G_at	um11534	probable CYT1 - cytochrome c1, heme protein	2.9		+
C20um064G_at	um00634	probable NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit, mitochondrial precursor	2.1		+
W100um099G_at	um11038	probable NADH-ubiquinone oxidoreductase 19.3 kDa subunit, mitochondrial precursor	2.1		+
Nicht-Klassifiziert					
C140um075G_at	um06071	related to Para-nitrobenzyl esterase	-4.8		
C51um184G_at	um05508	probable GTP-binding protein 1	-2.1		
W5um184G_at	um05522	related to suppressor protein PSP1	-2.1		
Funktion unbekannt					
W15um280G_at	um00384	hypothetical protein *	-33.4		
W25um114G_at	um10717	conserved hypothetical protein (fragment)	-10.7		
W65um063G_at	um05366	conserved hypothetical protein	-7.8		
C30um146G_at	um05959	conserved hypothetical protein	-7.4		
W105um049G_at	um00102	conserved hypothetical protein	-7.2		
W60um167G_at	um04248	putative protein *	-6.2		
C90um112G_at	um11544	putative protein	-5.2		
W60um280G_at	um00375	conserved hypothetical protein	-4.9		
W115um178G_at	um02002	putative protein	-4.6		
W30um122G_at	um01696	conserved hypothetical protein	-4.4		
C25um139G_at	um01351	putative protein	-4.1		
W135um054G_at	um00647	conserved hypothetical protein	-4.0		
C30um003G_at	um01976	putative protein	-3.8		
W50um041G_at	um05386	putative protein	-3.4		

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/MUMDB Annotation	Expressionsänderung x-fach	FunCat ²		
				1.05	20	CCR ³
C65um152G_at	um05270	conserved hypothetical protein	-3.2			
W60um152G_at	um05272	conserved hypothetical protein	-3.2			
W20um276G_at	um05997	putative protein	-3.2			
W45um169G_at	um11702	conserved hypothetical protein	-3.0			
C120um068G_at	um04910	conserved hypothetical protein	-3.0			
C39um043G_at	um02798	hypothetical protein	-3.0			
C75um055G_at	um03982	hypothetical protein	-2.8			
C121um068G_at	um04910	conserved hypothetical protein	-2.8			
W20um114G_at	um05633	conserved hypothetical protein	-2.6			
W115um074G_at	um01812	conserved hypothetical protein	-2.4			
UG24-1d14-47c8_RC_at	um00813	conserved hypothetical protein	-2.2			
W65um186G_at	um04748	putative protein	-2.2			
C35um276G_at	um06002	hypothetical protein	-2.2			
C75um112G_at	um11546	putative protein	-2.2			
W45um213G_at	um03658	conserved hypothetical protein	-2.1			
W12um235G_at	um10186	putative protein *	-2.1			
W142um055G_at	um11742	putative protein	-2.0			
C40um092G_at	um03795	putative protein	2.0			
C120um140G_at	um10660	hypothetical protein	2.1			
C40um184G_at	um05514	conserved hypothetical protein	2.1			
W180um175G_at	um02701	hypothetical protein	2.1			
EST01um122_at	um01694	conserved hypothetical protein	2.1			
W105um119G_at	um01725	conserved hypothetical protein	2.1			
C15um268G_at	um04482	conserved hypothetical protein	2.1			
W75um036G_at	um02763	conserved hypothetical protein	2.2			
W75um158G_at	um10871	conserved hypothetical protein	2.2			
W35um144G_at	um11063	conserved hypothetical protein (fragment)	2.2			
W130um209G_at	um00027	putative protein	2.3			
C117um228G_at	um01902	conserved hypothetical protein	2.3			
W120um074G_at	um10248	conserved hypothetical protein	2.4			
C95um083G_at	um03138	hypothetical protein	2.4			
W55um193G_at	um10046	conserved hypothetical protein	2.5			
C52um065G_at	um04145	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	2.5			
W82um185G_at	um05483	hypothetical protein	2.6			
W5um267G_at	um06125	putative protein	2.7			
W7um082G_s_at	um04617	hypothetical protein	2.7			
C80um257G_at	um05762	putative protein	2.7			
UG21-15112-111f4_RC_at	um03394	conserved hypothetical protein	3.0			
W70um213G_at	um03651	hypothetical protein	3.0			
C115um125G_at	um05300	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	3.0			
C20um272G_at	um03614	conserved hypothetical protein	4.0			
W50um040G_at	um00738	putative protein	4.8			

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/MUMDB Annotation	Expressionsänderung	FunCat ²		
			x-fach	1.05	20	CCR ³
C100um026G_at	um10135	conserved hypothetical protein	5.1			
C15um206G_at	um06497	putative protein	5.3			
C155um002G_at	um03932	hypothetical protein	6.7			
W16um206G_at	um00826	hypothetical protein	8.4			
C115um211G_at	um04557	hypothetical protein	9.0			
W55um164G_at	um00466	hypothetical protein	9.3			
W55um164G_x_at	um00466	hypothetical protein	9.8			
C110um002G_at	um03923 ⁸	putative protein	10.5			
C140um003G_at	um01949	putative protein	13.3			
C111um183G_at	um05528	conserved hypothetical protein	15.8			
C40um084G_at	um06255	hypothetical protein	25.6			
W60um134G_at	um05104	putative protein *	38.8			
Kontrollen						
nat_at	-	bacterial nourseothricin resistance gene	3.1			
nat_x_at	-	bacterial nourseothricin resistance gene	2.4			
C25um205G_at	um04474	Gpa3 - Guanine nucleotide-binding protein alpha-3 subunit	-37.6			

¹ <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>

² Funktionelle Klassifizierung der Proteine nach dem "MIPS Functional Catalogue" (FunCat Version 2.1). Die Kategorie 1.05 enthält Proteine des Kohlenhydrat-Metabolismus („C-compound & Carbohydrate Metabolism“) und die Kategorie 20 Proteine des zellulären Transports („cellular Transport“).

³ CCR („Carbon Catabolite Repression“) Genexpression unterliegt in anderen Organismen der Glucose-Katabolit-Repression

⁴ Paralog zu um05782 (29%)

⁵ Paralog zu um00196 (putatives Fun34-Protein) (40%)

⁶ Paralog zu um04538 (28%); die Distanz in der Genomsequenz zu um00375 (conserved hypothetical protein) beträgt 0,3 kb.

⁷ benachbart zu um01656 (probable sugar transporter) (Distanz 3,8 kb)

⁸ benachbart zu um 03924 (Rep1) (Distanz 7,8 kb)

⁹ um01165 und um05361 sind wiederholt in der Kategorie Metabolismus aufgeführt

* gekennzeichnete Proteine wurden zugleich als Proteinkinase A-regulierte Gene identifiziert (Larraya et al. 2005)

Tabelle 11. Einordnung der differentiell regulierten Gene von FB1 Δ gpa3 in die funktionellen Kategorien der Datenbank MUMDB.

MUMDB-Kategorien ¹	Anzahl der Gene ²	Prozentualer Anteil der differentiell regulierten Gene
Metabolismus	35	21,7
Energiestoffwechsel	12	7,5
DNA Prozessierung	5	3,1
Proteinsynthese, -modifizierung	6	3,7
Zellulärer Transport	26	16,1
Signalweiterleitung	2	1,2
Stressantwort & Virulenz	10	6,2
Biogenese zellulärer Komponenten	5	3,1
Zelldifferenzierung	2	1,2
Nicht-Klassifizierte	103	63,9

¹ (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>)

² Einzelne Gene sind hier zum Teil mehreren Kategorien zugeordnet.

2.4.4.6 Vergleichende Analyse der Genexpression in FB1 Δ gpa3 mit der Genexpression in Mutanten des cAMP-Signalwegs

Zur Bestimmung des Anteils der 161 differentiell regulierten Gene in FB1 Δ gpa3 die strikt cAMP-abhängig reguliert werden, wurde der vorliegende Datensatz mit früheren transkriptomweiten Analysen einer Adenylatzyklase-Deletionsmutante FB1 Δ uac1 (M. Vranes, persönl. Mitteilung) und der induzierten Expression der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (Eichhorn et al., 2006) verglichen. Die Transkriptom-Analyse des Stammes FB1 Δ uac1 umfasste die Expressionsänderung nach Transferieren des Stammes von cAMP-haltigem (6 mM cAMP) in cAMP-freies Glucose-Array-Minimalmedium. Von insgesamt 118 Probensets, die 80 min nach dem Mediumwechsel mindestens zweifach differentiell reguliert waren, fanden sich in FB1 Δ gpa3 35 koregulierte Probensets (30%) aller Kategorien (Abb. 29). Von 106 Probensets, die 180 min nach dem Mediumwechsel differentiell exprimiert waren, waren in FB1 Δ gpa3 50 der Probensets (47%) koreguliert. Darin enthalten sind 29 überlappende Probensets, die zu beiden Zeitpunkten und in FB1 Δ gpa3 als differentiell reguliert identifiziert wurden. Insgesamt waren 56 der 161 differentiell regulierten Gene (35%) übereinstimmend in FB1 Δ uac1 induziert bzw. reprimiert, was die cAMP-abhängige Regulierung dieser Gene bestätigt. Die restlichen, nicht-übereinstimmenden differentiell regulierten Transkripte lassen sich unter anderem durch die unterschiedlichen Versuchsansätze erklären. Hier wurde die veränderte Basalexpression im Stamm FB1 Δ gpa3, der ohne cAMP kultiviert wurde, mit der transkriptionellen

Änderung in FB1 Δ uac1 verglichen, der in cAMP-haltigem Medium vorkultiviert wurde und lediglich für 80 min bzw. 180 min in Medium ohne cAMP kultiviert wurde. Dies wird auch deutlich an der zunehmenden Ähnlichkeit der Expressionsprofile zwischen FB1 Δ uac1 und FB1 Δ gpa3 zum späteren Zeitpunkt von 180 min. Nach 180 min sind bereits deutlich mehr übereinstimmende Gene in beiden Stämmen differentiell exprimiert als nach 80 min.

Im zweiten Vergleich wurden differentiell regulierte Gene in FB1 Δ gpa3 und dem induzierten Stamm FB1P_{crgl}:adr1 analysiert. In FB1P_{crgl}:adr1 wurde die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A, *adr1*, für 75 min bzw. 180 min überexprimiert. Dabei wurden nach 75 min 745 differentiell exprimierte Gene identifiziert, nach 180 min 623 Gene (Eichhorn et al., 2006). Zum Zeitpunkt 75 min gab es eine Überlappung von 61 Genen (8%), die auch in FB1 Δ gpa3 differentiell exprimiert waren. 50 dieser Gene zeigten eine inverse Regulation, 11 waren koreguliert in beiden Stämmen. Dies entsprach der Erwartung, da sich die Genexpression nach künstlicher Aktivierung des cAMP-Signalwegs konträr zur Genexpression im Stamm FB1 Δ gpa3 verhalten sollte, der vermutlich eine reduzierte cAMP-Synthese hat. Nach 180 min waren 51 Gene in FB1 Δ gpa3 (8%) differentiell exprimiert, 31 davon koreguliert und 20 entgegengesetzt reguliert im Vergleich zu FB1P_{crgl}:adr1. Unter den 20 entgegengesetzt regulierten Genen waren neun, die nach 75 min noch koreguliert waren. Dies deutet darauf hin, dass diese Gene wahrscheinlich zeitlich verzögert auf die Aktivierung des cAMP-Signalwegs reagieren.

Aus beiden Vergleichen konnte nun eine Liste von 85 Genen erstellt werden, deren Basalexpression durch *gpa3* reguliert wird und Gene beinhaltet, deren Expression sich nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs ändert (Tab. 15 im Anhang).

2.4.4.7 Vergleichende Analyse der Genexpression in FB1 Δ gpa3 mit der Genexpression nach Pheromonstimulation

Aufgrund der defekten Pheromonantwort in *gpa3*-Deletionsmutanten wurde erwartet, dass in dieser Mutante auch die Expression von Genen, die für Proteine der Pheromonantwort kodieren, gestört ist. Zum Abgleich von differentiell regulierten Genen in FB1 Δ gpa3 mit Genen, die nach Pheromonstimulation eine Induktion oder Reprimierung zeigen, wurde die Genexpressionsanalyse von FB1 zum Zeitpunkt 75 min nach Pheromonzugabe zugrundegelegt (Zarnack, 2006). Beide Microarray-Experimente waren in Glucose-Array-Minimal durchgeführt worden. Bei diesem Vergleich wurden 43 Gene identifiziert, die in beiden Stämmen differentiell reguliert waren. Dies entspricht einem Anteil von 10% der

insgesamt 411 Pheromon-induzierten Gene. Von den 43 differentiell regulierten Genen waren 26 Transkripte koreguliert und 17 Transkripte invers reguliert. Unter den invers regulierten Genen waren wie erwartet Gene, die für Proteine mit Funktionen in der Pheromonsekretion, -erkennung und Ausbildung des dikaryotischen Filaments (*bW1*, *ram1*, *ste6* und *pral*) sowie der Zellwandumstrukturierung (*um02758*) kodieren.

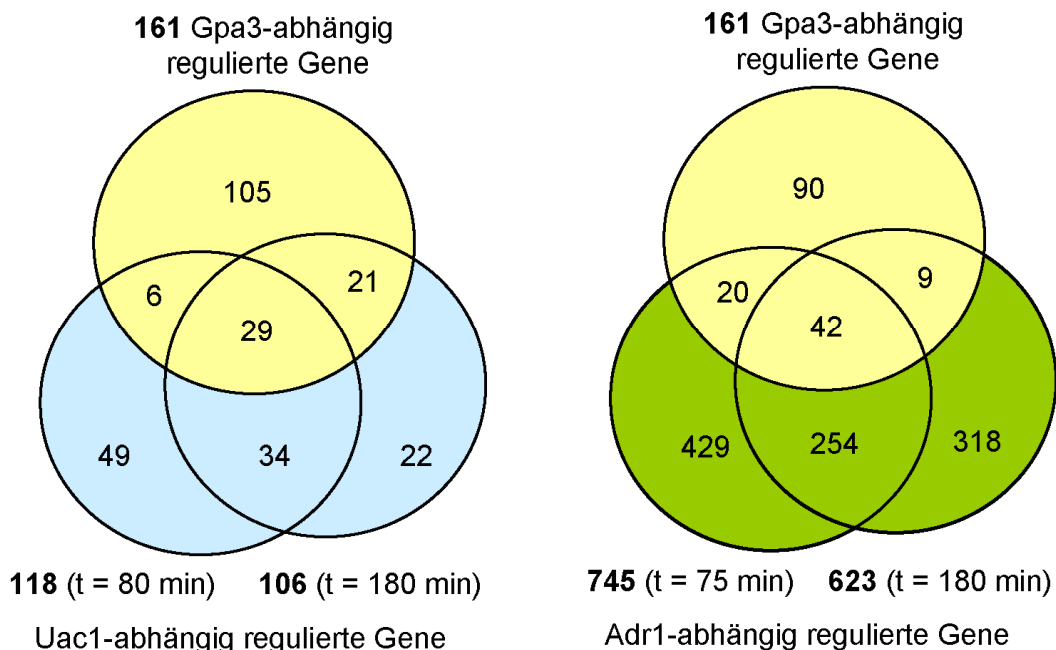


Abbildung 29. Vergleichende Transkriptom-Analyse von $FB1\Delta gpa3$ mit früheren Studien. A) Die Gesamtzahl aller differentiell regulierten Gene in $FB1\Delta gpa3$ verglichen mit den beiden untersuchten Zeitpunkten in $FB1\Delta uac1$. B) Differentiell regulierte Gene in $FB1\Delta gpa3$ verglichen mit den beiden untersuchten Zeitpunkten nach Arabinose-Induktion von $FB1P_{crg1}:adr1$.

2.4.4.8 Untersuchung zur Rolle von Gpa3 in der Glucoserepression des *crg1*-Promotors

In der Transkriptomanalyse von $FB1\Delta gpa3$ wurde gezeigt, dass Gene des Arabinose-Metabolismus, die normalerweise in Glucose-haltigem Medium reprimiert sind, in dieser Mutante induziert sind. Um zu testen ob Gpa3 für die Glucose-vermittelte Repression des Arabinose-Promotors P_{crg1} (Bottin et al., 1996, Brachman et al., 2001) essentiell ist, wurde in einem $FB2$ -Testerstamm (RU12, Brachmann et al., 2001), der das Reporterkonstrukt $P_{crg1}:sgfp$ in den *ip*-Locus integriert hat, der offene Leserahmen von *gpa3* deletiert. Die erhaltenen Deletionsstämme wurden durch Southern-Blot-Analyse verifiziert und zeigten einen typischen Phänotyp von Deletionsstämmen im cAMP-Signalweg (Abb. 17 bzw. nicht gezeigt). Wenn Gpa3 für die Glucose-vermittelte Repression des *crg1*-Promotors essentiell

ist, ist zu erwarten, dass es in dem Stamm RU12 Δ gpa3 zu einer induzierten *sgfp*-Expression kommt, die die basale Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Stämme RU12 Δ gpa3 und RU12 (Referenzstamm) wurden dafür in CM-Glucose Vollmedium mit 6 mM cAMP vorkultiviert. cAMP wurde dem Medium zugegeben um in RU12 Δ gpa3 die aberrante Zellmorphologie zu unterdrücken und Suppressormutationen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in CM-Glucose oder CM-Arabinose mit oder ohne Zugabe von 6 mM cAMP aufgenommen. Nach 2,5 h und 6 h Inkubation bei 28°C, wurden Proben zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität genommen. In glucosehaltigem CM-Medium wurde in beiden Teststämmen unter allen Bedingungen der *crg1*-Promotor in gleichem Maße reprimiert und es war nur basale Hintergrundfluoreszenz der Zellen zu detektieren (Abb. 30, blaue Balken). In Arabinose-haltigem Medium wurde die *sgfp*-Expression in beiden Stämmen induziert, wobei die Induktion in RU12 Δ gpa3 stärker war (keine Angabe zur Signifikanz, da Experiment nicht wiederholt). Die Induktion der *sgfp*-Expression in arabinosehaltigem Medium war dagegen in beiden Stämmen schwächer, wenn 6 mM cAMP zugegeben worden war. 4,5 h nach Induktion wurde in allen Stämmen eine ähnliche Fluoreszenzintensität erreicht, möglicherweise weil Gfp in den Zellen angereichert wurde. Somit war Gpa3 in diesem Experiment unter den getesteten Bedingungen nicht essentiell für die Glucose-Reprimierung des *crg1*-Promotors.

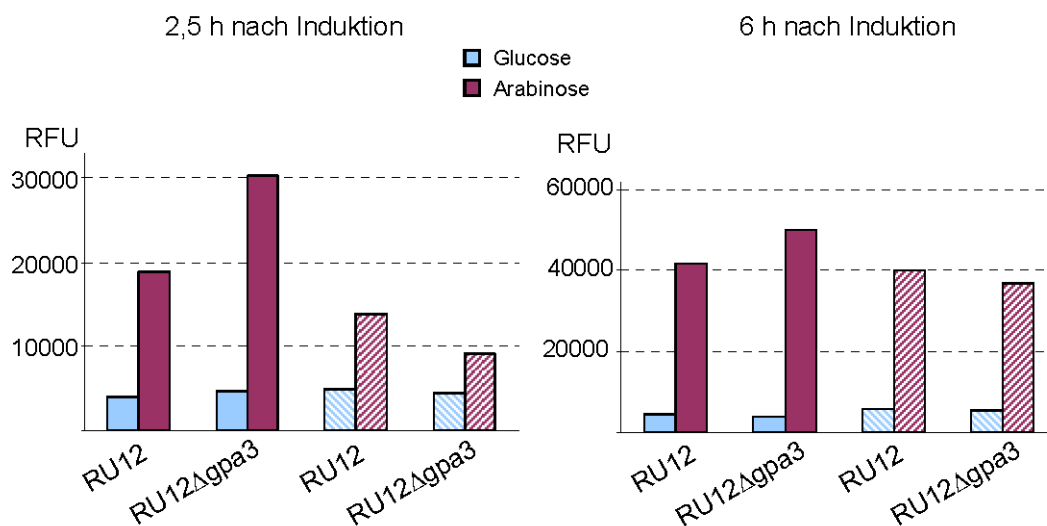


Abbildung 30. Glucosereprimierung des *crg1*-Promotors in einem *gpa3*-Deletionsstamm. Angegeben sind relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) der Gfp-Fluoreszenz in FB2P_{crg1}:*sgfp* Δ gpa3 und FB2P_{crg1}:*sgfp*. Die Stämme wurden für die über den Diagrammen angegebenen Zeiten in CM-Vollmedium mit Glucose (blaue Balken) oder Arabinose (violette Balken) mit 6 mM cAMP (schraffierte Balken) oder ohne cAMP-Zugabe (nicht-schraffierte Balken) kultiviert. Die basale Hintergrundfluoreszenz der Zellen wurde nicht abgezogen.

2.5 Biochemische Aufreinigung des Pheromonrezeptors

Die bisher beschriebenen Experimente basierten auf der Annahme einer direkten Interaktion des Pra1-Rezeptors mit einer $G\alpha$ -Untereinheit. Da in Gegenwart von cAMP auch in kompatiblen Mischungen der $G\alpha$ -Nullmutante Paarung möglich ist, sind möglicherweise andere, G-Protein-unabhängige Signaltransduktions-Mechanismen an diesem Prozess beteiligt. Um mit Pra1 interagierende Proteine zu isolieren wurde daher die biochemische „Tandem-Affinity“-Aufreinigung (Rigeaut et al., 1999) zum erstenmal für ein integrales Membranprotein in *U. maydis* etabliert. Bisher wurde diese Methode erfolgreich für die Identifikation Rezeptor-assoziiierter Proteine in *C. elegans* angewandt (Gottschalk et al., 2005).

Die Verwendung von Pra1 fusioniert an das „TAP“-Protein erlaubt eine zweistufige Proteinaufreinigung von Pra1 mit assoziierten Proteinen unter milden Bedingungen. Das verwendete „TAP“-Fusionsprotein besteht aus einer Igg-Bindedomäne und, separiert durch eine Schnittstelle für die TEV-Protease, einer Calmodulin-Bindedomäne. Der Stamm FB1pra1:TAP, der das Pra1:TAP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *pra1*-Promotors vom natürlichen Locus aus exprimiert, zeigte eine zum FB1-Wildtypstamm vergleichbare Pheromonantwort (nicht gezeigt). Das TAP-Fusionsprotein scheint also keine für die Signalweiterleitung wichtigen Bindestellen im Pra1-Rezeptor zu beeinträchtigen. Um unspezifisch mit dem TAP-Fusionsprotein interagierende Proteine identifizieren zu können, wurde in einem *pra1*-Deletionsstamm nur das TAP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *pra1*-Promotors exprimiert. Der Stamm FB1 Δ pra1P_{pra1}:TAP reagierte wie erwartet nicht auf Pheromonstimulation.

In einem Vorexperiment wurde aus je 1 L nicht-pheromonstimulierter Kultur von FB1pra1:TAP und FB1 Δ pra1P_{pra1}:TAP nach aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten und Solubilisierung die Membranfraktion angereichert, die anschließend über zwei affinitätschromatographische Schritte, eine Igg-Festphase und eine Calmodulin-Festphase, aufgereinigt wurde (siehe Material und Methoden). Das Pra1:TAP-Protein sowie das TAP-Protein alleine konnten mit einem Antikörper gegen die Igg-Bindedomäne in der ersten aufgereinigten Fraktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Nach Entfernen der Igg-Bindedomäne durch Schneiden mit der TEV-Protease konnten beide Proteine in der zweiten aufgereinigten Fraktion mit einem Antikörper gegen die Calmodulin-Bindedomäne (CBP-Antikörper) nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In der HPLC-MS-Analyse der aufgereinigten Fraktion konnte das Pra1-Rezeptorprotein jedoch nicht detektiert werden.

In einem weiteren Experiment wurde das Pra1:TAP-Fusionsprotein aus 3 L *U. maydis*-Kultur isoliert und konnte reproduzierbar in der aufgereinigten Fraktion mit einem CBP-Antikörper detektiert werden (Abb. 31). Es war jedoch weder möglich das Pra1:TAP-Fusionsprotein in einem Commassie- oder silbergefärbten Proteingel zu detektieren noch mittels Nano-HPLC und nachfolgender MS-Analyse nachzuweisen. Dies deutet auf eine äußerst geringe Expression des Pra1-Rezeptors hin. Da es möglich war das Pra1:TAP-Protein aufzureinigen und mit der TEV-Protease zu schneiden, weist darauf hin, dass das Tap-Fusionsprotein im richtigen Leserahmen an Pra1 fusioniert und funktionell war. Für eine erfolgreiche Identifizierung von Pra1-Rezeptor-assoziierten Proteinen wird es daher nötig sein, die Ausgangsmenge an *U. maydis*-Kultur für die Proteinisolation um ein Vielfaches zu erhöhen.

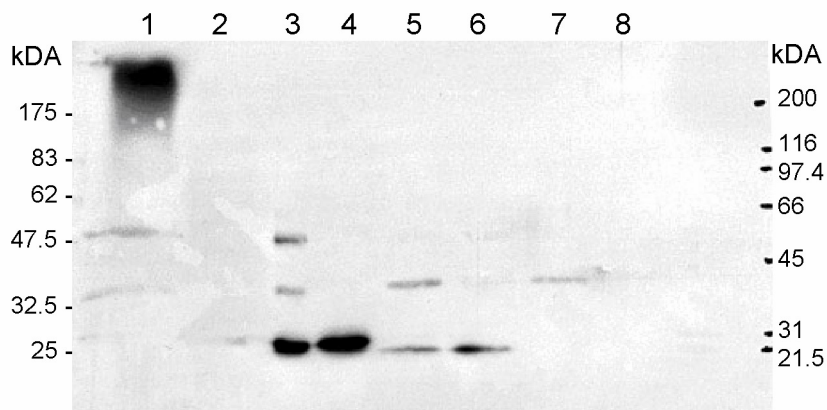


Abbildung 31. Detektion von Pra1:TAP bei ~ 61 kDA (ungeschnitten) und ~ 45 kDA nach der Behandlung mit TEV-Protease. Detektiert wurde mit einem CBP-Antikörper gegen die Calmodulin-Bindedomäne des TAP-Fusionproteins. Spur 1: Gesamtprotein von FB1pra1:TAP. Spur 2: Gesamtprotein des Kontrollstammes FB1 Δ pra1, der cytoplasmatisches TAP-Fusionsprotein exprimiert. Spur 3: Proteine von FB1pra1:TAP, die an die Igg-Festphase gebunden haben. Spur 4: Proteine von FB1 Δ pra1, die an die Igg-Festphase gebunden haben. Spur 5: FB1pra1:TAP-Eluat nach TEV-Protease-Behandlung. Spur 6: FB1 Δ pra1-Eluat nach TEV-Protease-Behandlung. Spur 7: FB1pra1:TAP-Proteine, die an die Calmodulin „beads“ gebunden haben. Spur 8: FB1 Δ pra1-Proteine, die an die Calmodulin-Festphase gebunden haben. Das Signal bei ~ 20 kDA entspricht der Größe von TAP.

2.6 Charakterisierung weiterer Signalkomponenten

2.6.1 Phänotypische Charakterisierung von *ras1*-Deletionsstämmen

Zur Untersuchung weiterer Signalkomponenten, die den Pheromonsignalweg beeinflussen könnten, wurde eine *ras1*-Deletionsmutante in *U. maydis* hergestellt und charakterisiert.

Dazu wurde der gesamte offene Leserahmen von um00986 in FB2 und FB1 durch eine NAT-Resistenzkassette über homologe Rekombination ersetzt. Die erhaltenen, im Southern-Blot und mittels PCR verifizierten Transformanten zeigten eine stark aberrante Zellmorphologie (Abb. 32). Die Einzelzellen waren deformiert, kürzer und runder oder zitronenförmig im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Weiterhin wurden oft Zellaggregate aus zusammenhängenden Zellen bzw. Zellabschnitten mit mehr oder weniger starker Einschnürung beobachtet, die in der Mitte kugelige Zellen enthielten. Die Bildung dieser Zellaggregate zeigte sich in YEPS_L- und CM-Glucose-Flüssigmedium als auch auf PD-Festagar. Das Wachstum dieser Stämme war stark verlangsamt; auf PD-Festagar wie auch in Flüssigkultur benötigten die Zellkulturen einen Tag länger um dieselbe Koloniegröße bzw. optische Dichte wie der Wildtypstamm zu erreichen.

Zur detaillierteren Analyse dieser Zellmorphologie wurde zunächst die Zellwand mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und untersucht. Der Fluoreszenzfarbstoff Calcuofluor färbt in Wildtyp-Zellen die Septen und die Hyphenspitze, an der das polare Wachstum stattfindet (Abb. 32A). In *ras1*-Deletionsmutanten dagegen konnten mehrere Septen detektiert werden und der Farbstoff verteilte sich fast gleichmäßig in der ganzen Zellwand. Dies deutet auf den Verlust des polaren Wachstums hin und erklärt die rundliche Zellform. Mit dem Farbstoff WGA („wheat germ agglutinin“), ein Lectin das an Chitin-Oligomere bindet, werden aktiv wachsende Zellbereiche, Zonen an denen sich zwei Zellen getrennt haben („bud scar“) und neu-geformte Septen in der Phase der Zellseparation angefärbt. Auch WGA zeigte übereinstimmend mit einem Verlust des polaren Zellwachstums im *ras1*-Deletionsstamm eine gleichmäßige Verteilung in der Zellwand (Abb. 32B). Besonders deutlich war dies an älteren, isotrop wachsenden Zellen in der Mitte von Zellaggregaten zu sehen. Zur Visualisierung der Verteilung der Zellkerne wurden Zellen des *ras1*-Deletionsstammes und des Wildtypstammes mit DAPI angefärbt und mikroskopiert. Während im Wildtypstamm ein Zellkern pro Zelle angefärbt wurde, enthielten *ras1*-deletierte Zellen mehrere Zellkerne pro Zellabschnitt (Abb. 32C). Die Mitose und Trennung der Zellkerne scheint also in diesem Stamm noch stattzufinden.

Um analog zur *ras2*-Deletionsmutante (Lee & Kronstad, 2002) auch die Pheromonantwort in FB2 Δ ras1 zu testen wurde eine a1-Pheromonstimulation mit und ohne Zugabe von 6 mM cAMP durchgeführt. Durch die Zugabe von cAMP wurde versucht die Expression der Pheromongene zu induzieren und gegebenenfalls die Morphologie zu beeinflussen. Sowohl die Pheromonstimulation als auch die cAMP-Behandlung führte zu keiner Änderung in der Zellmorphologie im Vergleich zu unstimulierten Zellen (nicht gezeigt).

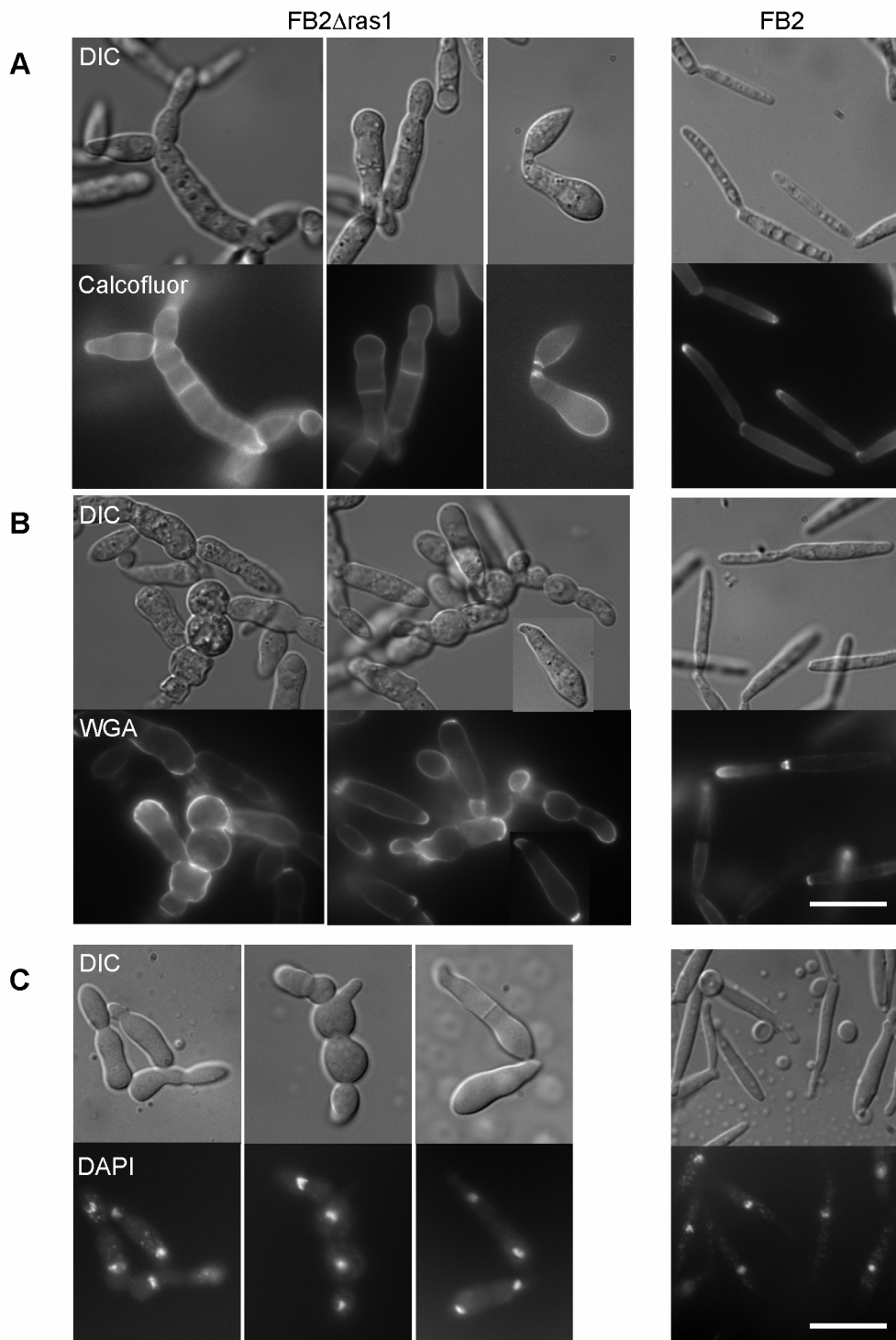


Abbildung 32. Phänotypische Charakterisierung von FB2 Δ ras1. A) Lichtmikroskopische Aufnahmen (obere Bildreihe) sowie Epifluoreszenz-Aufnahmen nach Calcofluor-Anfärbung (untere Bildreihe) von Zellen der *ras1*-Deletionsmutante und Wildtypzellen. B) Visualisierung der aktiven Wachstumszonen wie in A) aber mit WGA-Färbung. C) Visualisierung der Zellkerne wie in A) aber mit DAPI-Färbung. Der Größenstandard entspricht 10 μ m.

3 Diskussion

3.1 Die Auswirkung der Deletion des C-Terminus von Pra1 auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade

Der Verlust des C-Terminus des Pheromonrezeptors Pra1 in *U. maydis* hatte zur Folge, dass zwar die morphologische Pheromonantwort, die Konjugationshyphenbildung, gestört war, die Zellen jedoch noch mit Wildtypzellen fusionieren konnten und transkriptionell das Pheromongen *mfa1* induzierten. Wie bereits bekannt war, wird die Ausbildung der Konjugationshyphen durch die aktivierte MAPK-Kaskade induziert, was durch die genetische Aktivierung der MAPK-Kinase Fuz7 (Fuz7DD) und MAPKK-Kinase Kpp4 (Kpp4-2) gezeigt werden konnte (Müller et al., 2003a). Ein intakter cAMP-Signalweg ist aber Voraussetzung für die Basalexpression und Induktion der Pheromongene (*mfa1*, *pra1*) und damit zur Erkennung des Pheromonsignals sowie für die Zellfusion (Regenfelder et al., 1997; Bölker, 1998; Krüger et al., 1998). Deletionsmutanten in Komponenten des cAMP-Signalwegs zeigen daher ebenfalls keine Ausbildung von Konjugationshyphen, dieser Defekt kann jedoch durch cAMP-Zugabe teilweise revertiert werden (Müller et al., 2004).

Der untersuchte Stamm FB1pra1¹⁻²⁹⁰:gfp zeigte Zellfusion und Pheromon-induzierte *mfa1*-Expression, was auf einen funktionstüchtigen cAMP-Signalweg hindeutet. Darüber hinaus konnte die defekte Konjugationshyphenbildung nicht durch externe cAMP-Zugabe während der Pheromonstimulation induziert werden, was bestätigt, dass der cAMP-Spiegel ausreichend war. Damit ist es wahrscheinlich, dass durch die Deletion des C-Terminus in Pra1 die Pheromon-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade gestört ist. Da ausreichend Rezeptormoleküle für die Zellfusion und Induktion des Pheromogens *mfa1* in Stämmen mit C-terminal verkürztem Rezeptor vorhanden sind, ist es unwahrscheinlich, dass die fehlende Aktivierung der MAPK-Kaskade aufgrund von Instabilität des verkürzten Rezeptorproteins oder eine zu geringe Anzahl dieser Rezeptoren in der Plasmamembran verursacht wird. Eine intakte MAPK-Kaskade ist auch von Bedeutung für die Basalexpression der *a*-Gene (*mfa1*, *pra1*), was an der reduzierten basalen und Pheromon-stimulierten *mfa1*-Expression in *kpp2*-Deletionsmutanten gezeigt wurde (Müller, 2003). Nach Expression von Pra1 als Gfp-Fusionsprotein konnte in dieser Arbeit eine reduzierte *mfa1*-Basalexpression beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass das Fusionsprotein die basale Aktivierung der MAPK-Kaskade leicht herabsetzt, obwohl keine funktionelle oder transkriptionelle Beeinträchtigung der Pheromonantwort beobachtet wurde. Für die Pheromon-induzierte *a*-Genexpression ist

die Signalweiterleitung über die MAPK-Kaskade nicht essentiell, sie übt jedoch einen additiven Effekt auf die erreichte *mfa1*-Transkriptmenge aus, da sie zusammen mit dem cAMP-Signalweg den Transkriptionsfaktor Prf1 aktiviert (Kaffarnik et al., 2003, Müller, 2003). Dies würde die Reduzierung der Pheromon-induzierten *mfa1*-Expression im Stamm mit dem C-terminal deletierten Pra1-Rezeptor erklären (siehe Abb. 3C).

Ähnlich zu *U. maydis* kann in den Pheromonrezeptoren von *S. cerevisiae* Ste2p und Ste3p und von *S. pombe* Map3 der C-Terminus deletiert werden ohne die Pheromon-signalweiterleitung an sich zu beeinträchtigen (Nakayama et al., 1985; Konopka et al., 1988; Reneke et al., 1988; Hirota et al., 2001). Der C-Terminus in diesen Rezeptoren wird jedoch für die Pheromon-induzierte morphologische Änderung, die Rezeptor-Endocytose und die Adaptation nach Pheromonstimulation benötigt (Vallier et al., 2002). In Ste2p wurde ein Membran-proximaler Bereich identifiziert, der für die Liganden-induzierte Rezeptor-Endocytose und ein distaler Bereich, der für die konstitutive Rezeptor-Endocytose verantwortlich ist (Chen & Davis, 2000). Wurde nur der distale Bereich deletiert, reichert sich Ste2p in der Plasmamembran an (Chen & Davis, 2000). Dies konnte in *U. maydis* weder in der C-terminal verkürzten noch in der C-terminal deletierten Pra1-Variante anhand einer Zunahme der Gfp-Fluoreszenz in der Plasmamembran beobachtet werden. Da der Pra1-Rezeptor in nicht-stimulierten Zellen generell extrem gering exprimiert wird (Urban et al., 1996a), könnte diese Anreicherung so gering ausfallen, dass sie mit einem Mikroskop nicht detektiert werden kann. Die in *S. cerevisiae* für die Endocytose verantwortlichen Signal-Sequenzen (Rohrer et al., 1993; Hicke et al., 1998; Chen & Davis, 2000) konnten in der Aminosäuresequenz von Pra1 nicht identifiziert werden (eigene Analyse und Fuchs, 2006). Es ist jedoch bekannt, dass das gesamte Rezeptorprotein Pra1:gfp einer konstitutiven Endocytose und Recycling unterliegt (Fuchs et al., 2006). Die Endocytose des Rezeptorproteins ist bei ausreichend vorhandenem Pra1-Rezeptor in der Plasmamembran aber weder für die Pheromon-induzierte *mfa1*-Genexpression noch die Bildung von Konjugationshyphen nötig (Fuchs, 2006). Dies spricht dagegen, dass im Stamm FB1pra1¹⁻²⁹⁰:gfp ein Endocytose-Defekt die alleinige Ursache des Ausbleibens von Konjugationshyphen ist. Im Gegensatz zu den *S. cerevisiae* Pheromonrezeptoren war der C-Terminus von Gpr1p (für die Nährstoffwahrnehmung verantwortlicher Rezeptor) wichtig für die Proteinstabilität (Xue et al., 1998). In *U. maydis* konnte hingegen das gesamte und das verkürzte Rezeptorprotein in vergleichbarer Menge im Western-Blot nachgewiesen werden. Die Proteinstabilität des Pra1-Rezeptors wird somit nicht durch die Deletion des C-Terminus beeinflusst. In GPCRs höherer Eukaryoten enthält der C-Terminus diverse Proteininteraktionsstellen, die der Lokalisation, der Spezifität und Selektivität sowie zeitlichen Koordinierung der

Rezeptorsignalweiterleitung dienen (Neubig, 1998; Bockaert et al., 2003). Darunter ist das gut untersuchte PDZ-Motiv, das in der Aminosäuresequenz von Pra1 nicht identifiziert werden konnte.

Die Beobachtung, dass trotz gestörter Konjugationshyphenbildung noch Zellfusion mit einem Wildtypstamm stattfindet, gab es bereits früher für Deletionsmutanten von Komponenten in der MAPK-Kaskade (Müller, 2003). Im Paarungstest, in dem kompatible Zellen gemischt und dann auf aktivkohlehaltigen-Festagar getropft werden, ist wahrscheinlich die Konjugationshyphenbildung aufgrund der großen räumlichen Nähe der Zellen zueinander nicht nötig und die Zellen können direkt miteinander fusionieren. Unter natürlichen Bedingungen ist die Zelldichte wahrscheinlich deutlich geringer, weshalb hier die Bildung von Konjugationshyphen essentiell sein kann um die Distanz zur kompatiblen Partnerzelle zu überwinden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der C-Terminus des Pra1-Rezeptors nach Pheromonstimulation für die Aktivierung der MAPK-Kaskade benötigt wird und essentiell für die Konjugationshyphenbildung ist.

3.2 Versuche zum Nachweis der direkten Interaktion zwischen dem Pheromonrezeptor und einer $G\alpha$ -Untereinheit in *U. maydis*

Da in früheren Interaktionsstudien unter Verwendung verschiedener Hefe-Zwei-Hybrid-Systeme (CDC42-Ras-*Recruitment*, ein klassisches GAL4- und das Split-Ubiquitin-Hefe-Zwei-Hybrid-System) die physikalische Interaktion des *U. maydis* Pheromonrezeptors Pra1 mit der $G\alpha$ -Untereinheit Gpa3 oder den drei anderen $G\alpha$ -Untereinheiten nicht nachgewiesen werden konnte (Krüger, 1999; Vranes, 2002), wurde in dieser Arbeit der Nachweis mit drei alternativen Methoden versucht. Jedoch blieben auch diese Versuche erfolglos. Nach einer kurzen Diskussion der benutzten Methoden soll im Folgenden ein Überblick über den methodischen Nachweis der direkten Interaktion von GPCRs mit $G\alpha$ -Untereinheiten in anderen Organismen gegeben werden. Vor diesem Hintergrund wird eine Modellvorstellung der putativen Interaktion des Pheromonrezeptors mit einer $G\alpha$ -Untereinheit in *U. maydis* entwickelt.

3.2.1 Auswirkung der Expression von Pra1-Versionen mit mutierten putativen G α -Bindestellen auf die Pheromonsignalweiterleitung *in vivo*

Zunächst wurde untersucht, ob sich die putative Interaktion des Pheromonrezeptors Pra1 mit einer G α -Untereinheit über die Deletion des C-Terminus bzw. die Substitution geladener Aminosäuren in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife unterbinden läßt. Da Deletionsmutanten in den G α -Untereinheiten Gpa1, Gpa2 und Gpa4 eine normale Pheromonantwort aufwiesen (Regenfelder et al., 1997), sollte dies mutmaßlich die Interaktion mit Gpa3, einer Adenylatzyklase stimulierenden Untereinheit (Krüger, 1999), stören.

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, beeinträchtigte die Deletion des C-Terminus von Pra1 die Aktivierung der MAPK-Kaskade. Im Gegensatz zur Pheromonweiterleitung in *S. cerevisiae* und *Cryptococcus neoformans*, in der die MAPK-Kaskade durch die β -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins aktiviert wird (Hirsch & Cross, 1992; Wang et al., 2000), ist in *U. maydis* weder Gpa3 noch die einzige β -Untereinheit Bpp1 daran beteiligt (Krüger et al., 1998; Müller, 2003). Sowohl Gpa3 als auch Bpp1 stimulieren den cAMP-Signalweg (Müller, 2003). Somit sind wahrscheinlich bisher nicht-identifizierte Signalkomponenten in Kontakt mit dem C-Terminus und dienen der Aktivierung der MAPK-Kaskade.

In einigen Studien über GPCRs höherer Eukaryoten wurde gezeigt, dass geladene Aminosäuren in membrannahen Bereichen der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife für die Aktivierung der G α -Untereinheit essentiell sind (Baldwin, 1994). In Anlehnung daran wurden im Pra1-Protein je vier Aminosäuren am Beginn und Ende der dritten cytoplasmatischen Schleife durch Alanine ersetzt. Vorteil gegenüber einer Deletion dieser Bereiche ist, dass die Alanin-Substitutionen das Gesamtgerüst der Proteinschleife erhalten und dabei sterisch und elektrostatisch neutral sind. Diese Mutation führte im Pra1-Rezeptor jedoch nicht zu einer offensichtlichen Beeinträchtigung der Pheromonsignalweiterleitung. Davon ausgehend, dass in diesen Mutanten die Interaktion mit einer G α -Untereinheit, vermutlich Gpa3, gestört sein sollte, könnte man vermuten, dass der Effekt dieser Mutationen sich quantitativ z. B. auf die Pheromon-Induktion des *mfal*-Gens auswirkt und daher in den physiologischen Tests nicht detektiert wurde. Alternativ kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Pheromonsignal über eine bisher unbekannt Komponente weitergeleitet wird, deren Aktivierung durch diese Mutationen nicht beeinflusst wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass im Pra1-Rezeptor andere Bereiche als die hier untersuchten für die Signalweiterleitung von Bedeutung sind. In früheren Studien wurde gezeigt, dass weniger einzelne

geladene Aminosäuren von Bedeutung sind, sondern ihre Verteilung sowie die Gesamtstruktur der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife (Blumer & Thorner, 1991; Clark et al., 1994). Dies wurde ausführlich für den Pheromonrezeptor Ste2p aus *S. cerevisiae* anhand des Alaninaustauschs aller einzelnen Aminosäuren der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife demonstriert (Clark et al., 1994). In solchen Einzelmutanten war die Paarungskompetenz nicht beeinflusst, der zweifache Alanin-Austausch des in vielen GPCRs konservierten R²³³ am N-terminalen zusammen mit einem F²⁴¹ am C-terminalen Ende der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife führte dagegen zu einer Reduzierung der Paarung. Statt Phenylalanin befinden sich im Pra1-Protein an dieser Stelle die hydrophoben Aminosäuren Valin²⁰⁴ und Tyrosin²⁰³. Da im veränderten Pra1-Rezeptorprotein diese beiden Aminosäuren (R¹⁸⁴ und V²⁰⁴ bzw. Y²⁰³) unter den ausgetauschten Bereichen waren, wurde zumindest eine Reduktion in der Paarung erwartet. Im Gegensatz zu den Pheromonrezeptoren führten in den G-Protein gekoppelten Nährstoffrezeptoren Gpr1p aus *S. cerevisiae* und Stm1p aus *S. pombe* ähnliche Mutationen der membrannahen Bereiche in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife sogar zur Inaktivität der Rezeptoren (Xue et al., 1998; Chung et al., 2001).

3.2.2 *in vitro*-Synthese von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Als nächstes wurde versucht in einem *in vitro*-Ansatz mit anschließender Ko-Immunopräzipitation die Interaktion von Pra1 mit einer G α -Untereinheit nachzuweisen. Hier gelang die *in vitro*-Synthese der G α -Untereinheiten, nicht jedoch der Pheromonrezeptoren Pra2 oder Ste2p. Dies könnte an den hydrophoben Transmembrandomänen dieser Rezeptoren liegen, für deren Proteinbiosynthese *in vivo* eine komplexe Translationsmaschinerie inklusive Chaperone zur Verfügung steht (Ott & Lingappa, 2003), welche im benutzten *in vitro*-Synthese Gemisch wahrscheinlich nicht vorhanden war. Obwohl die *in vitro*-Synthese von einem GPCR aus *Arabidopsis thaliana* (Pandey & Assmann, 2004) und wenigen GPCRs anderer höherer Eukaryoten (AbdAlla et al., 1996; Bayle et al., 1997; Chaturvedi et al., 2001; Kemp et al., 2002) gelang, wurde bisher keine Studie für die *in vitro*-Synthese von pilzlichen G-Protein gekoppelten Pheromon- oder Nährstoffrezeptoren veröffentlicht.

Um in dieser Arbeit die Ko-Immunopräzipitation dennoch durchführen zu können, wurde Pra1:gpf als Membranfraktion aus pheromonstimulierten Kulturen angereichert. Aufgrund der vermutlich unspezifischen Interaktion der benutzten Antikörper mit den Epitopen der getesteten Fusionsproteine konnte in diesem Experiment letztendlich keine Aussage über eine Interaktion von Pra1 mit den G α -Untereinheiten getroffen werden.

3.2.3 Das Split-Gfp-System zum Nachweis von Protein-Interaktionen *in vivo*

Schließlich wurde versucht über das Split-Gfp-System (Hu et al., 2002; Jeong et al., 2006), die Interaktion von Pra1 mit Gpa3 *in vivo* nachzuweisen. Die biologische Aktivität des Pra1-Rezeptors, der an eine der Gfp-Hälften fusioniert war, konnte gezeigt werden. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Pheromonstimulation konnte jedoch mit dem Mikroskop keine Interaktion dieser Rezeptorfusion mit Gpa3, das an die C-terminale Gfp-Hälfte fusioniert war, anhand eines Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Es ist bisher nicht bekannt, ob Gpa3 mit einer C-terminalen Fusion noch funktionell ist, weshalb dieses Experiment nicht endgültig bewertet werden kann. Ein weiteres Problem könnte sein, dass die Proteinmenge von Pra1:gfp-Nt zu Beginn der Pheromonstimulation nicht ausreichend ist, um die Interaktion mikroskopisch beobachten zu können. Das Split-Gfp-System wird erst seit kurzem in *U. maydis* benutzt und die erfolgreiche Anwendung wurde noch nicht gezeigt (C. Basse, persönl. Mitteilung). Als Positivkontrolle könnte in zukünftigen Experimenten die Interaktion des Pra1-Rezeptors mit Calmodulin *cam1* dienen, das im Split-Ubiquitin-Hefe-Zwei-Hybrid-System mit Pra1 interagiert (Vranes, 2002).

3.2.4 Modell zur putativen Interaktion des Pheromonrezeptors mit Gpa3

Es ist in keinem dieser Ansätze oder in früheren Hefe-Zwei-Hybrid-Studien gelungen die physikalische Interaktion des Pheromonrezeptors mit einer G α -Untereinheit nachzuweisen. Aufgrund genetischer Evidenz in *U. maydis* (siehe Einleitung) sowie in Analogie zum Pheromon-Rezeptorsystem in anderen Pilzen wird eine solche Interaktion jedoch postuliert. Eine Möglichkeit warum diese Interaktion bislang in *U. maydis* nicht gezeigt werden konnte, ist, dass die methodischen Vorgehensweisen nicht geeignet waren. Dabei beruhen die Ansätze der Hefe-Zwei-Hybrid-Systeme oder der Ko-Immunopräzipitation auf der Annahme, dass der Pra-Rezeptor bereits vor der Aktivierung durch Pheromon mit einer G α -Untereinheit stabil interagiert. Eine solche Interaktion würde dem sogenannten „precoupling“-Modell, wie es für den Pheromonrezeptor Ste2p aus *S. cerevisiae* gezeigt wurde (Neubig et al., 1988; Dosil et al., 2000), entsprechen. Neben einer Vielzahl von Studien über die genetische Interaktion von Ste2p mit Gpa1, gibt es nur wenige in denen die physikalische Interaktion gezeigt wurde. Dies gilt auch für andere pilzliche Pheromonrezeptoren (Tabelle 12). Meistens gelang es solche Interaktionen in Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen (GAL4-, Split-Ubiquitin-Hefe-Zwei-Hybrid) zu zeigen, die entweder das gesamte Rezeptorprotein oder Teile davon verwendeten. Da in *U. maydis* in wiederholten

Tabelle 12. Methoden, die zur Verifizierung der physikalischen Interaktion von GPCRs mit ihrer G α -Untereinheit in verschiedenen Organismen verwendet wurden.

GPCR	G α -Untereinheit	Organismus	Methode	Referenz
pilzliche Pheromonrezeptoren				
Ste2p	Gpa1	<i>S. cerevisiae</i>	Immunopräzipitation mit Western-Blot	Wu et al. 2004
Ste2p-C-Terminus	Gpa1	<i>S. cerevisiae</i>	Hefe-Zwei-Hybrid	Ongay-Larios et al. 2000; Duran-Avelar et al. 2001
Mam2	Gpa1	<i>S. pombe</i>	Hefe-Zwei-Hybrid	Chung et al. 2001
Rcb2-6	<i>S. cerevisiae</i> Gpa1-Chimäre	<i>C. cinereus</i>	heterologe Expression und Funktionalitäts-Tests in Hefe	Olesnicky et al. 1999
pilzliche Nährstoffrezeptoren				
Gpr1p	Gpa2	<i>S. cerevisiae</i>	Immunopräzipitation mit Western-Blot	Ansari et al. 1999
Gpr1p-C-Terminus	Gpa2	<i>S. cerevisiae</i>	Hefe-Zwei-Hybrid	Xue et al. 1998
Stm1	Gpa2	<i>S. pombe</i>	Hefe-Zwei-Hybrid; Heterologe Expression und Immunopräzipitation mit Western-Blot	Chung et al. 2001
Git3	Gpa2	<i>S. pombe</i>	Hefe-Zwei-Hybrid	Hoffman, 2005
Gpr4	Gpa1	<i>C. neoformans</i>	Hefe-Zwei-Hybrid	Xue et al. 2006
Rezeptoren in höheren Eukaryoten				
β_2 -adrenerger Rezeptor	G α_s	<i>Homo sapiens</i>	Biochemische Aufreinigung des Rezeptorkomplexes	Lefkowitz, 2000 und Referenzen darin
α_{2A} -adrenerger Rezeptor	G α_i	Maus-Modell	FRET (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)	Hein et al. 2005
Rhodopsin	Transducin	<i>Homo sapiens</i>	Crosslinking und Komplexaufreinigung	Cai et al. 2001; Itoh et al. 2001
Gcr1	Gpa1	<i>A. thaliana</i>	Hefe-Zwei-Hybrid; <i>In vitro</i> -Proteinsynthese mit Immunopräzipitation	Pandey & Assmann, 2004

Hefe-Zwei-Hybrid-Studien keine Interaktion beobachtet wurde (Krüger, 1999; Vranes, 2002), deutet dies auf eine möglicherweise sehr schwache oder transiente Protein-Interaktion hin.

In *U. maydis* läßt sich die putative Interaktion des Pheromonrezeptors mit einer G α -Untereinheit anstatt mit dem „precoupling“-Modell besser durch das sogenannte „collision coupling“-Modell beschreiben, in dem die G-Proteine Membran-assoziiert frei diffundieren und erst nach Kontakt mit einem aktivierten Rezeptor eine Interaktion eingehen und aktiviert

werden (Hein et al., 2005 und Referenzen darin). Hierbei wurden Interaktionszeiten zwischen Rezeptor und G-Protein von < 100 ms gemessen (Hein et al., 2005). Da die funktionelle Redundanz einzelner $G\alpha$ -Untereinheiten in *U. maydis* in dieser Arbeit ausgeschlossen werden konnte und einzig die Deletion von Gpa3 einen cAMP-abhängigen phänotypischen Defekt verursachte, interagiert vermutlich Gpa3 mit dem Pheromonrezeptor. Das „collision coupling“-Modell könnte auch erklären wie Gpa3 mit mehreren aktivierten Rezeptoren interagieren könnte und so den cAMP-Signalweg eventuell stufenweise moduliert. Über den cAMP-Signalweg werden in Pilzen verschiedene Prozesse wie Morphologie und Virulenz reguliert aber auch die Nährstoffverfügbarkeit und die Anwesenheit kompatibler Paarungspartner signalisiert (Lee et al., 2003). Speziell für die Wahrnehmung von Nährstoffen wurden in letzter Zeit mehrere G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit Signalweiterleitung über den cAMP-Signalweg identifiziert: die Zuckerrezeptoren Gpr1p in *S. cerevisiae* und Git3 in *S. pombe*, der Stickstoffrezeptor Stm1 in *S. pombe* und der Aminosäurerezeptor Gpr4 in dem Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* (für Referenzen siehe Tabelle 12). Interessanterweise wurde in *S. pombe* die Interaktion von Gpa2 sowohl mit dem Stickstoffrezeptor Stm1 (Chung et al., 2001), als auch mit dem Zuckerrezeptor Git3 (Welton und Hoffman, 2000; Hoffman, 2005b) gezeigt. Die Integration des Pheromonsignals und von Nährstoffsignalen über Gpa3 in *U. maydis* wäre auch in Einklang mit der komplexen Regulierung des Transkriptionsfaktors Prf1. Prf1 reguliert die Expression der Pheromongene sowohl in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit verschiedener Zucker als auch nach einem Pheromonstimulus (Hartmann et al., 1996, 1999).

In dem „collision coupling“-Modell hängt die Signalstärke von der Anzahl der aktivierten Rezeptoren und den vorhandenen $G\alpha$ -Untereinheiten ab. Durch die Zunahme der Anzahl an aktivierten Rezeptoren kann somit die Signalgebung verstärkt und bei ausreichend vorhandenen Interaktionspartnern zeitlich schneller weitergeleitet werden (Hein et al., 2005). In der Tat ist in *U. maydis* bekannt, dass die Neusynthese von Pra1 während der Pheromonstimulation transient induziert wird (Fuchs, 2006), was nach dieser Modellvorstellung zu einer Signalamplifikation führt. Da keine transkriptionelle Induktion von Gpa3 bekannt ist (Eichhorn, 2004; Zarnack, 2006), lässt darauf schließen, dass Pra1 zu Beginn der Pheromonantwort der limitierende Proteininteraktionspartner bei der Weiterleitung des Pheromonsignals ist.

Die oben beschriebene Modellvorstellung beruht auf der Annahme, dass das Pheromonsignal in *U. maydis* über die $G\alpha$ -Untereinheit Gpa3 weitergeleitet wird. Letztendlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass nach Pheromonstimulation der cAMP-Signalweg nicht

über ein heterotrimeres G-Protein aktiviert wird. Neben G-Proteinen sind z. B. auch Ras-Proteine an der Aktivierung der Adenylatzyklase beteiligt und die Expression von konstitutiv aktivierten Ras-Proteinen führt z. B. in *S. cerevisiae* zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Toda et al., 1985; Rolland et al., 2002). In diesem Fall wäre Gpa3 nur für die basale Aktivierung des cAMP-Signalwegs und damit die Expression der Pheromongene nötig, das Pheromonsignal würde aber über ein anderes G-Protein weitergeleitet werden. Diese Art der Aktivierung des cAMP-Signalwegs ist aufgrund der Ähnlichkeit zu Pheromon-Rezeptorsystemen in anderen Pilzen jedoch eher unwahrscheinlich. In wenigen Einzelfällen wurde eine Signalweiterleitung ohne G-Proteine in höheren Eukaryoten berichtet (Brzostowski & Kimmel, 2001).

3.3 Gpa1, Gpa2, Gpa3 und Gpa4 haben keine redundante Funktion in der Pheromonantwort und Tumorbildung

In *U. maydis* wurden die G α -Untereinheiten *gpa1-4* identifiziert (Regenfelder et al., 1997; Kämper et al., 2006). Deletionsmutanten der G α -Untereinheiten waren lebensfähig und zeigten nur phänotypische Defekte, wenn *gpa3* deletiert war (Regenfelder et al., 1997). Es blieb unklar, ob die einzelnen G α -Untereinheiten Gpa1, Gpa2 und Gpa4 synergistische Effekte haben und deshalb kein Phänotyp bei Deletion der einzelnen Gene zu erkennen war. Für *Neurospora crassa* war bereits bekannt, dass G α -Untereinheiten synergistische Effekte haben können (Kays & Borkovich, 2004).

In dieser Arbeit wurden zum einen mutierte Gpa1-Versionen getestet, die nicht-funktionell bzw. konstitutiv-aktiviert sein sollten, zum anderen wurde das Verhalten von Stämmen mit Mehrfachdeletionen der G α -Untereinheiten untersucht. Die Analyse von Gpa1 war von besonderem Interesse, da die Transkription der Gpa1-G α -Untereinheiten sowohl in *U. maydis* als auch in *S. cerevisiae* nach einem Pheromonstimulus induziert wird (Jhang et al., 1988; Eichhorn, 2004; Zarnack, 2006). Darüber hinaus konnte Gpa1 aus *U. maydis* mit der β -Untereinheit Ste4p aus *S. cerevisiae* im Zwei-Hybrid-Test interagieren (Krüger, 1999), was eine mögliche Funktion dieser G α -Untereinheit im Pheromonsignalweg andeutete. Analog zu anderen G α -Untereinheiten in höheren Eukaryoten und Pilzen (Miller et al., 1988; Dohlman et al., 1996; Apanovitch et al., 1998; Kurjan et al., 1991) wurden in dieser Arbeit durch den Austausch je einer einzelnen Aminosäure in der hochkonservierten GTPase-Region zwei verschiedene Gpa1-Versionen hergestellt, die dominant-negativ bzw. konstitutiv-aktiv sein sollten. Die Expression dieser *gpa1*-Allele fusioniert an das Haemagglutinin-

Epitop in *U. maydis* führte zu keinem erkennbaren Unterschied zu Wildtypstämmen in der Konjugationshyphenbildung, Paarungskompetenz oder Pathogenität. Das Fusionsprotein war nachweisbar und Membran-assoziiert, konnte jedoch letztendlich nicht auf Funktionalität getestet werden, da kein Phänotyp für die *gpa1*-Deletion bekannt ist. In der Literatur wird berichtet, dass sowohl N-terminale als auch C-terminale Fusionen die Funktionalität von G α -Untereinheiten stören können (Conklin & Bourne, 1993; Wilson & Bourne, 1995; Song et al., 1996; Ho & Wong, 2000; Wu et al., 2004; Harashima & Heitman, 2005). Somit könnte das Ausbleiben eines Phänotyps auch auf die womöglich fehlende Aktivität des Fusionsproteins zurückgeführt werden.

Die Auswirkung des gleichzeitigen Funktionsverlustes von Gpa1, Gpa2 und Gpa4 wurde phänotypisch und auf transkriptioneller Ebene untersucht. *gpa1 gpa2 gpa4*-Dreifachdeletionsmutanten unterschieden sich phänotypisch nicht von Wildtypstämmen in ihrem Wachstum, der Pheromonantwort und Tumorbildung. Gpa1, Gpa2 und Gpa4 haben daher in diesen Entwicklungsstufen keine redundante Funktion. Ungewöhnlich ist, dass in *U. maydis* trotz Funktionsverlust von drei G α -Untereinheiten der Lebenszyklus vollendet werden kann, wohingegen in anderen Pilzen mindestens zwei G α -Untereinheiten für das Wachstum und die sexuelle Entwicklung notwendig sind (Yu et al., 1996; Chang et al., 2004).

Die Tumore der Dreifachdeletionsmutante enthielten keimungsfähige Sporen, der Anteil der Tumore mit Sporenbildung war jedoch im Vergleich zu den Wildtypstämmen deutlich reduziert. Die Auswirkung der Deletion von Gpa1 oder Gpa4 auf die Sporenbildung wurde parallel zu dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Gold (University of Georgia, Athens, USA) untersucht. Hierbei konnte in Einzeldeletionsmutanten von Gpa1 und Gpa4 eine verfrühte Sporenbildung festgestellt werden (Lori Baker, unveröffentlicht), was in dieser Arbeit für die Dreifachdeletionsmutante nicht beobachtet werden konnte. Vermutlich hängt die Effizienz der Ausbildung von Sporen stark von den äußeren Kulturbedingungen ab, was die unterschiedlichen Beobachtungen erklären könnte. In den Microarray-Analysen der Dreifachdeletionsmutante konnten keine differentiell exprimierte Gene, die für Proteine mit einer bekannten Funktion in der Sporenbildung kodieren, identifiziert werden. Es waren jedoch Gene reprimiert, die für Proteine mit Aufgaben im Metabolismus kodieren, was eine Auswirkung auf den Metabolismus des Pilzes während des Wachstums in der Pflanze und auf die Sporenbildung haben könnte.

Das unterschiedliche Expressionsmuster von Gpa1, Gpa2 und Gpa4 in Abhängigkeit von der Entwicklungsstufe von *U. maydis* weist auf spezifische, voneinander unabhängige

Funktionen dieser G α -Untereinheiten hin. Die Expression von Gpa1 wird nach Pheromonstimulation induziert (Eichhorn, 2004; Zarnack, 2006), während die Expression von Gpa2 *b*-induziert ist (J. Kämper, persönl. Mitteilung). Gpa3 ist tendenziell stärker in Glucose- als in Arabinose-Arrayminimalmedium exprimiert (diese Arbeit, nicht gezeigt). Die Expression von Gpa4 ist etwa 2-fach reduziert nach Pheromonstimulation (Zarnack, 2006) und stark erhöht während der Proliferation in der Pflanze und im Tumorgewebe (Spellig, 1996). Weiterhin deutet die phylogenetische Einteilung der G α -Untereinheiten in verschiedene funktionelle Gruppen auf unterschiedliche Aufgaben hin (Bölker, 1998; siehe Einleitung). Daher kann spekuliert werden, dass Gpa1, Gpa2 und Gpa4 möglicherweise transiente Aufgaben haben oder entwicklungspezifisch bzw. in Abhängigkeit von speziellen Umweltbedingungen aktiv sind.

3.4 *U. maydis*-Stämme ohne funktionelle G α -Untereinheiten sind lebensfähig und zeigen einen cAMP-abhängigen Phänotyp

In dieser Arbeit wurde erstmalig in einem pflanzenpathogenen Basidiomyceten die Auswirkung des Funktionsverlusts aller G α -Untereinheiten auf Wachstum und Pathogenität untersucht. Durch den Vergleich der G α -Nullmutante mit der *gpa3*-Einzelmutante konnte in diesen Experimenten nun die Beziehung zwischen allen G α -Untereinheiten auf funktionelle Redundanz hin überprüft werden. Kompatible *gpa1-gpa4* Nullmutanten zeigten einen Phänotyp, der nicht unterscheidbar von *gpa3*-Deletionsmutanten war. Die Zellen zeigten die für cAMP-Mangel typisch verlängerte Zellform in Flüssigmedium sowie verlangsamtes und filamentöses Wachstum auf Festmedium vergleichbar zu *gpa3*-oder Adenylatzyklase *uac1*-Deletionsmutanten (Gold et al., 1994; Regenfelder et al., 1997). Die defekte Konjugationshyphenbildung und Paarung konnten wie in *gpa3*-Deletionsmutanten (Enders, 1998; Krüger et al., 1998) durch die Zugabe von cAMP revertiert werden. Da die Paarung in kompatiblen G α -Nullmutanten wie auch in *gpa3*-Deletionsmutanten nicht stattfindet, jedoch die Zellfusion für die Pflanzeninfektion essentiell ist, waren diese Stämme wie erwartet apathogen. Weiterhin waren *gpa3*-Deletionsmutanten und G α -Nullmutanten hitze-resistenter, vermutlich aufgrund des erniedrigtem cAMP-Spiegels bei Deletion von Gpa3 (Enders, 1998; Krüger, 1999). Eine ähnliche Situation wurde auch von *N. crassa* und *S. cerevisiae* berichtet (Kataoka et al., 1985; Ivey et al., 2002). Aufgrund der phänotypischen Übereinstimmung zwischen der G α -Nullmutante und der *gpa3*-Deletionsmutante kann davon ausgegangen werden, dass Gpa3 in *U. maydis* funktionell nicht durch eine andere G α -Untereinheit ersetzt werden kann.

In Bezug auf die Pheromonantwort konnte durch die Experimente mit cAMP-Zugabe geklärt werden, dass lediglich die Stimulierung der cAMP-Synthese durch Gpa3 für die Pheromonantwort benötigt wird. Dies wurde an der Fähigkeit zur Paarung und Konjugationshyphenbildung ohne funktionelle $G\alpha$ -Untereinheiten bei cAMP-Zugabe deutlich. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den zwei vorgeschlagenen Modellen, in denen Gpa3 entweder eine indirekte Rolle spielt, indem es über die Aktivierung der cAMP-Synthese auch die Transkription der Pheromogene stimuliert, oder durch Interaktion mit mehreren Rezeptoren sowohl aktiv an der Pheromonantwort als auch an der Nährstoffwahrnehmung teilnimmt (Bölker, 1998).

Bisher wurde nur in *N. crassa* eine vergleichbare Studie durchgeführt. Hier war die $G\alpha$ -Nullmutante nicht mehr cAMP-revertierbar (Kays & Borkovich, 2004), was auf die Adenylatzyklase-inhibierende $G\alpha_i$ -Untereinheit Gna-1 zurückgeführt wurde, die im Gegensatz zu *U. maydis* eine synergistische Funktion zur Adenylatzyklase-stimulierenden $G\alpha_s$ Gna-3 hat (Ivey et al. 1999, 2002). Die $G\alpha_i$ -Untereinheiten aus *Botrytis cinerea*, *M. grisea* und *C. neoformans* üben ebenfalls einen positiven Effekt auf die cAMP-Synthese aus (Alspaugh et al., 1997; Liu & Dean, 1997; Schulze Gronover et al., 2001). *U. maydis* scheint dagegen höheren Eukaryoten ähnlicher, in dem nur eine $G\alpha$ -Untereinheit, die $G\alpha_s$ Gpa3, an der Stimulation der cAMP-Synthese beteiligt ist (Lengeler et al. 2000; diese Arbeit).

3.4.1 Die Notwendigkeit der Gpa3-Signalgebung für die Pathogenität von *U. maydis*

Die veränderte Koloniemorphologie, defekte Konjugationshyphenbildung und Paarungskompetenz kann in *gpa3*-Deletionsmutanten durch cAMP-Zugabe revertiert werden. Da der solopathogene Stamm SG200 Δ *gpa3* apathogen ist, war zu erwarten, dass Gpa3 an weiteren Entwicklungsschritten nach der Zellfusion beteiligt ist (Enders, 1998). Darauf aufbauend wurden in dieser Arbeit in *gpa3*-Deletionsmutanten und $G\alpha$ -Nullmutanten weitere entscheidende Entwicklungsstufen im Pathogenitätsprozess auf ihre cAMP-Revertierbarkeit hin untersucht und damit auf ihre Abhängigkeit von der Signalgebung durch Gpa3 getestet. Die Mikroskopie von frühen Entwicklungsstadien der Pathogenität auf und in der Wirtspflanze zeigte, dass der Verlust von Gpa3 durch Zugabe von cAMP zur injizierten Zellsuspension ausgeglichen werden kann. Kompatible *gpa3*-Deletionsmutanten sowie $G\alpha$ -Nullmutanten konnten unter diesen Bedingungen fusionieren, bildeten Appressorien und penetrierten vereinzelt die Pflanzenoberfläche. Dies bedeutet, dass für die frühe pathogene Entwicklung die Stimulation der cAMP-Synthese durch Gpa3 essentiell ist. Da trotz

Penetration keine wildtypartige Proliferation und Tumorinduktion stattfand, zeigt, dass die Signalgebung durch Gpa3 auch für diese Entwicklungsstufen notwendig ist. Das ähnliche Verhalten von *gpa3*-Deletionsmutanten und $G\alpha$ -Nullmutanten in diesen Experimenten demonstriert somit, dass Gpa3 die wichtigste $G\alpha$ -Untereinheit für die Pathogenität von *U. maydis* ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen der *gpa1 gpa2 gpa4*-Dreifachdeletionsmutante überein.

3.4.2 Bildung von knospenden Filamenten in Stämmen mit cAMP-Mangel

Wurden *gpa3*-Deletionsmutanten und $G\alpha$ -Nullmutanten ohne cAMP in Maispflanzen injiziert, so zeigten sie auf der Blattoberfläche eine ungewöhnliche Hyphenmorphologie mit multiplen knospentartigen Auswüchsen. Dieser Phänotyp wurde bisher für keine Mutante in *U. maydis* beschrieben und scheint eine spezielle Reaktion auf den Verlust der Gpa3-induzierten cAMP-Produktion zu sein. In Wildtypzellen oder wenn diese Stämme mit cAMP injiziert wurden, war diese morphologische Veränderung nicht zu beobachten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass dieser Phänotyp nicht durch spezielle Pflanzensignale verursacht wird, sondern bereits durch eine hydrophobe Oberfläche induziert wird. Daraus kann geschlossen werden, dass das fehlende cAMP-Signal in Kombination mit dem Signal der hydrophoben Oberfläche und wahrscheinlich Nährstoffmangel diese morphologische Veränderung hervorruft, da sie auf hydrophilen Oberflächen wie z. B. Agar nicht beobachtet wurde. Interessanterweise wurden in der Microarray-Analyse der *gpa3*-Deletionsmutante sehr hohe Expressionswerte für das Repellent-Gen *rep1* und die Hydrophobine *hum2* und *hum3* detektiert. Dies impliziert einen funktionellen Zusammenhang zu dem hier beobachteten Phänotyp, da für diese Proteine eine Rolle in der Bildung von Lufthyphen gezeigt wurde sowie eine Funktion von Rep1 für eine bessere Anheftung an hydrophobe Oberflächen (Wösten et al., 1996; Teertstra et al., 2006). Im Gegensatz zu Hyphen des Wildtypstammes auf der Blattoberfläche, die in regelmässigen Abständen Septen aufweisen, erscheint die Septierung in Hyphen der *gpa3*-Deletionsmutanten stark reduziert. Kürzlich wurde die Funktion eines Septins, *sep3*, in *U. maydis* beschrieben, das die Zellmorphologie und Septenbildung beeinflusst und transkriptionell durch einen aktivierten cAMP-Signalweg in einer *ubc1*-Mutante reprimiert wird (Boyce et al., 2005; Larraya et al., 2005). Daher wäre in der *gpa3*-Deletionsmutante die Induktion des *sep3*-Transkripts zu erwarten. Allerdings zeigten Microarray-Analysen dieser Arbeit keine Induktion der Gene von Sep3 oder drei weiteren putativen Septinen aus *U. maydis* (beschrieben in Boyce et al., 2005). Dies könnte auf eine vom cAMP-Spiegel unabhängige Regulation dieser Proteine oder eine Septin-

unabhängige Ursache der aberranten Hyphenmorphologie in der *gpa3*-Deletionsmutante hindeuten.

3.5 Genomweite Expressionsanalysen zur Untersuchung der Signalgebung von G α -Untereinheiten in *U. maydis*

3.5.1 Die induzierte Expression von konstitutiv-aktiven G α -Untereinheiten verursacht keine signifikante Änderung in der Genexpression unter den getesteten Bedingungen

Da die G α -Untereinheiten Gpa1, Gpa2 und Gpa4 keine redundanten Funktionen bezüglich des Wachstums oder der Pathogenität von *U. maydis* ausübten, war es wahrscheinlich, dass sie getrennte Aufgaben in der Signalgebung wahrnehmen. Zur Identifikation dieser Signaltransduktionswege wurde in einem Vorexperiment jeweils das Transkriptionsprofil nach induzierter Expression von konstitutiv aktiven Versionen dieser G α -Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp-Transkriptionsprofil analysiert. Die zugrundeliegende Annahme war, dass die Überexpression dieser aktivierten G α -Untereinheiten zu einer Aktivierung des zugehörigen Signalwegs und einer damit verbundenen Änderung in der Genexpression führt. In anderen Pilzen hatte die Expression von konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten meist eine morphologische Veränderung bzw. eine Auswirkung auf einen Signaltransduktionsweg zur Folge (Baasiri et al., 1997; Lengeler et al., 2000; Yamagishi, 2002; Guo et al., 2003; Liu et al., 2007). In *U. maydis* wurden konstitutiv aktive Versionen von Gpa1–Gpa4 analog zu G α -Untereinheiten in anderen Pilzen durch einen Aminosäureaustausch in der hochkonservierten GTPase-Region hergestellt, was die intrinsische GTPase-Aktivität herabsetzen sollte.

Überraschenderweise führte die induzierte Expression der Allele *gpa1^{QL}*, *gpa2^{QL}* und *gpa4^{RC}* zum Zeitpunkt 3 h nach Induktion nur zu minimalen Änderungen in der Genexpression und es wurden keine morphologischen Veränderungen beobachtet. Eine Erklärungsmöglichkeit dieser Ergebnisse ist, dass die untersuchten G α -Untereinheiten alleine nicht ausreichen um Signaltransduktionswege in dem Maße zu aktivieren, dass eine signifikante Änderung in der Genexpression erfolgt. Möglicherweise werden dafür zusätzliche Signalamplifikatoren wie eine aktivierte $\beta\gamma$ -Untereinheit oder ein funktionell-ähnliches *Kelchrepeat*-Protein (Harashima & Heitman, 2002) benötigt. Alternativ könnten die Zielproteine dieser G α -Untereinheiten nur unter speziellen Bedingungen bzw. entwicklungspezifisch aktivierbar sein. Auch eine transiente kurzfristige Aktivierung von Signalwegen mit einer effizienten Limitierung der Signalgebung durch basal exprimierte RGS-Proteine (*regulators of G-*

protein signaling) oder Phosphodiesterasen ist denkbar. Die mutierten G α -Untereinheiten könnten nicht funktionell sein, was jedoch unwahrscheinlich ist, da der eingeführte Aminosäureaustausch Q-L und R-C in verschiedenen anderen Organismen funktionell ist.

Zusammenfassend könnten die differentiell regulierten Gene, die in diesen Microarray-Experimenten identifiziert wurden, ein Teil von Genen darstellen, die von G α -Untereinheiten unter den getesteten Bedingungen reguliert werden oder Artefakte sein, die durch die Überexpression der G α -Untereinheiten verursacht wurden bzw. nur in dem einen analysierten Replikat als differentiell reguliert erscheinen.

3.5.2 Einfluß von Gpa1, Gpa2 und Gpa4 auf die basale Genexpression in *U. maydis*

Phänotypische Analysen der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutanten ergaben bisher keinen Anhaltspunkt welche Signalwege oder Zielgene durch Gpa1, Gpa2 oder Gpa4 reguliert werden. Mittels genomweiter Analysen der Stämme FB1 Δ gpa1, FB1 Δ gpa3 (DG74) und DG99 (*alb1* Δ *gpa1 gpa2 gpa4*) sollte daher geklärt werden, welchen Einfluss diese G α -Untereinheiten auf das Transkriptom haben. Insgesamt wurden beim Vergleich der Transkriptome von FB1 mit der *gpa1*-Deletionsmutante 5 Gene von etwa 6400 Genen, die auf dem Microarray-Chip repräsentiert sind, identifiziert, die sich in ihrer Expression um mindestens den Faktor 2 unterscheiden. Das Transkriptionsprofil von FB1 Δ gpa1 stimmte damit weitestgehend mit dem Ausgangsstamm überein. Die G α -Untereinheit Gpa1 hat demnach unter den getesteten Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die basale Genexpression.

Das einzige Gen, das sowohl in FB1 Δ gpa1 als auch in der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutante differentiell reguliert war, ist um03792, ein Protein mit Homologie zu SepB aus *Aspergillus fumigatus*. In *A. fumigatus* ist SepB ein essentielles Protein, das für die mitotische Kernteilung und Septenbildung während der Zytokinese benötigt wird (Harris & Hamer, 1995). Da die Expression von um03792 in allen Stämmen nahe der Detektionsgrenze liegt und die hier verglichenen Stämme nicht isogen sind, wäre eine weitere Überprüfung des Expressionsunterschieds notwendig um eine Aussage zu treffen.

Im Vergleich des Transkriptoms der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutante (*alb1*) mit dem Wildtypstamm FB1 wurden 44 Gene identifiziert, die sich in ihrer Expression um mindestens den Faktor 2 unterschieden und sich in folgende Kategorien einteilen ließen: Signalweiterleitung (11 Gene), Transportproteine (3 Gene), Metabolismus (9 Gene),

Proteinfaltung (1 Gen) und Proteine mit unbekannter Funktion (16 Gene). Hierbei ist zu beachten, dass es sich in diesem Vergleich nicht um Stämme mit dem gleichen genetischen Hintergrund handelt, da die Dreifachdeletionsmutante aus einer Kreuzung hervorging und genetisch teilweise dem FB2-Wildtypstamm entspricht. Die Mehrheit der differentiell regulierten Gene (33) in der Dreifachdeletionsmutante zeigten geringere Expressionswerte als in FB1, was somit entweder darauf hindeutet, dass die Basalexpression dieser Gene einer positiven Regulation durch die $G\alpha$ -Untereinheiten unterliegen könnte oder dass dies dem Expressionsniveau im FB2-Wildtypstamm entspricht.

Auffallend in der Kategorie „Signalweiterleitung“ war die reduzierte Expression einer Gruppe von acht Genen, für die eine Pheromon bzw. Prf1-abhängige Regulation bekannt ist, inklusive von Prf1 selbst (Urban et al., 1996b; Zarnack, 2006). Dieses Expressionsmuster lässt sich durch die ebenfalls reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors Rop1 erklären, der ein direkter positiver Regulator der *prf1*-Expression in axenischer Kultur ist (Brefort et al., 2005). Phänotypisch sind *rop1*-Deletionsmutanten defekt in der Paarungskompetenz und Konjugationshyphenbildung (Brefort et al., 2005). Im Gegensatz dazu scheint in der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutante noch genügend *rop1* basal exprimiert zu werden, da diese Defekte nicht auftraten. Da die Expression von Genen, die Proteine für die Pheromonreifung und -sekretion kodieren, reduziert war, wurde die Dreifachdeletionsmutante auch auf die Pheromonsekretion getestet. Hier konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zum Wildtypstamm festgestellt werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der beobachtete Expressionsunterschied dieser Gene möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass zwei nicht isogene Stämme miteinander verglichen werden und die verringerte Expression dieser Gene dem Anteil an genetischem FB2-Hintergrund entspricht. Es ist bekannt, dass FB2-Zellen eine schwächere Induktion der Konjugationshyphenbildung in FB1-Zellen hervorrufen als umgekehrt (Snetselaar et al., 1996), was durch die hier beobachtete reduzierte Expression der daran beteiligten Gene verursacht sein könnte.

Des Weiteren wurden acht Gene mit geringerer Expression in der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutante identifiziert, die für verschiedene Proteine des Stoffwechsels kodieren. In ihren Promotoren wurden keine PRE-Bindestellen für eine Aktivierung durch Prf1 identifiziert (Urban et al., 1996b; Zarnack, 2006), weshalb sie wahrscheinlich keine direkten Prf1-regulierten Gene darstellen. Zusammenfassend waren in der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutante im Vergleich zu FB1 Gene, die für Proteine mit Funktionen in der Pheromonantwort sowie im Stoffwechsel kodieren, reduziert exprimiert. Dies deutet entweder auf eine mögliche Rolle dieser $G\alpha$ -Untereinheiten in der Vermittlung von Nährstoffsignalen und der

damit möglicherweise verbundenen Paarungsbereitschaft hin oder wird durch Unterschiede im genetischen Hintergrund dieser Stämme hervorgerufen.

3.5.3 Gpa3 ist an der Regulation einer Vielzahl von cAMP-regulierten Prozessen beteiligt

In der genomweiten Expressionsanalyse der *gpa3*-Deletionsmutante konnten 163 Gene identifiziert werden, deren Expression im Vergleich zu FB1 mindestens zweifach induziert oder reprimiert war. Die genaue Analyse dieser differentiell regulierten Gene im Vergleich zu früheren Studien, in denen Mutanten im cAMP-Signalweg untersucht wurden, bestätigte überzeugend, dass Gpa3 ein positiver Regulator der Adenylatzyklase ist. Durch diese Analyse konnte damit erstmalig eine Übersicht über die verschiedenen Prozesse, die durch Gpa3 über den cAMP-Signalweg reguliert werden, gewonnen werden.

So führte der Verlust von Gpa3 zur reduzierten Basal-Expression von bekannten cAMP-regulierten Genclustern für Eisenaufnahmesysteme (Eichhorn et al., 2006) und dem sogenannten „cab-Locus“, dessen Proteine vermutlich eine Funktion bei der Kapselbildung in *U. maydis* haben (Brachmann et al., 2001). Neu in dieser Arbeit wurde die cAMP-abhängige Regulation des Genclusters für die Biosynthese von Mannosylerythritol-Lipiden (MEL) (Hewald et al., 2006) identifiziert. MEL sind oberflächenaktive Substanzen, deren Produktion in *U. maydis* durch Stickstoffmangel bei ausreichend vorhandener Glucose induziert wird (Spöckner et al., 1999; Hewald et al., 2005). Die anhand des Expressionsmusters der MEL-Clustergene implizierte Verbindung zwischen Stickstoffmangel und der cAMP-Produktion ist auch aus anderen Pilzen bekannt. In *S. cerevisiae* wird durch Stickstoffmangel „pseudohyphales Wachstum“ induziert, was auch durch die konstitutiv aktive $G\alpha$ -Untereinheit Gpa2 oder cAMP-Gabe unter ausreichend vorhandenem Stickstoff induziert werden kann (Lorenz & Heitman, 1997). In *S. pombe* dagegen wird die cAMP-Produktion unter Stickstoffmangel gesenkt und die Expression von Genen für die Paarung induziert (Davey, 1998). Weitere in *U. maydis* unter Stickstoffmangel induzierte Transkripte, die Proteine für die Stickstoffaufnahme kodieren (Hewald et al., 2006), waren in FB1 Δ gpa3 nicht differentiell reguliert. Dies deutet auf eine gesonderte Rolle der Biosynthese von MEL als Sekundärmetabolite hin.

Konsistent mit einer Rolle von Gpa3 und anderen Komponenten des cAMP-Signalwegs in der Regulation der Zellmorphologie in *U. maydis* (Lee et al., 2003 und Referenzen darin) wurden auch in der *gpa3*-Deletionsmutante differentiell regulierte Gene identifiziert, deren Produkte eine Funktion während der filamentösen Wuchsform ausüben. Hierunter waren das

stark exprimierte, filament-spezifische Repellent-Protein *rep1* sowie die Hydrophobine *hum2* und *hum3*, die in geringerem Maße als *rep1* an der Ausbildung des Luftmycels während der Paarung beteiligt sind (Wösten et al., 1996; Teertstra et al., 2006). Hgl1 dagegen, das vermutlich als negativer Regulator des filamentösen Wachstums agiert (Dürrenberger et al., 2001), war in der *gpa3*-Deletionsmutante 1,7fach geringer exprimiert. Induziert waren auch vier weitere Genprodukte, die am Zellwandaufbau sowie deren Umstrukturierung beteiligt sind. Eines dieser Genprodukte ist ein Homolog zu dem *S. cerevisiae* Zell-Wand Protein Utr2p, das eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität hat (Cabib et al., 2007). Drei weitere Genprodukte, eine Chitinase sowie die Vorläuferproteine der Chitin-Deacetylase und der Chitinase A haben eine Funktion in der Zellwandumstrukturierung und sind möglicherweise auch an der Bildung von Chitosan beteiligt (Milewski, 2006).

Transportproteine für Nährstoffe und Enzyme verschiedener Stoffwechselwege stellen den Hauptteil der differentiell regulierten Gene in der *gpa3*-Deletionsmutante dar. Die Wahrnehmung von Nährstoffen und Weiterleitung dieser Information über G-Proteine und den cAMP-Signalweg ist ein konservierter Mechanismus in Basidiomyceten und Ascomyceten (Lengeler et al., 2000). Gpa3 ist phylogenetisch nahe verwandt zu Gpa2 aus *S. cerevisiae*, Gpa2 aus *S. pombe* und Gpa1 aus *C. neoformans*, die alle involviert sind in der Weiterleitung von Nährstoffsignalen an den cAMP-Signalweg (Lengeler et al., 2000). Die wahrgenommenen Nährstoffe sind hierbei Kohlenhydrate, bevorzugt Glucose, und verschiedene Stickstoffquellen wie z. B. Ammonium oder Glutamin. Kürzlich wurde auch eine Verbindung zwischen dem cAMP-Signalweg und dem Phosphatmetabolismus in *U. maydis* postuliert (Larraya et al., 2005; Boyce et al., 2006). Unter den getesteten Bedingungen konnte in der *gpa3*-Deletionsmutante jedoch keine differentielle Expression von Komponenten des Phosphatmetabolismus identifiziert werden.

3.5.3.1 Gpa3 ist beteiligt an der Glucoserepression

Ein Ergebnis der Transkriptomanalyse des *gpa3*-Deletionsstammes war, dass mindestens zehn Gene, die normalerweise der transkriptionellen Repression durch Glucose unterliegen, in diesem Stamm dereprimiert waren. Darunter befanden sich Gene, die für Enzyme zur Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen, z. B. Arabinose, kodieren. Deutlich wurde dies vor allem anhand der induzierten Expression des putativen Arabinase-Gens *crg1*, dessen transkriptionelle Repression durch Glucose in *U. maydis* experimentell bestätigt worden ist (Bottin et al., 1996). In *U. maydis* ist ein zweites Glucose-reprimiertes Gen *iad2* bekannt (Basse et al., 1996), das auf den benutzten Microarray-Chips jedoch nicht

repräsentiert ist (C. Basse, persönl. Mitteilung). Weitere induzierte Gene des Arabinose-Metabolismus, für die in anderen Pilzen eine Reprimierung durch Glucose bekannt ist, kodieren für Homologe der *S. cerevisiae* Aldo-Keto-Reduktase Gcy1p sowie der Xylulose-Kinase Xks1p (Ruijter et al., 1997, van Kuyk et al., 2001). Ein weiteres induziertes Transkript kodiert für ein Homolog der *S. cerevisiae* Alkoholdehydrogenase Adh2p, deren Expression unter Glucosemangel stark induziert wird und die im Abbau alternativer Kohlenstoffquellen involviert ist (Ciriacy M., 1975). In Einklang mit der transkriptionellen Induktion dieser Gene konnte im *gpa3*-Deletionsstamm eine erhöhte Expression von Homologen zu Zuckertransportern (um10072, um11514, um01656) beobachtet werden. Darunter waren ein putativer, hochaffiner Glucosetransporter, der homolog zu Hxt15p aus *S. cerevisiae* ist und ein putativer Monosaccharid-Transporter mit 33% Identität zu Kht2p aus *Kluyveromyces lactis*. Für beide Gene wurde gezeigt, dass sie durch Glucose-Mangel induziert werden (Özcan & Johnston, 1999; Milkowski et al., 2001). Induzierte Gene weiterer Stoffwechselwege, die einer Glucose-Reprimierung in anderen Pilzen unterliegen, waren eine putative Malatpermease (Volschenk et al., 2003), eine putative Laccase I (Zhu & Williamson, 2004) und die putativen, sekretierten Pflanzenzellwand-abbauenden Enzyme, eine Endoglucanase und zwei Lipasen (Aro et al., 2005).

Somit ist Gpa3 in *U. maydis* vermutlich für die Wahrnehmung von externer Glucose und der damit verbundenen transkriptionellen Reprimierung von Enzymen der Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen essentiell. Die Glucoserepression wird dabei höchstwahrscheinlich durch die stimulierende Wirkung von Gpa3 auf die Adenylatzyklase und die cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A, analog zu Vertretern der saprophytischen Pilze (Ascomyceten), vermittelt. In den Modellorganismen *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurde für die Wahrnehmung von Glucose ein G-Protein-gekoppeltes Rezeptorsystem identifiziert, das über eine $G\alpha$ -Untereinheit die Adenylatzyklase aktiviert und ein transientes cAMP-Signal generiert (Hoffman, 2005b). Interessant ist hierbei der Unterschied zur Rolle von Gpa3 in *U. maydis*, welches den cAMP-Spiegel dauerhaft beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte mit einem Reporterstamm, der *sgfp* unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors exprimiert (Brachmann, 2001), der Einfluss von cAMP auf die Promotoraktivität der Arabinase *crg1* experimentell bestätigt werden. Dabei war nach Induktion mit Arabinose die erreichte Promotoraktivität größer, wenn in diesem Stamm *gpa3* deletiert war, indikativ für einen reduzierten internen cAMP-Spiegel. Die Promotoraktivität war dagegen kleiner, wenn zusätzliches cAMP zugegeben worden war. Das gleichzeitige Fehlen von *gpa3* und die

Zugabe von cAMP verstärkte den Effekt von cAMP und reduzierte die Promotoraktivität stark. Damit konnte gezeigt werden, dass cAMP einen reprimierenden Effekt auf die Expression der Arabinase ausübt. Widersprüchlich dazu erscheint, dass in reprimierendem, Glucose-haltigem Medium trotz Verlust von Gpa3 und damit einem niedrigeren cAMP-Spiegel, die *sgfp*-Expression im Reporterstamm reprimiert war. Im Microarray-Experiment war hingegen wie erwartet die Glucoserepression aufgehoben wenn Gpa3 deletiert war. Dieser Widerspruch ist möglicherweise auf das benutzte Reporterkonstrukt zurückzuführen, das ein verkürztes, 1405 bp langes *crg1*-Promotorfragment enthält. Es ist möglich, dass hier bestimmte Promotorelemente, die der Feinregulation der Glucose-Repression dienen, im Vergleich zur gesamten Promotorsequenz nicht mehr vorhanden sind. Auch in der Aktivierbarkeit des *crg1*-Promotors wurden in Abhängigkeit von seiner Länge Unterschiede festgestellt mit der höchsten Aktivierbarkeit bei einem 3512 bp langen Fragment (Brachmann, 2001).

In der Transkriptomanalyse von *FB1Δgpa3* wurden nicht alle bekannten Glucose-reprimierten Gene, die in anderen Pilzen identifiziert wurden, als differentiell reguliert detektiert. Dies läßt sich zum einen dadurch erklären, dass Glucose-Repression auf verschiedenen regulatorischen Ebenen stattfindet wie der Expression, der Stabilität der Transkripte, der Proteinmodifikation und -stabilität (Gancedo, 1998). Des Weiteren finden sich in *U. maydis* in Analogie zu anderen Pilzen vermutlich parallele Sensorsysteme der Glucose-Wahrnehmung. In *S. cerevisiae* sind zusätzlich zur Glucose-Wahrnehmung über ein G-Protein-gekoppeltes Rezeptorsystem Hexosetransporter mit Sensorfunktion bekannt, für die bisher der Mechanismus der Signalübertragung ungeklärt ist. Darüber hinaus ist eine zur α -Untereinheit nicht redundante Ras-vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase an der Wahrnehmung von Glucose beteiligt (Forsberg & Ljungdahl, 2001, Hoffman, 2005). Zur Klärung der Rolle von Ras1 in *U. maydis* werden momentan Transkriptomanalysen in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Bölker (Philips-Universität Marburg) durchgeführt. Zusammengefaßt scheint Gpa3 für die Wahrnehmung von externer Glucose und die transkriptionelle Reprimierung von Enzymen der Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffe in *U. maydis* essentiell zu sein.

3.5.3.2 Identifizierung von Gpa3/cAMP-regulierten Genen

In dieser Arbeit konnte durch eine vergleichende Analyse der Transkriptome von *FB1Δgpa3* mit Stämmen, die in Gpa3-nachgeordneten Komponenten des cAMP-Signalwegs mutiert sind, eine Liste von 85 cAMP-regulierten Genen in *U. maydis* erstellt werden (siehe

Anhang). Für diesen Vergleich wurde eine Transkriptomanalyse eines Deletionsstammes der Adenylatzyklase *uac1* (M. Vranes, persönl. Mitteilung) und eine Transkriptomanalyse nach genetischer Aktivierung der katalytischen Untereinheit *adr1* (Eichhorn et al., 2006) verwendet. Die in dieser Liste aufgeführten Gene waren differentiell exprimiert in FB1 Δ gpa3 im Vergleich zu FB1 und koreguliert in einer *uac1*-Deletionsmutante bzw. invers dereguliert nach induzierter Expression von *adr1*. Diese Gene stellen somit ein Set dar, deren Basalexpression durch die Gpa3-stimulierte Aktivität der Adenylatzyklase reguliert wird. Die meisten dieser Gene (68) sind möglicherweise direkte Zielgene der Proteinkinase A, da sie nach künstlicher Aktivierung des cAMP-Signalwegs durch die Überexpression von *adr1* (Eichhorn, 2004) ebenfalls induziert waren. Dieses Set an cAMP-Signalweg-regulierten Genen kodiert für Proteine, die an bekannten und in dieser Arbeit neu identifizierten cAMP-regulierten Prozessen beteiligt sind. Darunter zählt in *U. maydis* die Eisenaufnahme, die vermutlich im *cab*-Locus kodierte Kapselbildung, die Synthese von Sekundärmetaboliten (MEL-Biosynthese), die Pheromonantwort, filamentöses Wachstum, die Wahrnehmung und der Transport von Nährstoffen sowie die Regulation von Enzymen verschiedener Stoffwechselwege (Abb. 33). Für zwei dieser Prozesse sind die Transkriptionsfaktoren, die durch die Proteinkinase A aktiviert werden, bekannt. Für die Regulation der Eisenaufnahmesysteme konnte der Transkriptionsfaktor Urbs1, der mehrere PKA-Phosphorylierungsstellen aufweist, identifiziert werden (An et al., 1997; Eichhorn et al., 2006). Der für die Pheromonantwort wichtigste Transkriptionsfaktor ist Prf1 mit PKA- und MAPK-Phosphorylierungsstellen (Hartmann et al., 1996; Urban et al., 1996b).

In anderen Pilzen werden ähnliche Prozesse über den cAMP-Signalweg reguliert. Darunter zählen in *S. cerevisiae* die Wahrnehmung von Glucose und anderen Nährstoffen während des Wachstums, die Regulation der Eisenaufnahme, Stressresistenz und Zellwandintegrität, die Speicherung von Kohlenhydraten, die Morphogenese („pseudohyphales“ Wachstum) und die Sporulation (Robertson et al., 2000; Thevelein et al., 2005). Interessanterweise wurden kürzlich in einer Transkriptomanalyse des Basidiomyceten *C. neoformans* PKA-regulierte Gene mit ähnlichen Funktionen zu den in dieser Arbeit identifizierten Genen gefunden. Darunter waren Gene, deren Genprodukte an der Zellwandsynthese, an Transportsystemen u. a. für die Eisenaufnahme, im Zitratzyklus und der Glykolyse beteiligt sind (Hu et al., 2007). In dieser Transkriptomanalyse fanden sich auch differentiell regulierte Transkripte von ribosomalen Proteinen, Chaperon-Proteinen und Enzymen der Phospholipid-Synthese zu denen im Transkriptom von FB1 Δ gpa3 keine direkte Entsprechung identifiziert werden

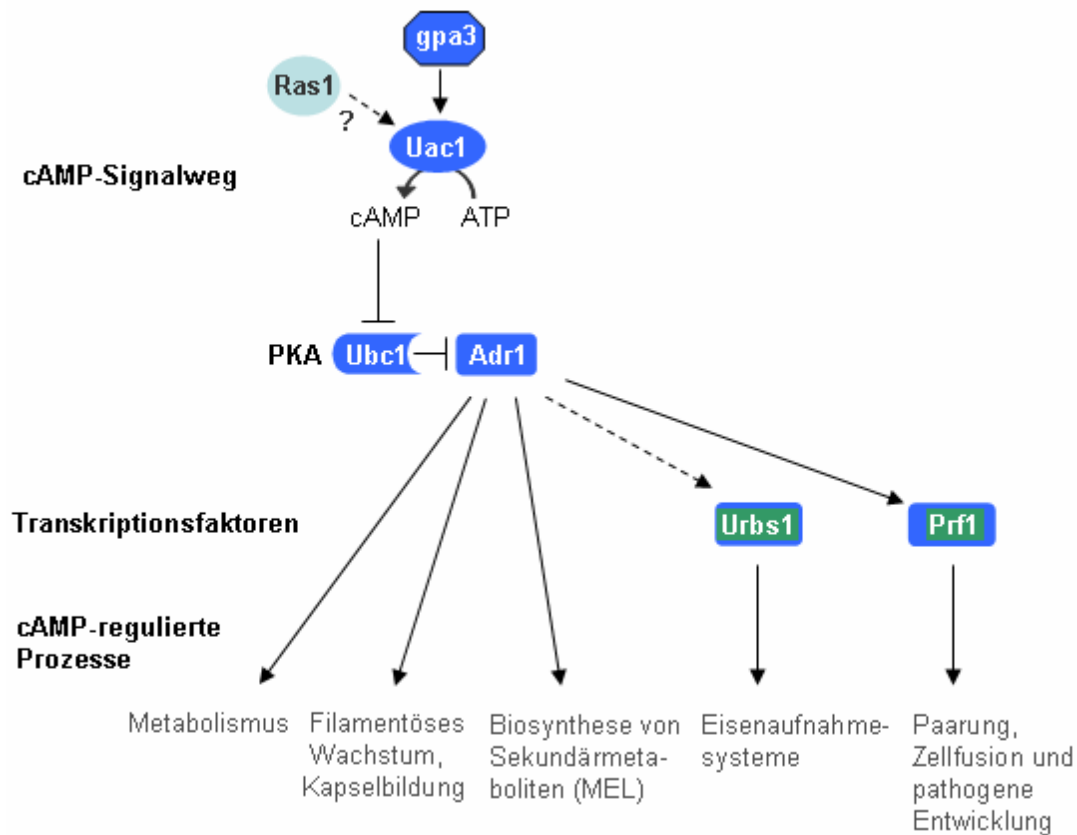


Abbildung 33. Gpa3/cAMP-regulierte Prozesse in *U. maydis*.

konnte. Weitere cAMP-abhängig regulierte Prozesse in *C. neoformans* sind die Melaninsynthese und Kapselbildung (Tangen et al., 2007).

Zusätzlich wurden in den hier verglichenen Transkriptomanalysen der *uac1*-Deletionsmutante sowie nach *Adr1*-Induktion weitere nicht gemeinsam-differentiell regulierte Gene identifiziert (siehe Abb. 29). Darunter befinden sich höchstwahrscheinlich weitere direkt oder indirekt cAMP-regulierte Gene sowie Gene deren Expression durch die jeweilige Mutation oder die Kulturbedingungen beeinflusst wurden. So ist davon auszugehen, dass im Stamm *FB1Δgpa3*, der in Array-Minimalmedium ohne cAMP kultiviert wurde, bereits Anpassungen an den cAMP-Mangel stattgefunden haben. Im Microarray-Experiment von *FB1Δuac1* wurde dagegen der Stamm von cAMP-haltigem Array-Minimalmedium in Medium ohne cAMP transferiert und damit vermutlich Gene, die unmittelbar auf den Abfall des internen cAMP-Spiegels reagieren, detektiert. Interessanterweise waren im Wildtypstamm *FB1* im cAMP-haltigen Medium nur wenige Transkripte differentiell exprimiert, was darauf hindeutet, dass *U. maydis* sehr effizient den erhöhten cAMP-Gehalt ausgleichen kann.

Die Transkriptomanalyse nach Überexpression von *Adr1* spiegelt die künstliche Aktivierung des cAMP-Signalwegs wieder (Eichhorn, 2004) und zeigt deutlich eine zeitliche Begrenzung der cAMP-induzierten Genexpression. Zum Zeitpunkt von 75 min nach *Adr1*-Induktion ist die Expression vieler Gene stark induziert, die bereits nach 180 min wieder reprimiert sind. Daher ist im direkten Vergleich mit einer *gpa3*-Deletionsmutante, die einen dauerhaft geringeren cAMP-Spiegel aufweist (Enders, 1998), keine Überlappung aller Gene zu erwarten. Zu beachten ist außerdem, dass für die Analyse der *Adr1*-abhängigen Gene ein Vollmedium verwendet wurde.

In *U. maydis* wurden auch in einer SAGE-Analyse (*Serial Analysis of Gene Expression*) PKA-regulierte Gene identifiziert (Larraya et al., 2005). Obwohl in dieser Studie der Wildtyp mit einer *ubc1*- und einer *adr1*-Deletionsmutante verglichen wurde und damit einen direkten Vergleich zur FB1 Δ *gpa3*-Transkriptomanalyse ermöglichen sollte, fanden sich in beiden Ansätzen nur wenige identifizierte Gene (9 von 146 identifizierten Sequenz-Fragmenten). Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen experimentellen Ansätze zurückzuführen. So werden in der SAGE-Analyse bevorzugt abundante mRNAs amplifiziert, die zusätzlich eine bestimmte Restriktionsenzym-Schnittstelle (*NlaIII*) in ihrer Nukleinsäure-Sequenz aufweisen müssen (Larraya et al., 2005). Die Verwendung des Wildtypstammes 521 (*a1 b1*) sowie andere Kulturbedingungen wie die Inkubation bei 30°C und die Verwendung von PDB (Potato Dextrose Broth) als Kulturmedium könnten ebenfalls zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben.

3.5.3.3 *Gpa3*/cAMP-regulierte Gene mit einer Funktion in der Pheromonantwort

Da nach Pheromonstimulation eine Aktivierung des cAMP-Signalwegs erfolgt (Krüger et al., 1998; Lee et al., 2003) war auch ein Vergleich zu Pheromon-regulierten Genen interessant. Hierbei wurden zwei Gruppen von Genen identifiziert, welche die koreguliert waren (26 Gene) und welche, die invers reguliert waren (17 Gene). Gene, die koreguliert waren kodierten für Proteine, die an der Zellmorphologie, Zellwandsynthese und vermutlich Kapselbildung beteiligt sind (*rep1*; die *cab*-Locus-Gene um05782–um05787 und um11585; um06190, eine putatives Chitinase-Gen; Gene der N-Glycan Biosynthese um05152 um05153; eine putative α -1,3-Mannosyltransferase). Die gemeinsame Regulation dieser Gene hängt wahrscheinlich mit der Änderung der Zellmorphologie in beiden Stämmen zusammen. FB1 bildet nach Pheromonstimulation Konjugationshyphen aus und bei Deletion von *Gpa3* eine filamentöse Zellmorphologie. Die gemeinsame Regulation der *cab*-Locus-

Gene könnte darauf hindeuten, dass diese Gene in einer bestimmten Situation, z. B. während einer morphologische Umstrukturierung, reprimiert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression dieser Gene einer negativen Kontrolle durch die das Pheromonsignal übermittelnde MAP-Kinase-Kaskade und einer positiven Kontrolle durch den cAMP-Signalweg unterliegt (Brachmann, 2001).

Unter den invers regulierten Genen waren erwartungsgemäß auch PKA-induzierte Gene der Pheromonantwort (*bW1*, *ram1*, *ste6*) sowie zwei weitere Gene, die in ihren Promotoren PRE-Elemente enthalten und für eine Para-Nitrobenzyl Esterase und ein hypothetisches Protein um00384 kodieren. Beachtenswert ist, dass der Transkriptionsfaktor Prf1, der an diese PRE-Elemente bindet (Hartmann et al., 1996; Urban et al., 1996b), nur eine 1,6fach reduzierte Expression in FB1 Δ gpa3 zeigte. Da gezeigt werden konnte, dass für die *prf1*-Expression ein intakter cAMP-Signalweg benötigt wird (Kaffarnik et al., 2003), war dieses Ergebnis zunächst unerwartet. Interessanterweise wurde in FB1 Δ gpa3 jedoch gleichzeitig eine leichte Erhöhung der *rop1*-Expression (1,5fach) festgestellt. In Übereinstimmung damit wurde eine Repression der *rop1*-Expression nach der genetischen Aktivierung des cAMP-Signalwegs sowie dessen Induktion nach Deletion der Adenylatzyklase *uac1* gezeigt (Brefort, 2004). Da Rop1 Promotorelemente von Prf1 bindet und dessen Expression induziert, könnte dadurch die verringerte oder fehlende Aktivierung durch den cAMP-Signalweg in Bezug auf die *prf1*-Expression ausgeglichen werden. Weitere Gene, die in FB1 Δ gpa3 induziert und nach Pheromonstimulation reprimiert waren, kodieren für Proteine verschiedener Stoffwechselwege. Darunter war ein Malat-Transporter (um05764), ein hochaffiner Glucose-Transporter (um11514), die Proteine Mac1 und Mac2 (um03116, um10636), ein Chitinase A Vorläuferprotein (um02758) und zwei Lipasen (um01422, um01655). Die Expression dieser Proteine wird möglicherweise durch einen aktiven cAMP-Signalweg reprimiert und unter Mangelbedingungen induziert, denn für einige von ihnen ist eine Regulation durch Glucose-Repression in anderen Pilzen beschrieben (siehe Kap 3.5.3.1). Abschließend ist zu erwähnen, dass in dem hier beschriebenen Transkriptomvergleich die Anzahl der cAMP-regulierten Gene nach Pheromonstimulation wahrscheinlich deutlich unterschätzt ist, da viele Gene, die nach Pheromonstimulation vermutlich transient exprimiert werden, im Expressionsprofil von FB1 Δ gpa3 nicht repräsentiert sind.

3.5.4 Vergleichende Analyse der Transkriptome der G α -Deletionsmutanten

Ein Vergleich des Expressionsprofils der *gpa3*-Deletionsmutante mit dem Transkriptom der *gpa1 gpa2 gpa4*-Deletionsmutante zeigte, dass eine geringe Überlappung der mindestens

zweifach differentiell regulierten Gene (insgesamt sieben Gene) vorliegt. Dies macht deutlich, dass die Funktionen von Gpa3 und die der anderen drei G α -Untereinheiten überwiegend unterschiedlich sind, wie bereits in den phänotypischen Analysen dieser Stämme gezeigt wurde.

Fünf der differentiell regulierten Gene in beiden Stämmen sind koreguliert. Darunter kodieren drei Gene (*ste6*, *ram1* und *bW1*) für Proteine, die eine potentielle Funktion in der Pheromonantwort haben (Brachmann, 2001; Eichhorn, 2004). Schließt man auch Gene mit einem geringeren Expressionsunterschied in die Betrachtung mit ein, zeigt es sich, dass zwei weitere Gene der Pheromonantwort, der Pheromonrezeptor *pra1* und ein hypothetisches Protein (um02410) in FB1 Δ gpa3 1,6fach reduziert exprimiert sind. Wie bereits diskutiert, werden hier nicht isogene Stämme verglichen und die reduzierte Expression dieser Gene könnte in der Dreifachdeletionsmutante auf den genetischen Hintergrund zurückgeführt werden, während sie in FB1 Δ gpa3 auf die verringerte Aktivität des cAMP-Signalweg zurückgeführt werden könnte.

3.6 Die Funktion von Ras1 in *U. maydis*

Zur Identifizierung weiterer Signalkomponenten, die für die Pheromonsignalweiterleitung von Bedeutung sind, wurde die Funktion des kleinen G-Proteins Ras1 in *U. maydis* näher untersucht. Für Ras1 wurde eine Rolle in der Aktivierung des cAMP-Signalwegs postuliert, da die Expression einer konstitutiv aktiven Version zur Induktion der *mfal*-Expression führte (Müller et al., 2003b). In dieser Arbeit hergestellte *ras1*-Deletionsmutanten zeigten einen pleiotropen Phänotyp mit starker Beeinträchtigung des Wachstums, der Zellmorphologie, insbesondere der Zellpolarität, sowie einem Zellseparationsdefekt. Die Zugabe von cAMP oder Pheromonstimulation induzierte keine Änderung der Zellmorphologie bzw. Konjugationshyphenbildung, was vermutlich eine Folge des starken morphologischen Defekts dieser Zellen ist. Somit ist Ras1 ein notwendiges Protein für die Regulation der Zellmorphologie von *U. maydis*-Zellen.

Trotz der beträchtlichen morphologischen Defekte war die Deletion von *ras1* in *U. maydis* nicht lethal, das Zellwachstum war jedoch stark behindert. Es konnte gezeigt werden, dass die Mitose und Teilung der Zellkerne während der ersten Zellteilungen stattfindet, im weiteren Wachstum jedoch nicht mehr jeder Zellabschnitt einen Zellkern aufwies, was im weiteren Verlauf vermutlich zum Wachstums-Stopp führt. Die Möglichkeit *ras1* zu deletieren deutet auf funktionelle Redundanz der beiden Ras-Proteine in *U. maydis* hin.

Auch in *S. cerevisiae* konnten die einzelnen *ras*-Gene deletiert werden, während die gleichzeitige Deletion beider Gene lethal war (Tatchell et al., 1984; Kataoka et al., 1984). Einen weiteren Hinweis auf funktionell redundante Funktionen von Ras-Proteinen lieferten Studien in *S. cerevisiae* und *C. neoformans* in denen Defekte einer *ras*-Deletion durch die Überexpression des zweiten Ras-Proteins teilweise supprimiert werden konnten (Tatchell et al., 1985; Waugh et al., 2002). In *S. pombe* war es sogar möglich das einzige identifizierte Ras-Protein, Ras1, zu deletieren (Fukui et al., 1986; Nadin-Davis et al., 1986).

Die Regulation der Zellmorphologie durch Ras1 und Ras2 in *U. maydis* stimmt mit der Rolle von Ras-Proteinen in anderen Pilzen und höheren Eukaryoten überein (Tatchell et al., 1984; Fukui et al., 1986; Barbacid, 1987; Waugh et al., 2002). Das Abschalten der *ras1*-Genexpression in *U. maydis*, wenn *ras1* unter einem regulierbaren Promotor exprimiert wird (Mahlert, 2006), führte zu ähnlichen morphologischen Veränderungen wie sie in der *ras1*-Deletionsmutante beobachtet wurden. Die Deletion des zweiten Ras-Gens aus *U. maydis*, *ras2*, beeinflusste ebenfalls die Zellmorphologie (Lee & Kronstad, 2002) und diese Zellen waren morphologisch ähnlich zu *ras1*-deletierten Zellen. Ras2 reguliert hierbei die Zellmorphologie teilweise durch Aktivierung der MAPK-Kaskade (Lee & Kronstad, 2002; Müller et al., 2003a). Über welchen Signalweg Ras1 aus *U. maydis* die Morphologie beeinflusst, ist bisher ungeklärt. Da sowohl in der Aminosäuresequenz der Adenylatzyklase als auch in den Komponenten der MAPK-Kaskade, Kpp4 und Ubc2 (Mayorga & Gold, 2001; Müller, 2003), Ras-Interaktionsdomänen detektiert werden können, ist für Ras1 eine Interaktion mit beiden Signalkaskaden denkbar. In *S. pombe* aktiviert das einzige Ras-Protein Ras1 die MAPK-Kaskade nach Pheromonstimulation und reguliert zusätzlich die Zellmorphologie unabhängig von der MAPK-Kaskade (Fukui et al., 1986; Xu et al., 1994). Ras-Proteine regulieren die Zellmorphologie neben der Aktivierung der MAPK-Kaskade durch die direkte Beeinflussung der Polarisation des Aktin-Zytoskeletts (Ho & Bretscher, 2001; Waugh et al., 2002). Aufgrund der ähnlichen morphologischen Defekte der in dieser Arbeit hergestellten *ras1*-Deletionsmutante zur *ras2*-Deletionsmutante ist Ras1 wahrscheinlich ein Aktivator der MAPK-Kaskade und eines bisher in *U. maydis* nicht charakterisierten Signalwegs, der das Zytoskelett reguliert.

3.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die vier G α -Untereinheiten in der Pheromonsignalweiterleitung von *U. maydis* keine redundante Funktion haben. Somit kann in zukünftigen Experimenten gezielt die G α -Untereinheit Gpa3 auf die Interaktion mit dem Pheromonrezeptor Pra oder putativen Nährstoffrezeptoren getestet werden. Die identifizierte Funktion des C-Terminus von Pra1 in der Pheromon-induzierten MAPK-Aktivierung über bis jetzt unbekannt Interaktionspartner (möglicherweise eine nicht-kanonische G β -Untereinheit) bietet dazu weitere vielversprechende Ansatzpunkte. So können z. B. MAPK-aktivierende Komponenten in einem klassischen Hefe-Zwei-Hybrid-System gesucht werden, da der nicht-hydrophobe cytoplasmatische C-terminale Abschnitt von Pra1 anstatt des gesamten Rezeptorproteins verwendet werden kann. Darüber hinaus lieferte die Transkriptomanalyse einer *gpa3*-Deletionsmutante Einblick in die vielfältigen Prozesse, die einer Regulation durch Gpa3 unterliegen. Insbesondere ist die weitere Untersuchung der Beteiligung von Gpa3 an der Glucose-Repression interessant. Nach einer Bestätigung der transkriptionellen Glucose-Reprimierung z. B. durch Northern-Analyse können die identifizierten Zielgene als Markergene benutzt werden. Alternativ können die weiteren identifizierten Gene auf eine mögliche transkriptionelle Regulation durch Glucose getestet werden. Durch Promotoranalysen dieser Transkripte könnten aktivierende Promotorelemente identifiziert werden, die für die Identifikation von Transkriptionsfaktoren dienen können.

Die in dieser Arbeit hergestellten *ras1*-Deletionsmutanten zeigen einen pleiotropen Phänotyp und deuten auf bisher nicht-identifizierte Signalwege von Ras1 in *U. maydis* hin. Zur Identifizierung von Ras1-stimulierten Signalwegen werden momentan Microarray-Analysen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bölker (Philips-Universität Marburg) durchgeführt und erlauben wahrscheinlich in naher Zukunft die genetischen Grundlagen für den beobachteten Phänotyp der *ras1*-Deletionsmutante weiter aufzuklären.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

4.1.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Ambion, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën, Seakem, Duchefa, Difco, BioRad, Amersham, Pharmacia, Invitrogen und Carl-Roth bezogen. Einzelheiten siehe Brachmann (1995, 2001).

4.1.1.2 Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel et al. (1987) und Sambrook et al. (1989) hergestellt. Einzelheiten dazu siehe Brachmann (1995). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt. Puffer wurden generell mit H₂O_{bid} angesetzt

4.1.1.3 Medien

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

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

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

- 10 g Hefeextrakt
- 10 g Pepton
- 10 g Saccharose
- mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

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 Hefeextrakt
- 10 ml Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)
- 62,5 ml Salz-Lösung nach Holliday (1974)
- 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
- zugemischt (f. c. 1%)

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974)

- 3 g KNO₃
- 62,5 ml Salz-Lösung nach Holliday (1974)
- 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
- zugemischt (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
zugesezt (f. c. 1%)

Array-Minimalmedium mit Glucose
4,38 g L-Glutamine (f. c. 30 mM)
62,5 ml Salz-Lösung nach Holliday (1974)
20 ml 50%(w/v) Glucose-Lösung
(f. c. 1%)
mit H₂O_{bid.} auf 1 l aufgefüllt, mit NaOH
auf pH 7,0 eingestellt und sterilfiltriert

Array-Minimalmedium mit Arabinose
4,38 g L-Glutamine (f. c. 30 mM)
62,5 ml Salz-Lösung nach Holliday (1974)
40 ml 25%(w/v) Arabinose-Lösung
(f. c. 1%)
mit H₂O_{bid.} auf 1 l aufgefüllt, mit NaOH
auf pH 7,0 eingestellt und sterilfiltriert

Salz-Lösung (Holliday, 1974)
16 g KH₂PO₄
4 g Na₂SO₄
8 g KCl
4 g MgSO₄ × 7 H₂O
1,32 g CaCl₂ × 2 H₂O
8 ml Spurenelement-Lösung (siehe unten)
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)
60 mg H₃BO₃
140 mg MnCl₂ × 4 H₂O
400 mg ZnCl₂
40 mg NaMoO₄ × 2 H₂O
100 mg FeCl₃ × 6 H₂O
40 mg CuSO₄ × 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-Aminobenzoesäure
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 degr. Free Acid
2 g Yeast-Extract
20 ml Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)
250 ml Salz-Lösung (Holliday, 1974)
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
zugesezt (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 einzige Kohlenstoffquelle (CM-Ara, NM-Ara und AM-Ara) wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1% (w/v) zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2% (w/v) zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Hygromycin 200µg/ml, ClonNAT 150µg/ml, Carboxin 2µg/ml, Phleomycin 40µg/ml. Bei Selektion mit Phleomycin auf Festmedien wird zusätzlich Tris-Cl (pH 8,0) in einer Endkonzentration von 100 mM zugesezt um eine Inaktivierung des Antibiotikums durch die

Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* zu vermeiden.

4.1.1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme sowie Quick T4 DNA-Ligase wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen, T4 DNA-Ligase von Roche, Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase von Finnzymes, die Taq DNA-Polymerase war eine Laborpräparation. Weitere Enzyme sind unter den jeweiligen Methoden angegeben.

4.1.1.5 Verwendete Kits und sonstiges Material

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten und QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxiprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO-TA Cloning® Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR- und Ligationsprodukten, Microspin S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von DIG-markierten Hybridisierungssonden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.1.2 Oligonukleotide

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

Folgende Oligonukleotide wurden zur Herstellung und Sequenzierung der Pra1-C-terminal verkürzten Konstrukte verwendet:

DG2
GGTGGCCGCGTTGGCCTGGGCCGCTTC
AGATCCCCG

DG3
GGTGGCCGCGTTGGCCTGTTTCCTTGTA
GCCTTGCG

DG7
GGTGGCCGCGTTGGCCTGAAGACCAAG
GCCAAACAT

HT76 GTGGCTCTGGGTTCTACTTGTG

Gfp-rev GTTCTGCTGGTAGTGGTCCG

Folgende Oligonukleotide wurden zur Deletion von *gpa3* verwendet:

g3_lb_fw_neu
CTAGATGATGAAGCGGCTATCG

g3_lb_sfi_rev
TATAGGCCATCTAGGCCGCTCTGAAGA
GCTGCTCAGCAA

g3_rb_rev
CGAGACTGAACCCGTGATGC

g3_rb_Sfi_fw
ATTTGGCCTGAGTGGCCTCTACCAAC
GCGCTCAAGG

Folgende Oligonukleotide wurden zur Konstruktion der Split-Gfp-Plasmide verwendet:

g3-fw-NdeI
ATTACATATGGGAAACTGTCTTTCTTCC

g3-rev-Sfi
ATTAGGCCGCGTTGGCCAAGATGCCGC
TGTC

Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der konstitutiv-aktiven Gpa-Versionen.

HT82
CAATTGCATATGGGTTGCGGTGCTTCC

HT83
CAATTGCATATGGGCGCTTGTCTGTCT

HT84
CAATTGCATATGGGAAACTGTCTTTCTT
C

HT88
CACGTCTACCGCATCTTCGACGTCGGA
GGCCTCCGTTCTGAGCGAAAAAATGG

gpa1-Stop_Not_rev
AATAGCGGCCGCTAGAGCAAACC
GCAATCG

gpa2-Stop_NotI_rev
TAATGCGGCCGCTCATAGTACGATATC
CCTCAAG

gpa3-Stop_NotI_rev
TATTGCGGCCGCTACAAGATGCCGCTG
TCC

gpa4-Stop_NotI_rev
TATTGCGGCCGCTACCCTACTAGACC

Nde_gpa4_fw
AAACAATTGCATATGTGCCCCTCAGTC
TCAAGC

gpa4-R(392)_BsaI_rev
ATTTGGTCTCGCGCACGCACGAGTGTA
GGATGTCTTCATCC

gpa4-R(392)C_BsaI-fw
TATTGGTCTCGTGCGTGCGCACGCTTG
G

gpa3-QL_SapI_rev
AAAAGCTCTTCACGGAGCCTCCTACGT
CAAAGAG

gpa3-QL_SapI_fw
AAAAGCTCTTCTCCGTTCCGGAACGTAA
AAAGTGG

Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung
der Plasmide für die *in vitro*-Proteinsynthese.

DG11
GGAATTCGATCATATGGTTTCAGGC

DG12
GGAATTCGATCATATGTTTTTCAGGC

DG13
TTTAAGATCTTCAACAAATCACTGTGT
CCC

DG18 CGATTCATAGATCTCTGCAGG

DG19
TTGCAAACCATGGATAAAGCGG

DG20 TTCACATATGGATAAAGCGG

DG21 TACTTCATATGTCTGATGCGG

DG22
GGATAGATCTCGATCATAAATTATTAT
TATC

Verwendete Oligonukleotide zur Amplifi-
zierung des *pral*-Promotors.

Ppra1_HindIII_fw
AATAAGCTTGACACGAGATGGATCAGA
GC

Ppra1_sfi_rev_M
ATTGGCCGCGTTGGCCATCTTGGCACG
TACAAGATTG

4.1.3 Stämme

4.1.3.1 *E. coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm
DH5 α (Hanahan, 1985) verwendet. DH5 α ist
ein Derivat des *Escherichia coli*-Stammes
K12 mit folgenden genetischen Markern: F',
endA1, hsdR, hsdM, sup44, thi-1, gyrA1,
gyrA96, relA1, recA1, lacZ, Δ M15. Für die
Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR-
Topo Vektoren (Invitrogen) wurde teilweise
der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt,

ebenfalls ein *E. coli* K12-Derivat mit dem Genotyp: F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(Str^R), endA1, nupG.

4.1.3.2 Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

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

4.1.3.3 *U.maydis*-Stämme

Die Stämme in Tabelle 13 dienten in dieser Arbeit als Ausgangs- und/oder Teststämme, die in Tabelle 14 aufgelisteten Stämme wurden in dieser Arbeit hergestellt. In allen Stämmen wurden homologe Rekombinationsereignisse durch Southern-Analyses bestätigt.

Tabelle 13. In dieser Arbeit verwendete Ausgangsstämme.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	a1 b1	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	a2 b2	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6a	a2 b1	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6b	a1 b2	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FBD12-17	a2a2 b1b2	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB1Δpra1	a1 b2 Δpra1	Hyg ^R	H. Teunissen, unveröffentlicht
FB1Δgpa1	a1 b1 Δgpa1	Hyg ^R	Regenfelder et al. 1997
FB1Δgpa2	a1 b1 Δgpa2	Phleo ^R	H. Teunissen, unveröffentlicht
FB1Δgpa1Δgpa2	a1 b1 Δgpa1Δgpa2	Hyg ^R Phleo ^R	H. Teunissen, unveröffentlicht
FB2Δgpa1Δgpa2	a2 b2 Δgpa1Δgpa2	Hyg ^R Phleo ^R	H. Teunissen, unveröffentlicht
FB2Δgpa3 (ER2-19)	a2 b2 Δgpa3	Hyg ^R	Regenfelder et al. 1997
FB1Δgpa4	a1 b1 Δgpa4	Hyg ^R	Regenfelder et al. 1997
FB2Δgpa4	a2 b2 Δgpa4	Hyg ^R	Regenfelder et al. 1997
RU12	a2 b2 ip[P _{erg1} :sgfp]	Cbx ^R	Brachmann et al., 2001

Tabelle 14. In dieser Arbeit hergestellte Stämme¹, die alle durch Southern-Analyse verifiziert wurden.

Stammbezeichnungen ²	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
FB1pra1 ¹⁻³⁵⁷ :gfp	a1 b1 pra1:gfp	Hyg ^R	FB1
FB1pra1 ¹⁻²⁹⁸ :gfp	a1 b1 pra1 ¹⁻²⁹⁸ :gfp	Hyg ^R	FB1
FB1pra1 ¹⁻²⁹⁰ :gfp	a1 b1 pra1 ¹⁻²⁹⁰ :gfp	Hyg ^R	FB1
FB1pra1 ^{(182A-185A)(201A-204A)} :gfp	a1 b1 pra1 ^{(182A-185A)(201A-204A)} :gfp	Hyg ^R	FB1
FB1pra1:gfp-Nt	a1 b1 pra1:gfp-Nt	Hyg ^R	FB1
FB1pra1:gfp-Nt	a1 b1 pra1:gfp-Nt	Hyg ^R Cbx ^R	FB1pra1:gfp-Nt
ip[P _{crg1} :gpa3:gfp-Ct] ^{s.c.} (DG118, DG119)	ip[P _{crg1} :gpa3:gfp-Ct]		
FB1pra1:gfp-Nt	a1 b1 pra1:gfp-Nt	Hyg ^R Cbx ^R	FB1pra1:gfp-Nt
ip[P _{crg1} :gpa3:gfp-Ct] ^{m.c.} (DG115)	ip[P _{crg1} :gpa3:gfp-Ct]		
FB1Δgpa3 (DG74)	a1 b1 Δgpa3	Nat ^R	FB1
FB2Δgpa3 (DG154)	a2 b2 Δgpa3	Nat ^R	FB1
DG82, DG84, DG99	a1 b1 Δgpa1gpa2gpa4	Hyg ^R Phleo ^R	Sporen-segregation ³
DG86, DG93, DG95	a2 b2 Δ gpa1gpa2gpa4	Hyg ^R Phleo ^R	Sporen-segregation ³
DG60, DG61	a1 b1 Δgpa1–gpa4	Hyg ^R Phleo ^R Nat ^R	DG99
DG67, DG69	a2 b2 Δgpa1–gpa4	Hyg ^R Phleo ^R Nat ^R	DG86
FB1gpa1 ^{wt}	a1 b1 gpa1:3×HA	Nat ^R	FB1
FB1gpa1 ^{QL}	a1 b1 gpa1 ^{QL} :3×HA	Nat ^R	FB1
FB1gpa1 ^{GA}	a1 b1 gpa1 ^{GA} :3×HA	Nat ^R	FB1
FB2gpa1 ^{wt}	a2 b2 gpa1:3×HA	Nat ^R	FB2
FB2gpa1 ^{QL}	a2 b2 gpa1 ^{QL} :3×HA	Nat ^R	FB2
FB2gpa1 ^{GA}	a2 b2 gpa1 ^{GA} :3×HA	Nat ^R	FB2
FB1P _{crg1} :gpa1 ^{QL}	a1 b1 ip[P _{crg1} :gpa1 ^{QL}]	Cbx ^R	FB1
FB1P _{crg1} :gpa2 ^{QL}	a1 b1 ip[P _{crg1} :gpa2 ^{QL}]	Cbx ^R	FB1
FB1P _{crg1} :gpa3 ^{QL}	a1 b1 ip[P _{crg1} :gpa3 ^{QL}]	Cbx ^R	FB1
FB1P _{crg1} :gpa4 ^{RC}	a1 b1 ip[P _{crg1} :gpa4 ^{RC}]	Cbx ^R	FB1
FB1pra1:TAP	a1 b1 pra1:TAP	Hyg ^R	FB1
FB1Δpra1P _{pra1} :TAP	a1 b1 Δpra1P _{pra1} :TAP	Hyg ^R	FB1Δpra1
RU12Δgpa3	a2 b2 Δgpa3 ip[P _{crg1} :sgfp]	Cbx ^R Nat ^R	RU12

¹ die zur Herstellung dieser Stämme verwendeten Plasmide sind in Kap. 4.1.4 angegeben

² für mehrere unabhängig generierte Stämme mit gleichem Genotyp sind die Bezeichnungen dieser Stämme in der Stammsammlung angegeben.

³ diese Stämme gingen aus Pflanzeninfektion mit kompatiblen FB1Δgpa1Δgpa2/ FB2Δgpa1Δgpa2 × FB1Δgpa4/FB2Δgpa4 (siehe Ausgangsstämme) hervor.

^{s.c.} dieser Stamm enthält eine Einfachintegration von P_{crg1}:gpa3:gfp-Ct im *ip*-Locus

^{m.c.} dieser Stamm enthält eine Mehrfachintegration von P_{crg1}:gpa3:gfp-Ct im *ip*-Locus

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

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

4.1.4.1 Klonierungsvektoren

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

Vektor zur Klonierung von Restriktionsfragmenten mit *EcoRI* und Blau/Weiß-Selektion.

pCR2.1-TOPO[®] (Invitrogen)

pCR II-TOPO[®] (Invitrogen)

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

pCR 4-TOPO[®] (Invitrogen)

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

pCITE[®]-2a(+) (Novagen, Madison, WI, USA)

Dieser 3793 bp große Vektor enthält einen T7-Promotor gefolgt von einer CITE-enhancer-Sequenz zur gesteigerten *in vitro*-Translation von klonierten Sequenzen unter Verwendung eines Eukaryoten-Zell-Extrakts (*rabbit reticulocyte lysate*). Die CITE-Sequenz entstammt der 5'-nichtkodierenden Region des Encephalomyocarditis-Virus und wird als Cap-unabhängiger Translationsstartpunkt von Säugetier-Ribosomen erkannt (Parks 1986,

Duke 1992). Danach folgt ein Polylinker zur Insertion der Sequenz.

pGAD424 (Bartel et al. 1993)

Enthält eine Hefe 2 μ ori-Region, das *LEU2*-Markergen, den *ADHI*-Promotor, ein Kernlokalisationssignal, die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAD), einen Polylinker und den *ADHI*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an ein Protein der Wahl.

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

pBS-hhn (Kämper, 2004)

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

pHA_Nat(+)

Plasmid für die translationale Fusion von Proteinen an ein dreifach wiederholtes HA-Epitop, gefolgt von dem *nos*-Terminator und einer Nourseothricin-Resistenzkassette (Nat).

pTC_NAT (M. Feldbrügge, persönl.

Mitteilung)

Ein pUMa208-Derivat, in das eine 1437 bp lange Nat-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment eingefügt ist.

pRU11 (Brachmann, 2001)

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

p123-Pra1-full-myc (H. Teunissen, persönl.

Mitteilung)

Dieses Plasmid enthält einen 1 kb langen 5'-Promotor-Bereich von *pral*, das *pral*-Gen fusioniert an das Myc-Fusionsprotein und einen 360 bp langen 3'-Bereich von *pral*.

p123-Pra1-Sfo-AAAA-AAAA-Apa

(H. Teunissen, persönl. Mitteilung)

Dieses Plasmid ist wie p123-Pra1-full-myc (H. Teunissen) aufgebaut, enthält jedoch an zwei Stellen, die für die Aminosäuren 182–185 und 201–204 kodieren, je eine 12 bp lange mutierte Sequenz, die für Alanine kodiert.

pPra1-Gfp (H. Teunissen, persönl. Mitteilung)

Dieses pCR 4-TOPO[®] Plasmid enthält ein 1167 bp langes *pra1*-Fragment, das den 3'-Bereich von *pra1* enthält und C-terminal eine translationale Gfp-Fusion trägt, gefolgt von dem *nos*-Terminator, einer Hygromycin-Resistenzkassette und einem 928 bp langen *pra1*-3'-UTR-Bereich.

pPra1-TAP (P. Müller, H. Teunissen, persönl. Mitteilung)

Diese Plasmid enthält den 3'-Bereich des *pra1*-Gens fusioniert an das TAP-Fusionsprotein und ist geeignet für die Integration in den nativen *pra1*-Locus. Es entstand durch Austausch von Gfp in pPra1-Gfp gegen das TAP-Fusionsprotein, das an den Codon-Gebrauch von *U. maydis* angepasst wurde (M. Treutlein & J. Kämper, persönl. Mitteilung). Für die Transformation wurde ein *Bst*BI-*Bst*XI-Fragment des zuvor sequenzierten Plasmids benutzt.

pTopo-split-GfpNt (C. Basse, persönl. Mitteilung)

Ein Topo-Plasmid, das die N-terminale Hälfte des *egfp*-Gens als *Sfi*I-*Asc*I Fragment enthält.

p-Split-GfpC (C. Basse, persönl. Mitteilung)

Ein pRU11-Derivat, das den *crg1*-Promotor und die C-terminale Hälfte des *egfp*-Gens, gefolgt von einem *nos*-Terminator und der Carboxin-Resistenzkassette enthält. Inserts wurden über eine *Nde*I-*Sfi*I-Schnittstelle eingefügt.

pTopo2.1-**Gpa1^{GA}_PCR** (H. Teunissen, persönl. Mitteilung)

In Topo2.1 kloniertes PCR-Produkt der *gpa1*^{G203A}-Version, in der das Stop-Codon durch eine *Sfi*I-Schnittstelle ersetzt ist.

pTopo2.1-**Gpa1^{QL}_PCR** (H. Teunissen, persönl. Mitteilung)

In Topo2.1 kloniertes PCR-Produkt der *gpa1*^{Q204L}-Version, in der das Stop-Codon durch eine *Sfi*I-Schnittstelle ersetzt ist.

pTopo2.1-Gpa1^{wt}_PCR (H. Teunissen, persönl. Mitteilung)

In Topo2.1 kloniertes PCR-Produkt des *gpa1*-Gens, in der das Stop-Codon durch eine *Sfi*I-Schnittstelle ersetzt ist.

pTopo2.1-Gpa1_3'UTR (H. Teunissen, persönl. Mitteilung)

In Topo2.1 kloniertes PCR-Produkt eines ca. 1 kb langen 3'-*gpa1*-UTR-Bereichs.

pTopo2.1-Gpa2^{QL}_3'part (H. Teunissen, persönl. Mitteilung)

In Topo2.1 kloniertes PCR-Produkt eines 489 bp langen Fragments von *gpa2*^{Q207L} mit einem Aminosäureaustausch in der GTPase-Region.

pGADgpa1 (Krüger, 1999)

Ein pGAD424-Derivat, das eine GAL4-AD *gpa1*-Fusion enthält.

pGADgpa2 (J. Krüger, unveröffentlicht)

Ein pGAD424-Derivat, das eine GAL4-AD *gpa2*-Fusion enthält.

pGADgpa3 (J. Krüger, unveröffentlicht)

Ein pGAD424-Derivat, das eine GAL4-AD *gpa3*-Fusion enthält.

pGADgpa4 (J. Krüger, unveröffentlicht)

Ein pGAD424-Derivat, das eine GAL4-AD *gpa4*-Fusion enthält.

pGAD_Sc_gpa1 (Krüger, 1999)

Ein pGAD424-Derivat, das die GAL4-Aktivierungsdomäne an das *gpa1*-Gen aus *S. cerevisiae* fusioniert enthält.

pMET_STE2 (M. Vranes, persönl. Mitteilung)

Dieses Plasmid enthält die vollständige Sequenz des *S. cerevisiae* STE2-Pheromonrezeptors.

pCub_cam1 (M. Vranes, persönl. Mitteilung)

Dieses Plasmid enthält die cDNA-Sequenz des Calmodulins *cam1* aus *U. maydis*.

p123 pra2 #1 (P. Müller, unveröffentlicht)

Dieses Plasmid enthält die cDNA-Sequenz von *pra2* und kodiert für ein Valin (V) an zweiter Aminosäureposition. (Die auf NCBI veröffentlichte Sequenz kodiert für ein Phenylalanin an dieser Stelle).

4.1.4.3 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide und Stämme

pPra1-Gfp in pBS(+SKII)

Aus dem Plasmid pPra1-Gfp (H. Teunissen) wurde ein 6043 bp großes Fragment mit *EcoRI* ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* geöffneten, dephosphorylierten Vektor pBS(+SKII) kloniert. Das Insert enthält ein 1165 bp langes *pra1*-Fragment, das den 3'-Bereich von *pra1* enthält und C-terminal eine translationale Gfp-Fusion trägt, gefolgt von dem *nos*-Terminator, einer Hygromycin-Resistenzkassette und einem 928 bp langen *pra1*-3'-UTR-Bereich.

pPra1³⁵⁷-Gfp in pBS(+SKII)

Im Plasmid pPra1-Gfp in pBS(+SKII) wurde ein *BstBI-SfiI* Fragment gegen ein PCR-Amplifikat ausgetauscht, das die Sequenz des 3' Bereiches von *pra1* mit dem gesamten C-Terminus umfasst. Das PCR-Produkt wurde mit den Oligonukleotiden HT76 – DG2 unter Einführung einer *SfiI*-Schnittstelle und unter Verwendung des verifizierten Plasmids p123-Pra1-full-myc als Matrize amplifiziert und an-

schließend mit *BstBI* und *SfiI* geschnitten. Das 5508 bp große, aufgereinigte *BstBI-HpaI* Fragment dieses Plasmids wurde zur Transformation über homologe Rekombination in den *pra1*-Locus verwendet und damit der Stamm FB1pra1¹⁻³⁵⁷:gfp hergestellt.

pPra1²⁹⁸-Gfp in pBS(+SKII)

Im Plasmid pPra1-Gfp in pBS(+SKII) wurde ein *BstBI-SfiI* Fragment ausgetauscht gegen ein PCR-Amplifikat, das die Sequenz für einen um 59 aa verkürzten Pra1-C-Terminus umfasst. Das PCR-Produkt wurde mit den Oligonukleotiden HT76 – DG3 unter Einführung einer *SfiI*-Schnittstelle und unter Verwendung des verifizierten Plasmids p123-Pra1-full-myc amplifiziert und anschließend mit *BstBI* und *SfiI* geschnitten. Das 5246 bp große, aufgereinigte *BstBI-HpaI* Fragment dieses Plasmids wurde zur Transformation über homologe Rekombination in den *pra1*-Locus verwendet und damit der Stamm FB1pra1¹⁻²⁹⁸:gfp hergestellt.

pPra1²⁹⁰-Gfp in pBS(+SKII)

Im Plasmid pPra1-Gfp in pBS(+SKII) wurde ein *BstBI-SfiI* Fragment ausgetauscht gegen ein PCR-Amplifikat, das die Sequenz für den 3'-Bereich des Pra1-Proteins ohne C-Terminus umfasst. Das PCR-Produkt wurde mit den Oligonukleotiden HT76 – DG7 unter Einführung einer *SfiI*-Schnittstelle und unter Verwendung des verifizierten Plasmids p123-Pra1-full-myc amplifiziert und anschließend mit *BstBI* und *SfiI* geschnitten. Das 5222 bp große, aufgereinigte *BstBI-HpaI* Fragment dieses Plasmids wurde zur zur Transformation über homologe Rekombination in den *pra1*-Locus verwendet und damit der Stamm FB1pra1¹⁻²⁹⁰:gfp hergestellt.

pPra1^{(182A-185A) (201A-204A)}

Im Plasmid pPra1-Gfp in pBS(+SKII) wurde ein *BstBI-SfiI* Fragment gegen ein PCR-Amplifikat ausgetauscht, das die Sequenz des 3'-Bereiches des Pra1-Proteins mit Alaninsubstitutionen in der dritten cytoplasmatischen Proteinschleife umfasst. Das PCR-Produkt

wurde mit den Oligonukleotiden HT76 – DG2 unter Einführung einer *Sfi*I-Schnittstelle und unter Verwendung des verifizierten Plasmids p123-Pra1-Sfo-AAAA-AAAA-Apa (H. Teunissen), amplifiziert und anschließend mit *Bst*BI und *Sfi*I geschnitten. Das 5508 bp große, aufgereinigte *Bst*BI–*Hpa*I Fragment dieses Plasmids wurde zur Transformation über homologe Rekombination in den *pral*-Locus verwendet und damit der Stamm FB1_{pral}^{(182A-185A) (201A-204A)}.gfp hergestellt. Der Alaninaustausch in den Transformanden wurde mittels Sequenzierung des PCR-Amplifikats der genomischen DNA mit den Oligonukleotiden HT67 – Gpf_rev verifiziert.

pPra1:gfp-Nt

Im Plasmid pPra1³⁵⁷-Gfp in pBS(+)_{SKII}, das den C-terminalen Bereich von *pral* als translationale Fusion an *gfp* enthält, wurde das *gfp* mit *Sfi*I–*Asc*I ausgeschnitten und gegen das *Sfi*I–*Asc*I Fragment aus pTopo-GfpNt (C. Basse), das die N-terminale Hälfte von *gfp* kodiert, ersetzt. Das 5255 bp große, aufgereinigte *Bst*BI–*Hpa*I Fragment dieses Plasmids wurde zur Transformation über homologe Rekombination in den *pral*-Locus verwendet und damit der Stamm FB1_{pral}:gfp-Nt hergestellt.

pBS(+)_{SK II}_Pra1-TAP

Aus dem Plasmid pPra1-TAP (P. Müller, H. Teunissen) wurde ein 6043 bp großes Fragment mit *Eco*RI ausgeschnitten und in den mit *Eco*RI geöffneten, dephosphorylierten Vektor pBS(+)_{SKII} umklontiert, da sich das ursprüngliche Plasmid in *E. coli* nicht amplifizieren ließ. Ein 5356 bp großes *Bst*XI–*Bst*BI-Fragment dieses Plasmids wurde zur homologen Integration in den *pral*-Locus verwendet und damit der Stamm FB1_{pral}:TAP hergestellt.

pP_{Pra1}:TAP

Zur Expression des TAP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des *pral*-Promotors im nativen Locus wurde im Plasmid pBS(+)_{SK II}_Pra1-TAP der 3' Bereich des *pral*-Gens gegen ein ca. 1 kb langes *pral*-Promotorfrag-

ment ausgetauscht. Dieses *pral*-Promotorfragment wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden Ppra1_HindIII_fw und Ppra1_sfi_rev_M amplifiziert, mit *Bst*WI und *Sfi*I geschnitten und in das *Bst*WI–*Sfi*I geöffnete Plasmid kloniert. Für die Transformation wurde ein 5723bp langes *Hind*III–*Bst*XI-Fragment des zuvor sequenzierten Plasmids benutzt.

pGpa3:gfpCt

In das *Nde*I–*Sfi*I geöffnete Plasmid p-Split-GfpC (C. Basse) wurde ein PCR-Amplifikat des *gpa3*-Gens eingefügt. Das PCR-Produkt wurde unter Einführung einer *Nde*I–*Sfi*I mit den Oligonukleotiden g3_fw_Nde und g3_rev_Sfi mit genomischer FB1-DNA als Matrize amplifiziert und mit *Nde*I–*Sfi*I geschnitten. Das Plasmid wurde dann mit *Mfe*I für die Integration in den *ip*-Locus linearisiert. Für die Transformation wurden Protoplasten des Stammes FB1_{pral}:gfp-Nt verwendet. Der auf diese Weise hergestellte Stamm FB1_{pral}:gfp-Nt ip[P_{crg1}:gpa3:gfp-Ct] trägt wie angegeben eine oder mehrere Kopien des P_{crg1}:gpa3-Konstruktes. Die Expression der zusätzlichen Kopie von *gpa3* läßt sich in diesem Stamm durch die Arabinose-Induktion des *crg1*-Promotors induzieren.

pΔgpa3

Ein pCR2.1-TOPO[®]-Derivat, das einen 1844 bp langen 5' UTR-Bereich des *gpa3*-Gens, eine Nat-Resistenzkassette aus pTC_{NAT} als *Sfi*I-Fragment und einen 1074 bp langen 3'-UTR-Bereich des *gpa3*-Gens zur Geninaktivierung über homologe Rekombination enthält. Die 5'- und 3' UTR-Bereiche wurden als PCR-Amplifikate mit den Primerpaaren g3_lb_fw – g3_lb_sfi_rev und g3_rb_sfi_fw – g3_rb_rev und genomischer FB1-DNA als Matrize amplifiziert. Für die homologe Rekombination wurde das aufgereinigte PCR-Amplifikat mit den äußeren Primern und diesem Plasmid als Matrize verwendet. Damit wurden die Stämme FB1Δgpa3 (DG74), FB2Δgpa3 (DG154), DG60, DG61, DG 67, DG69 und RU12Δgpa3 hergestellt. Dieses PCR-Amplifikat wurde

auch als DIG-markierte Sonde in Southern-Blots verwendet.

pGpa1^{wt}:3HA

Dieses Plasmid entstand durch eine 3-Fragment-Ligation mit dem *SfiI*-*XbaI* geöffneten Plasmid pTopo2.1-Gpa1^{wt}_PCR. Darin wurden ein *SfiI*-*SfiI* geschnittenes Fragment mit dem 3×HA-Epitop, dem *nos*-Terminator und der Nat-Resistenzkassette aus pHA_Nat(+) sowie ein *SfiI*-*XbaI* geschnittenes 998 bp langes Fragment des *gpa1*-3'-UTR-Bereichs aus pTopo2.1-Gpa1_3'UTR eingefügt. Die Orientierung und Fusion im richtigen Leserahmen wurden durch Sequenzierung verifiziert. Für die homologe Rekombination in den *gpa1*-Locus wurde ein ca. 7,7 kb langes *PstI*-*SpeI* Fragment eingesetzt und so die Stämme FB1gpa1^{wt} und FB2gpa1^{wt} hergestellt.

pGpa1^{QL}:3HA

Dieses Plasmid entstand durch eine 3-Fragment-Ligation mit dem *SfiI*-*XbaI* geöffneten Plasmid pTopo2.1-Gpa1^{QL}_PCR. Darin wurden ein *SfiI*-*SfiI* geschnittenes Fragment mit dem 3×HA-Epitop, dem *nos*-Terminator und der Nat-Resistenzkassette aus pHA_Nat(+) sowie ein *SfiI*-*XbaI* geschnittenes 998 bp langes Fragment des *gpa1*-3'-UTR-Bereichs aus pTopo2.1-Gpa1_3'UTR eingefügt. Die Orientierung und die Fusion im richtigen Leserahmen wurden durch Sequenzierung verifiziert. Für die homologe Rekombination in den *gpa1*-Locus wurde ein ca. 7,7 kb langes *PstI*-*SpeI* Fragment eingesetzt. So wurden die Stämme FB1gpa1^{QL} und FB2gpa1^{QL} hergestellt, die einen Q²⁰⁴L-Aminosäureaustausch in *gpa1* enthalten.

pGpa1^{GA}:3HA

Dieses Plasmid entstand durch eine 3-Fragment-Ligation mit dem *SfiI*-*XbaI* geöffneten Plasmid pTopo2.1-Gpa1^{G203A}_PCR. Darin wurden ein *SfiI*-*SfiI* geschnittenes Fragment mit dem 3×HA-Epitop, dem *nos*-Terminator und der Nat-Resistenzkassette aus pHA_Nat(+) sowie ein *SfiI*-*XbaI* geschnitten-

es 998 bp langes Fragment des *gpa1*-3'-UTR-Bereichs aus pTopo2.1-Gpa1_3'UTR eingefügt. Die richtige Orientierung und die Fusion im richtigen Leserahmen wurden durch Sequenzierung verifiziert. Für die homologe Rekombination in den *gpa1*-Locus wurde ein ca. 7,7 kb langes *PstI*-*SpeI* Fragment eingesetzt und so die Stämme FB1gpa1^{GA} und FB2gpa1^{GA} hergestellt, die einem G²⁰³A-Aminosäureaustausch in *gpa1* enthalten.

pRU11-Gpa1^{QL}

Dieses Plasmid entstand durch das Ersetzen des *sgfp*-Gens in pRU11 mit der *gpa1*^{Q204L}-Version in einer 3-Fragment-Ligation. Ein *NdeI*-*ScaI*- und ein *NotI*-*ScaI*-Fragment des Ausgangsplasmids pRU11 wurde mit einem PCR-Amplifikat von *gpa1*^{Q204L} ligiert. Dieses PCR-Amplifikat wurde mit den Primern HT82 und *gpa1*-Stop_Not_rev unter Einfügen eines Stop-Codons und einer *NotI*-Schnittstelle und dem Plasmid pGpa1^{QL}:3HA als Matrize amplifiziert, sodass das Stop-Codon des *gpa1*-Gens wieder eingefügt wurde. Dieses PCR-Amplifikat wurde anschließend mit *NdeI*-*NotI* geschnitten. Das verifizierte Plasmid wurde für die Integration in den *ip*-Locus mit *SspI* linearisiert, über homologe Rekombination integriert und so der Stamm FB1P_{crgl}:gpa1^{QL} hergestellt.

pRU11-Gpa2^{QL}

Dieses Plasmid entstand durch das Ersetzen des *sgfp*-Gens in pRU11 mit der *gpa2*^{Q207L}-Version in einer 3-Fragment-Ligation. Ein *NdeI*-*ScaI*- und ein *NotI*-*ScaI*-Fragment des Ausgangsplasmids pRU11 wurde mit einem PCR-Amplifikat von *gpa2*^{Q207L} ligiert. Dieses PCR-Amplifikat wurde in zwei Schritten erhalten. Im ersten Schritt wurde mit dem Plasmid pTopo2.1-Gpa2^{QL}_3'part und den Primern HT88 und *gpa2*-Stop_Not_rev der 3'-Bereich von *gpa2*, der den Aminosäureaustausch und eine *AccI*-Schnittstelle enthält, amplifiziert. Im zweiten Schritt wurde mit den Primern HT83 und *gpa2*-Stop_Not_rev und FB1-DNA das *gpa2*-Gen amplifiziert. Beide PCR-Amplifikate wurden dann mit *AccI* ge-

schnitten, ligiert und mit den Außenprimern amplifiziert. Dieses Amplifikat wurde als *NdeI-NotI*-Fragment eingesetzt. Das verifizierte Plasmid wurde für die Integration in den *ip*-Locus mit *AgeI* linearisiert, über homologe Rekombination integriert und so der Stamm FB1P_{crg1}:gpa2^{QL} hergestellt.

pRU11-Gpa3^{QL}

Dieses Plasmid entstand durch das Ersetzen des *sgfp*-Gens in pRU11 mit der *gpa3*^{Q206L}-Version in einer 3-Fragment-Ligation. Ein *NdeI-ScaI*- und ein *NotI-ScaI*-Fragment des Ausgangsplasmids pRU11 wurde mit einem *NdeI-NotI* geschnittenen *gpa3*^{QL}-PCR-Amplifikat ligiert. Dieses PCR-Amplifikat von *gpa3*^{Q206L} wurde in zwei Schritten erhalten. Im ersten Schritt wurde mittels den Primern HT84 und gpa3QL_SapI_rev, der die Mutation Q(206)L einführt, ein 641 bp langes Fragment mit genomischer FB1-DNA als Matrize amplifiziert. Im zweiten Schritt wurde mit den Primern gpa3QL_SapI_fw und gpa3_Stop_Not_rev ein 471 bp langes Fragment mit genomischer FB1-DNA als Matrize amplifiziert. Durch das Schneiden der beiden Fragmente mit *SapI* fallen die Restriktionschnittstellen raus und nur die Mutation bleibt im Ligationsprodukt erhalten. Dieses Ligationsprodukt wurde mit den Außenprimern amplifiziert und für die Klonierung mit *NdeI-NotI* geschnitten. Das verifizierte Plasmid wurde für die Integration in den *ip*-Locus mit *AgeI* linearisiert, über homologe Rekombination integriert und so der Stamm FB1P_{crg1}:gpa3^{QL} hergestellt.

pGpa4^{RC} in Topo4

Dieses Plasmid enthält ein PCR-Amplifikat von *gpa4*^{R392C}, das in zwei Schritten hergestellt wurde. Im ersten Schritt wurde mittels den Primern Nde_gpa4_fw und gpa4_R(392)C_BsaI_rev, der die Mutation R(392)C einführt, ein 1200 bp langes Fragment mit genomischer FB1-DNA als Matrize amplifiziert. Im zweiten Schritt wurde mit den Primern gpa4_R(392)C_BsaI_fw und gpa4_Stop_Not_rev ein 593 bp langes Frag-

ment mit genomischer FB1-DNA als Matrize amplifiziert. Durch das Schneiden der beiden Fragmente mit *BsaI* fallen die Restriktionschnittstellen raus und nur die Mutation bleibt im Ligationsprodukt erhalten.

pRU11-Gpa4^{RC}

Dieses Plasmid entstand durch das Ersetzen des *sgfp*-Gens in pRU11 mit der *gpa4*^{R392C}-Version in einer 3-Fragment-Ligation. Ein *NdeI-ScaI*- und ein *NotI-ScaI*-Fragment des Ausgangsplasmids pRU11 wurde mit einem *NdeI-NotI* ausgeschnittenen *gpa4*^{R392C}-Fragment aus pGpa4^{RC} in Topo4 ligiert. Das verifizierte Plasmid wurde für die Integration in den *ip*-Locus mit *AgeI* linearisiert, über homologe Rekombination integriert und so der Stamm FB1P_{crg1}:gpa4^{RC} hergestellt.

Plasmide für die *in vitro*-Proteinsynthese

pCite_GAD-gpa1

In den *NdeI-BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NdeI-BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *gpa1*-Gens, das N-terminal an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert ist, eingesetzt. Als Matrize für das PCR-Produkt diente das Plasmid pGADgpa1 (J. Krüger) und die Oligonukleotide DG20 und DG18, die jeweils eine *NdeI*- und eine *BglII*-Schnittstelle einführen.

pCite_GAD-gpa2

In den *NcoI-BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NcoI-BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *gpa2*-Gens, das N-terminal an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert ist, eingesetzt. Als Matrize für das PCR-Produkt diente das Plasmid pGADgpa2 (J. Krüger) und die Oligonukleotide DG19 und DG18, die jeweils eine *NcoI*- und eine *BglII*-Schnittstelle einführen.

pCite_GAD-gpa3

In den *NdeI-BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NdeI-BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *gpa3*-Gens, das N-terminal an die GAL4-Aktivierungsdomäne

fusioniert ist, eingesetzt. Als Matrize für das PCR-Produkt diente das Plasmid pGADgpa3 (J. Krüger) und die Oligonukleotide DG20 und DG18, die jeweils eine *NdeI*- und eine *BglII*-Schnittstelle einführen.

pCite_GAD-gpa4

In den *NcoI*-*BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NcoI*-*BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *gpa4*-Gens, das N-terminal an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert ist, eingesetzt. Als Matrize für das PCR-Produkt diente das Plasmid pGADgpa4 (J. Krüger) und die Oligonukleotide DG19 und DG18, die jeweils eine *NcoI*- und eine *BglII*-Schnittstelle einführen.

pGAD_cam1

In den *BamHI*-*SalI* geöffneten Vektor pGAD424 wurde das Calmodulingen *cam1* als *BamHI*-*XhoI* Restriktionsfragment aus pCub_cam1 (M. Vranes) eingefügt. Die *SalI*-Schnittstelle ist hierbei kompatibel mit der *XhoI*-Schnittstelle.

pCite_GAD-cam1

In den *NdeI*-*BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NdeI*-*BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *cam1*-Gens, das N-terminal an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert ist, eingesetzt. Als Matrize für das PCR-Produkt diente das Plasmid pGAD_cam1 und die Oligonukleotide DG20 und DG18, die jeweils eine *NdeI*- und eine *BglII*-Schnittstelle einführen.

pCite_pra2 #11

In den *NdeI*-*BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NdeI*-*BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *pra2*-Gens eingesetzt. Als Template für das PCR-Produkt diente das Plasmid p123 pra2 #1 (P. Müller) und die

Oligonukleotide DG11_cPra2-G_fw und DG13_cPra2_rev, die jeweils eine *NdeI*- und eine *BglII*-Schnittstelle einführen.

pCite_pra2 #12

In den *NdeI*-*BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NdeI*-*BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *pra2*-Gens eingesetzt. Als Template für das PCR-Produkt diente das Plasmid p123 pra2 #1 (P. Müller) und die Oligonukleotide DG12_cPra2-T_fw und DG13_cPra2_rev, die jeweils eine *NdeI*- und eine *BglII*-Schnittstelle einführen. Der Primer DG12 ändert die zweite Aminosäure, die auf dem Template-Plasmid ein Valin kodiert zu einem Phenylalanin (F) ab, was der veröffentlichten Pra2-Aminosäuresequenz (NCBI) entspricht.

pCite_GAD_Scgp1

In den *NcoI*-*BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NcoI*-*BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *gpa1*-Gens aus *S. cerevisiae*, das N-terminal an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert ist, eingesetzt. Als Template für das PCR-Produkt diente das Plasmid pGAD_Sc_gpa1 (J. Krüger) und die Oligonukleotide DG19 und DG18, die jeweils eine *NcoI*- und eine *BglII*-Schnittstelle einführen.

pCite_ste2

In den *NdeI*-*BglII* geöffneten Vektor pCITE[®]-2a(+) wurde das *NdeI*-*BglII* geschnittene PCR-Amplifikat des *ste2*-Gens aus *S. cerevisiae* eingesetzt. Als Template für das PCR-Produkt diente das Plasmid pMET_STE2 (M. Vranes) und die Oligonukleotide DG21 und DG22.

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen oder Einzelkolonien nach einer Transformation wurden von YT-Amp (Ampicillin 100µg/ml) Festmedien angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

4.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurde für die Messung ein Absorptionsbereich von OD₆₀₀ 0,1–0,8 gewertet, bei höherer Absorption wurden die Kulturen vorher auf einen Wert unter 0,8 verdünnt. Als Nullwert diente die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

4.2.1.3 RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen et al. (1972). Zur Herstellung Transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM 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, 4°C (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30

bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3000 Upm, 4°C), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 30 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, 270 µl RF2-Lösung zugegeben und die Zellen auf 3–5 Transformations-Ansätze verteilt. Dazu wurde jeweils 1 µl Plasmidlösung (1–5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 250 µl des Transformations-Ansatzes wurde auf eine YT-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von bis zu 10⁶ Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung

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

RF2-Lösung

10 mM MOPS
(3-(N-Morpholino)propansulphonat)
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ × 2 H₂O
15%(v/v) Glycerin
mit NaOH auf pH 5,8 eingestellt
und sterilfiltriert

4.2.2 Kultivierung von *U. maydis*

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

4.2.2.1 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, wurde für die Messung ein Absorptionsbereich von OD₆₀₀ 0,1–0,8 gewertet, bei höherer Absorption wurden die Kulturen vorher auf einen Wert unter 0,8 verdünnt. Als Nullwert diente die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml.

4.2.2.2 Induktion des *crg1*-Promotors

Die Stämme wurden in Arrayminimalmedium angeimpft, das Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um reprimierende Bedingungen zu gewährleisten, und bis zu OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Für den Mediumwechsel wurden die Zellen abzentrifugiert (Sorvall, 3500Upm) und in 100 ml auf 28°C vorgewärmtem Induktionsmedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen im Ausgangsvolumen in Arrayminimalmedium resuspendiert, welches Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um den *crg1*-Promotor zu induzieren. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit inkubiert.

4.2.2.3 Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz et al. (1990) und Gillissen et al. (1992). Von einer frischen, auf Platte wachsenden Kultur wurden 50 ml YEPS_L-Flüssigkultur angesetzt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (maximal OD₆₀₀ = 0,8) angezogen. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Multifuge 4 KR) geerntet und in 2 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym (sterilfiltriert) resuspendiert. Die bei RT durch das Zellwand-lyisierende Novozym hervorgerufene Protoplastierung konnte im Mikroskop anhand der Veränderung der sonst zigarrenförmigen *U. maydis*-Zellen in eine kugelige Form beobachtet werden. Nach fast vollständiger Protoplastierung (3–5 min) wurden 20 ml 4°C kaltes SCS zugegeben und die Protoplasten 10 min bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Multifuge 4 KR) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen wurden die Protoplasten erneut in 20 ml SCS vorsichtig resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt, dann wurden die Zellen mit 20 ml STC gewaschen und das Pellet vorsichtig in 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten wurden 3–4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt. Zur integrativen Transformation mittels homologer Rekombination wurden 70 µl Protoplasten auf Eis aufgetaut und mit ca. 5 µg doppelsträngiger DNA (als Restriktionsfragment aus einem Plasmid oder ein PCR-Produkt) in maximal 10 µl Volumen und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit freireplizierenden Plasmiden wurden 70 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 4 bis 8 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf Antibiotikumhaltigen PD-Platten vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden durch Southern-Blot-Analyse verifiziert.

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 PEG-400 (Polyethylenglycol) in 15 ml
STC, sterilfiltriert

4.2.2.4 Herstellung von Konstrukten für Deletionsmutanten in *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Kämper (2004). Für die Herstellung von Deletionsmutanten wurden standardmäßig ~ 1 kb genomische Sequenz im 5'- und 3'- nichttranslatierten Bereich im Anschluß an den ORF mit einem Außenprimer (24mer) und einem Innenprimer, der eine *Sfi*I-Schnittstelle enthält, mit Phusion Polymerase (Finnzymes) amplifiziert. Die *Sfi*I-Schnittstellen der beiden Innenprimer sind nicht-palindromisch gewählt, um spätere Selbst-Ligation zu vermeiden. Die PCR-Amplifikate wurde über den Qiagen-PCR-Purification-Kit aufgereinigt, in 20–50 µl mit *Sfi*I (NEB, 20U, 2h) geschnitten und erneut aufgereinigt. Für die Ligation wurden je ~ 0,2 µg der amplifizierten 5'- und 3'- Flanken sowie ~ 0,2 µg einer mit *Sfi*I geschnittenen Resistenzkassette mit Quick-Ligase (NEB) oder T4-Ligase (Roche) in 20 µl Reaktionsvolumen inkubiert. Anschließend wurden die Ligationsprodukte über ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetrennt und mit

dem Qiagen-GelExtraction-Kit eluiert. Das aufgereinigte Ligationsprodukt wurde entweder für eine PCR-Amplifikation mit den Außenprimern verwendet oder falls dies nicht erfolgreich war in pCR 4-TOPO (Invitrogen) kloniert und die Flanken sequenziert. Das PCR-Amplifikat konnte nach Aufreinigung direkt in die Transformation eingesetzt werden, im Falle des Plasmids wurde es zuvor wieder ausgeschnitten.

4.2.2.5 Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum

U. maydis-Stämme wurden von Festmedium in CM-Glucose Flüssigmedium transferiert und bei 28°C, 200 Upm schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,8 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (3.500 Upm, 5min, RT, Heraeus Biofuge pico) pelletiert und anschließend für eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 2 in einem entsprechenden Volumen H₂O_{bid.} aufgenommen. Für Kreuzungen wurden gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von diesen Ansätzen wurden 5 µl auf eine PD-Charcoal-Platte getropft. Die Platte wurde zusätzlich mit Parafilm verschlossen und bei 22°C für 48 h inkubiert.

4.2.2.6 Test auf Pheromonsekretion im Konfrontationsansatz

Diese Methode wurde ausführlich in Snetselaar et al. 1996 beschrieben. *U. maydis*-Kulturen wurden wie im Paarungstest beschrieben kultiviert, pelletiert, und in Wasser in definierter optischer Dichte aufgenommen. Anschließend wurden sie auf einem mit Wasser-Agar (1% Agar) beschichteten Objektträger in einer Distanz von 100–300 µm aufgetropft und mit einem Tropfen Paraffin-Öl überschichtet. Danach wurden die Objektträger in eine feuchte Petrischale gelegt und

mit Parafilm verschlossen um ein Austrocknen zu verhindern. Nach Inkubation über Nacht wurden sie am nächsten Tag mikroskopiert.

4.2.2.7 Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu testenden Stämme wurden in CM-Flüssigmedium mit 1% Glucose bei 28°C und 200 Upm bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} \sim 0,5$ inkubiert. Davon wurden je 200 µl Kultur in einem 2 ml-Eppendorfgefäß pelletiert (3.000 Upm, 5min, RT) und der Überstand abgenommen. Die Zellpellets wurden in 200 µl CM-Glucose (1%-Flüssigmedium, dem entweder kompatibles Pheromon in DMSO in einer Endkonzentration von 2,5 µg/µl oder nur DMSO zugesetzt war, resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in 2 ml-Eppendorfgefäßen auf einem Drehrad (Snijders) gedreht. Nach frühestens 4 h konnte mit dem Mikroskop die Bildung von Konjugationshyphen beobachtet und analysiert werden.

4.2.2.8 Test auf Pathogenität

Der verwendete Pathogenitätstest ist eine Spritzinfektion, bei der etwa 300 µl einer *U. maydis*-Suspension in Wasser mit einer $OD_{600} = 1$ in das Innere des Blattwirtels einer 6 Tage alten Maispflanze der Sorte Golden Bantam gespritzt wird. Für die Infektion wurden YEPS_L-Übernachtulturen mit einer OD_{600} von 0,5–1,0 verwendet. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Multifuge 4 KR) geerntet und in Wasser zu einer $OD_{600} = 1$ aufgenommen. Bei Mischungen wurden entsprechende Suspensionen vorher 1:1 gemischt. Tumorbildung an den Maispflanzen konnte frühestens nach etwa 5 Tagen beobachtet werden. 14 Tage nach Infektion erfolgte die Bonitur und eine erste lichtmikroskopische Untersuchung der Tumore auf Sporenbildung.

4.2.2.9 Sporulation und Segregationsanalyse

Von infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und 3 Tage bei 37°C getrocknet. Das getrocknete Tumormaterial wurde zerkleinert und in Wasser mit Ampicillin (100 µg/ml) und Tetracyclin (5 mg/ml) aufgenommen, für 30 min inkubiert und anschließend mit H_2O_{bid} gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf PD-Platten ausplattiert und bei 28°C für 3 Tage inkubiert. Die aus einer Spore entstandenen Sporidien-Kolonien 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. Zusätzlich wurden die Genotypen mittels PCR und *a*-locus spezifischen Primern bestätigt.

4.2.2.10 Test auf H₂O₂-Sensitivität

160 µl *U. maydis*-Kultur mit einer OD_{600} von 0,6–0,8 wurden auf eine Viertelfläche einer quadratischen Petrischale ausplattiert. Nach Antrocknen wurde eine Filterscheibe, die mit 1 µl einer 30%igen H_2O_2 -Lösung getränkt war, daraufgelegt. Nach 2 Tagen Inkubation bei 28°C wurde der Durchmesser der wachstumshinhibierten Zone um die Filterscheibe gemessen.

4.2.2.11 Anfärben der Infektionsstrukturen von *U. maydis* auf der Blattoberfläche von Mais

Zur Untersuchung des filamentösen Wachstums und der Bildung von Appressorien-Strukturen auf der Maispflanze wurden nach 24 und 48 h je zwei infizierte Pflanzen geerntet und präpariert. Dafür wurden 2 cm lange Stücke unterhalb der Einstichstelle des dritten Keimblattes mit einer Rasierklinge abgeschnitten und die Blattspreite entfernt. Nach kurzem Waschen in Wasser wurden die Blattstücke für 30 sec in einer Calcofluor-Lösung

(100 µg/ml Fluorescent Brightener 28 (Sigma) in 0,2 M Tris pH 8,0) inkubiert und nochmal in Wasser getaucht um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Präparate wurden anschließend in einem Tropfen Wasser mit der Blattunterseite nach oben unter UV-Licht im Fluoreszenzmikroskop (Axioplan II, ZEISS) untersucht.

4.2.2.12 Anfärben von *U. maydis* Infektionsstrukturen im Maisblatt

Um das Wachstum von *U. maydis* innerhalb des Blattes zu untersuchen wurden zu gewünschten Zeitpunkten ca. 2 cm lange Stücke unterhalb der Einstichstelle des dritten Keimblattes mit einer Rasierklinge abgeschnitten, über Nacht in Ethanol entfärbt, mit Wasser gewaschen und für 3–4 h in 10% KOH bei 90°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Wasser wurden die Blätter in CBE-Färbelösung bei 60°C über Nacht inkubiert, die Färbelösung wieder entfernt und mit 50% Glycerol bei RT mindestens 1 Tag inkubiert um überschüssige Färbung zu entfernen. Die gefärbten Präparate sind mehrere Jahre in 50% Glycerol haltbar. Für die lichtmikroskopische Analyse müssen die Präparate vorsichtig gehandhabt werden, da durch die Behandlung mit KOH das Pflanzenmaterial destabilisiert wird und leicht zerfällt.

CBE-Färbelösung

0,03% Chlorazol Black E (Sigma)
in einem 1:1:1 Verhältnis in Wasser:
Milchsäure: Glycerol
Der Farbstoff wird zuerst in Wasser gelöst.

4.2.2.13 Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 10%-iger Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1% direkt im Medium fixiert. Nach 30 min Unkubation auf einem Drehrad wurden die Zellen pelletiert (3.500 Upm, 5min, RT), zweimal mit PBS gewaschen, in

PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert. Filamentöse Zellen wurden durch längere Zentrifugationszeiten pelletiert.

PBS

79 mM Na₂HPO₄
145 mM KH₂PO₄
5 mM MgCl₂ × 6 H₂O
27 mM KCl
137 mM NaCl

4.2.2.14 WGA-Färbung (Chitin-Färbung)

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden mit 5 µl einer WGA-FITC Stammlösung (Sigma, 2mg/ml) versetzt und 15 min auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (3500 Upm, 5 min, RT) und in PBS aufgenommen und mikroskopiert.

4.2.2.15 DAPI-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT) und in 200 µl H₂O_{bid.} aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf ein mit Polylysin beschichtetes Deckglas gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde das Deckglas mit den fixierten Zellen nach unten in eine Petrischale mit PBS gelegt (Waschschritt). Das Deckglas wurde abgetropft, so dass ca. 10 µl am Deckglas verblieben. In eine Petrischale wurden 10 µl einer DAPI-Lösung (Sigma 1mg/ml in PBS + 50% Glycerin) in 10 ml PBS gegeben, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und 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 bis zur Mikroskopie aufbewahrt.

VALAP

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

4.2.3 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axioplan II, Zeiss, Jena, Germany) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie sowie Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 40fach Plan-Neofluar Objektiv, numerische Apertur 1,3 (Zeiss) oder ein 100fach Plan-Apochromat Objektiv, numerische Apertur 1,4 (Zeiss) verwendet. 8 μ l der entsprechenden Kultur wurden auf einen Objektträger getropft und mit einem Deckglas bedeckt. Optional wurde 6 μ l der Kultur mit 6 μ l einer wässrigen Low-Melting-Agarose (1% 37°C, Sigma) vermischt und mit einem Deckglas bedeckt um eine Fixierung der Zellen zu erreichen. Für die Epifluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgenden Anregungs- und Emissionsspektren eingesetzt:

DAPI 365 nm und >397 nm, CFP 436 nm und >470nm, GFP 450–490 nm und 505–530 nm, FITC 450–490 nm und 515–565 nm, Rhodamin 546 nm und >590 nm. Digitale

Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (CoolSNAP-HQ CCD, Photometrics, Tuscon, AZ, USA) aufgenommen und mit dem Programm MetaMorph (Universal Imaging, Downing Town, PA, USA) ausgewertet.

Für die konfokalen Aufnahmen wurde ein Leica TCS SP5-Lasermikroskop (Leica, Bensheim) benutzt.

4.2.4 Fluorimetrische Messungen von Gfp in einer Zellsuspension

U. maydis-Kulturen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5–0,8 kultiviert, Aliquote davon pelletiert und mit sterilem H_2O auf eine $OD_{600} = 1$ gebracht. 200 μ l Zellsuspension wurde in eine Mikrotiterplatte transferiert und die Fluoreszenz in einem Tecan Sapphire Fluoreszenzscanner mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm bei einer Bandweite von 7,5 nm gemessen. Die Fluoreszenz wurde auf die parallel gemessene OD_{600} normalisiert und von der Hintergrundfluoreszenz (H_2O) subtrahiert.

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, deren Anwendung in *U. maydis* in Brachmann (1995). Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch in einem Ultrospec 3000 pro UV-Spektralphotometer (Amersham pharmacia biotech) bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA, 33 μ g/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 μ g/ml RNA. Als

Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 bzw. 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigung mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigung mit Salzen oder Zuckern.

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

4.3.1.1 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 (13.000 Upm, 2 min, RT, Heraeus Biofuge pico). Das Zellpellet wurde in 350 µl STET (siehe unten resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung 30 sec gevortext und anschließend 1 min bei 99°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert 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 4,8 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in 100 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus einer 1,5 ml Übernachtskultur etwa 20–50 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

4.3.1.2 DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist nach Hoffman und Winston (1987) modifiziert. Es wurden 1,5 ml einer

Übernachtskultur in YEPS_L-Flüssigmedium zusammen mit ca. 0,3 g Glasperlen (150-212 microns; Sigma) in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 2 min, RT, Heraeus Biofuge pico), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform (pH 8) aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13.000 Upm, 15 min, RT) wurden 400 µl der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 2 min, RT) wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in 50 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 55°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

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

TE-Puffer

10 mM Tris-Base
1 mM Na₂-EDTA × 2 H₂O
in H₂O_{bid.} und pH 8,0 mit HCl eingestellt

4.3.1.3 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 OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Multifuge 4 KR) 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 8 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (13.000 Upm, 15 min, 4°C, Heraeus Biofuge pico) 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, Heraeus Biofuge stratos) wurde die RNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20–50 µl H₂O_{bid.} aufgenommen, 10 min bei 55°C gelöst und bei –80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 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
in H₂O_{bid.}

AE-Phenol/Chloroform

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

4.3.1.4 RNA-Isolierung nach der Trizol-Methode

Für Transkriptomanalysen wurde die Gesamt-RNA aus Flüssigkulturen mit dem TRIZOL[®] Reagenz nach dem Protokoll der Firma Invitrogen isoliert. Dazu wurde das tiefgefrorene Zellpellet aus Flüssigkultur in 2–3 ml TRIZOL[®] Reagenz resuspendiert, in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und ca. 0,3 g Gasperlen (150-212 microns; Sigma) zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 min in einer Schwingmühle (MM200; Retsch) bei 30 Hertz, 4°C.

Anschließend wurden die Proben mit 200 µl Chloroform versetzt, gut gemischt und 25 min bei 13.000 Upm, 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Nach Phasentrennung wurden 500 µl der oberen wässrigen Phase in ein neues, RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und die RNA nach Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Die RNA wurde anschließend 10 min bei 11.000 Upm, 4°C pelletiert (Heraeus Biofuge stratos), mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen und erneut 5 min bei 9000 Upm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach kurzem Antrocknen (ca. 5 min bei RT) in 50 µl RNase freiem Wasser (Ambion) für 10 min bei 55°C gelöst. Zur Konzentrations- und Qualitätsbestimmung wurde 1 µl im NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer über einen Absorptionsbereich von 220–350 nm gemessen. Eine weitere Qualitätskontrolle erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer[®] nach dem Herstellerprotokoll. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –80°C.

4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

4.3.2.1 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Die RNA-Denaturierung wird in dieser Methode durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht. Die RNA-Probe (10–15 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, wobei das Gel nach 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht wurde um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten.

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

4.3.2.2 Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert. Dadurch werden die Purine teilweise abgespalten und der Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 3 h.

4.3.2.3 Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20× SSC für 4 h oder über Nacht. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20× SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (302 nm, 120 mJ/cm², UV Stratalinker 1800, Stratagene) an die Membran kovalent gebunden. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Mem-

bran erfolgte mittels Färbung mit Methyleneblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat). Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

20× SSC

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

4.3.3 Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren mit dem DIG-System

4.3.3.1 Herstellung von DIG-markierten Hybridisierungs sonden

DNA-Fragmente von 500–4000 bp Länge wurden mit Digoxigenin-dUTP mittels DIG-High Prime Kit (Roche) nach dem Herstellerprotokoll markiert. Dafür wurde ca. 1 µg Matrizen-DNA in 16 µl H₂O_{bid.} gelöst und 10 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 4 µl DIG-High Prime Mix (Roche) zugegeben, kurz zentrifugiert und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Markierung wurde durch Erhitzen auf 65°C für 10 min gestoppt.

Alternativ wurden PCR-Produkte mit dem PCR-DIG-labeling Mix (Roche) markiert. Neben dATP, dCTP, dGTP, dTTP ist zusätzlich Digoxigenin-dUTP enthalten, das während der PCR in das Produkt eingebaut wird. Nicht-eingebaute DIG-11-dUTP Nukleotide wurden durch Aufreinigung über S-300 HR Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) entfernt.

Verwendete Sonden

pral-Ctermini und *pral*-Gpf-Nt und *pral*-TAP:

ein 535 bp langes PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden HT76 und HT96 amplifi-

ziert wurde mit dem Plasmid pPra1³⁵⁷-Gfp in pBS(+)-SKII bzw. pBS(+)-SKII als Matrize.

P_{pra1}:Tap

ein 1689 bp langes PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden HT62 und DG9 amplifiziert wurde; das Plasmid pBS(+)-SK II_Pra1-TAP diente als Matrize.

Cbx-Sonde zur Verifizierung der Integration der Konstrukte *gpa3:gfp-Ct* und *gpa1^{QL}*, *gpa2^{QL}*, *gpa3^{QL}*, *gpa4^{RC}* in den *ip*-Locus: *cbx* als *HindIII-AscI* Fragment aus pRU11Ct ausgeschnitten und mit DIG-High-Prime markiert

Δgpa3

PCR-Produkt auf das Plasmid pΔgpa3 mit den Primern *g3_lb_fw* und *g3_rb_rev*.

Δgpa4

ein 2785 bp langes PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden *Dgpa4_fw* und *Dgpa4_rev* und mit genomischer DNA des Stammes FBΔgpa4 (Spellig, 1996) als Matrize amplifiziert wurde. Es umfasst die Hygromycin-Resistenzkassette sowie 45 bp und 56 bp der *gpa4*-Sequenz.

Δras1

PCR-Produkt auf das Plasmid pΔras1 mit den Primern *Ras1_lb* und *Ras1_rb*.

4.3.3.2 Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die Membran wurde mit der Seite der gebundenen Nukleinsäure nach innen zeigend in einer Hybridisierungsröhre mit 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C (DNA) oder 60°C (RNA) für 30 min in einem Hybridisierungsofen drehend prähybridisiert. Die mit DIG-11-dUTP markierte Sonde in 20 ml Hybridisierungspuffer wurde für 10 min in einem kochendem Wasserbad denaturiert und sofort zum Blot in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C (DNA) bzw. 60°C (RNA) über

Nacht. Danach wurde die Sondenlösung abgegossen und für eine erneute Verwendung bei -20°C gelagert. Die Membran wurde zweimal mit 15 ml Southern-Waschpuffer bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran in eine Schale gelegt und langsam bei Raumtemperatur schwenkend mit folgenden Lösungen inkubiert: 5 min mit DIG-Waschpuffer, 30 min mit DIG2 (zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen), 30–60 min in Antikörperlösung, zweimal 15 min in DIG-Waschpuffer, 5 min in DIG3 und 5 min in 50 ml Chemolumineszenz-Lösung. Nach kurzem Abtropfen wurde die Membran luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt und zur Aktivierung der Enzymaktivität 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Detektion der Chemolumineszenz-Signale wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-Omaz XAR-5) auf die Membran aufgelegt und je nach Signalstärke für 30 sec–1 h exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

Southern-Hybridisierungspuffer

0,5 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0
7%(w/v) SDS

Southern-Waschpuffer

0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0
1%(w/v) SDS

DIG1

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
mit NaOH pH 7,5 eingestellt

DIG2

10%(w/v) Blockierungsreagenz (Roche) in DIG1

Antikörperlösung

1:10.000 Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente (Roche) in DIG2

DIG-Waschpuffer

0,3%(v/v) Tween-20 in DIG1

DIG3

0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂ × 6H₂O
pH 9,5 mit 1 M Tris-HCl, pH 9,5
eingestellt

Chemolumineszenz-Lösung

1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3

4.3.4 Sequenzierung und Strukturanalyse

4.3.4.1 Sequenzierung von DNA

Plasmid DNA (1–2 µg mit einer Konzentration von 250 ng/µl) wurde mit den entsprechenden Primern zur Durchführung der Sequenzierung an die Abteilung „ADIS“ des Max Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln geschickt.

Alternativ wurden Sequenzierungen in der Abteilung Ökophysiologie, MPI Marburg durchgeführt. Hierzu wurden folgende Komponenten gemischt:

BigDye Terminator v3.1 Cycle Mix 2 µl
(Applied Biosystems)
5× Seq dilution buffer 3 µl
DNA (Plasmid, 200 ng) x µl
Primer (5 pmol/ µl) 1 µl
mit H₂O auf 20 µl auffüllen

und im Thermocycler amplifiziert:

96°C 1 min
----- 25 cycles:
96°C 10 sec
60°C 4 min

Anschließend wurde das Amplifikat durch Zugabe von 10 µl 125 mM EDTA, 9 µl 3M NaAc (pH 4,6), 80 µl H₂O_{bid.} und 400 µl Ethanol bei RT für 30 min präzipitiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 30 min, RT) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert (13.000 Upm, RT) und der Überstand vollständig entfernt.

Für die Sequenzierung wurde das Pellet in 20 µl Formamid resuspendiert und konnte bei –20°C gelagert werden.

4.3.4.2 Sequenzanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

Sequencher 4.1.2 (Gene Codes Corporation)

Zur Auswertung von Sequenz-Rohdaten (.ab1) und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

DNA-STRIDER 1.3 (Douglas, 1995; Marck, 1988)

Zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen.

Clone Manager 6 (Sci Ed Central)

Zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen sowie zur graphischen Darstellung.

4.3.4.3 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 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d. h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Bei Verwendung der Taq-Polymerase wurde ein Hot-Start durchgeführt indem die Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben wurde, Phusion Polymerase (Finenzymes) dagegen wurde direkt in den Ansatz zugegeben. Bei Verwendung von Oligonukleotiden mit einer Hybridisierungstemperatur von 55°C und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

94°C/5 min – + 1 U Taq – [94°C/1 min – 55°C/30 sec – 72°C/1min]× 30 – 72°C/5 min
Wurden andere Oligonukleotide benutzt oder längere Amplifikate hergestellt mussten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Es

wurden die PCR-Geräte OmniGene (Hybaid), PTC100 (MJ Research) und Robocycler Gradient 96 (Stratagene) verwendet.

10× PCR-Puffer
100 mM TrisHCl, pH 8,3
500 mM KCl
15 mM MgCl₂

4.4 Transkriptom-Analyse von *U. maydis*

4.4.1 Wachstumsbedingungen

Für die Expressionsanalyse wurden alle verwendeten Stämme ausschließlich in Array-minimalmedium angezogen. Die Stämme wurden wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben kultiviert und waren zuvor immer frisch von Glycerinkulturen auf PD-Festmedium ausgestrichen worden, worauf sie nicht länger als 2 Tage bei 4°C gelagert worden sind bevor davon die Vorkultur angeimpft wurde. Für die Microarray-Analysen wurden Proben verwendet, die 3 h nach Mediumwechsel genommen wurden.

4.4.1.1 RNA-Isolierung

siehe Kapitel 4.3.1.4

4.4.1.2 RNA-Aufreinigung nach RNeasy-Protokoll

100 µl gelöste RNA wurde mit 350 µl Puffer RLT und 250 µl Ethanol gemischt und auf eine RNeasy-Säule gegeben. Diese wurde 15 sec bei 10.000 Upm, RT (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE wurde die Säule bei 10.000 Upm, 15 sec, RT zentrifugiert. Es wurde erneut 500 µl Puffer RPE auf die Säule gegeben und nun für 2 min zentrifugiert. Um restliches Ethanol zu entfernen wurde die Säule noch einmal für 1 min zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix pipettiert und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Das Eluat wurde für eine Wiederholung dieses Schrittes eingesetzt. Diese Methode orientiert

sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll des Herstellers hervor.

4.4.1.3 cDNA-Synthese nach dem Affymetrix-Protokoll

Alle nachfolgenden Schritte der Ein-Schritt-Amplifikation sind im „GeneChip® Expression Analysis Technical Manual“ der Firma Affymetrix näher beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

Zur Synthese eines cDNA-Erststranges wurden 5 µg gereinigte RNA (nach Konzentrationsbestimmung am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer und Qualitätskontrolle am Agilent 2100-Bioanalyzer®) und 100 pmol T7(dT)-Primer in einem Volumen von 20 µl für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Ansatz auf Eis gestellt, mit 4 µl 5× Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und für 2 min bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl SuperScript II RT Reverser Transcriptase (Gibco) wurde der Ansatz für 1 h bei 50°C inkubiert.

Zur Zweitstrangsynthese wurde der oben beschriebene Ansatz mit 91 µl H₂O, 30 µl 5× Zweitstrangpuffer, 3 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *E. coli*-DNA-Ligase (10 U/ml), 4 µl *E. coli*-DNA-Polymerase I und 1 µl *E. coli*-RNaseH versetzt und für 2 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase zugegeben, der Ansatz für weitere 5 min bei 16°C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Diese Methode orientiert sich an den Protokollen der Firmen Affymetrix und Invitrogen; die genaue

Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

cDNA-Aufreinigung

600 µl cDNA-Bindpuffer wurden zu 162 µl cDNA gegeben, der Ansatz kurz gevortext und auf eine cDNA-Reinigungssäule (GeneChip Sample Cleanup Module, Qiagen) aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 Upm, RT wurde die Säule mit 750 µl cDNA-Waschpuffer gewaschen und erneut für 1 min bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Die Elution der cDNA erfolgte mit 14 µl cDNA-Elutionspuffer und 1 min Zentrifugation bei 13.000 Upm, RT. Eine Qualitätskontrolle der cDNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer®. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus diesem Protokoll hervor.

4.4.1.4 cRNA-Synthese und Biotinylierung

Zur in vitro Transkription von cDNA und dem parallelen Einbau von biotinylierten Ribonukleotiden wurde das BioArray™ HighYields™ RNA Transcript Labeling Kit (ENZO) verwendet. Die Gesamtmenge der verfügbaren cDNA (12 µl) wurde mit 4 µl 10× HY-Puffer, 4 µl 10× Biotin-markierter Ribonukleotide, 4 µl 10× DTT, 4 µl 10× RNase-Inhibitoren und 2 µl 20× T7-RNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 40 µl versetzt. Die Komponenten wurden kurz gevortext, abzentrifugiert und bei 37°C für 16 h inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde der Ansatz nach jeweils 40 min bei 750 rpm für 30 sec geschüttelt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Enzo; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

cRNA-Aufreinigung

Das Gesamtvolumen der in vitro-Transkriptions-Reaktion wurde mit 60 µl H₂O auf 100 µl eingestellt und nach dem RNeasy Protokoll wie oben beschrieben aufgereinigt. Zur Elution der cRNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix pipettiert, 2 min inkubiert bei RT und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Das Eluat wurde für eine Wiederholung dieses Schrittes eingesetzt.

cRNA-Fragmentierung

20 µg cRNA wurden nachfolgend durch Metall-induzierte Hydrolyse in ca. 35–200 bp lange Stücke fragmentiert. Dafür wurde 8 µl Mg²⁺-haltiger 5× Fragmentierungspuffer in einem Volumen von 40 µl zur cRNA gegeben und bei 94°C für 35 min inkubiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen (GeneChip Sample Cleanup Module). Anschließend wurde ein Aliquot der nicht-fragmentierten und der fragmentierten cRNA auf die erfolgreiche Fragmentierung hin auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer® analysiert.

4.4.1.5 Microarray-Hybridisierung und Detektion

Array-Hybridisierung

30 µl der fragmentierten cRNA wurden mit 5 µl des Kontroll-Oligo B2, 15 µl 20× Hybridisierungskontrollen, 3 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 3 µl BSA (50 mg/ml), 150 µl 2× Hybridisierungspuffer und Nuklease-freiem H₂O (Ambion) in einem Gesamtvolumen von 300 µl gemischt. Dieses Reaktionsgemisch wurde für 5 min bei 99°C erhitzt, dann für 5 min bei 45°C inkubiert und 5 min bei 13.000 Upm, RT abzentrifugiert. 200 µl davon wurden in den Microchip MPIUstilagoa (Affymetrix) pipettiert, der zuvor mit 200 µl 1× Hybridisierungspuffer bei 45°C für 10 min äquilibriert worden war. Nach Verschließen der Chip-Septen mit Klebpunkten wurde der Chip bei 45°C und

60 Upm für 16–18 h hybridisiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus diesem Protokoll hervor.

Array-Detektionsreaktionen

Nach der Hybridisierung wurde der Chip entleert und mit 300 µl Waschpuffer A vollständig gefüllt. Die Nachweisreaktion wurde mit einem „SAPE-Mix“, bestehend aus 300 µl 2× MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml), 6 ml Ziegen-Igg (10 mg/ml), 3,6 µl biotinyliertem Antikörper (0,5 mg/ml) und Nuklease-freiem H₂O (Ambion) in einem Gesamtvolumen von 600 µl durchgeführt. Es wurde das Programm EukGE-WS2v4 für sämtliche Wasch- und Detektionsschritte in einer GeneChip Fluidics Station 400 verwendet. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus diesem Protokoll hervor.

Datenanalyse

Nach Abschluss der Wasch- und Markierungsschritte wurden die Arrays mit Hilfe eines GeneArray Scanners (Agilent/Affymetrix) gescannt und mit dem Programm GeneChip

Expression Analysis (GCOS) Microarray Suite 5.0 (Affymetrix) mit Standard-Einstellungen (beschrieben in Eichhorn et al., 2006) eingelesen. Das resultierende Bild wurde zunächst unter Verwendung des selben Programms ausgewertet, normalisiert und die Expressionswerte kalkuliert.

Für die Transkriptom-Vergleiche wurde die statistische Berechnung der Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Unterschiedes „adjusted p“ zweier Expressionswerte mit dem Programm-Paket Bioconductor R durchgeführt. Dafür wurden die Expressionswerte logarithmiert (\log_2 Wert + 1) und das Modell Limma (Smyth, 2004) für die Expressionsanalyse differentiell regulierter Gene benutzt. Eine Auswertung der Transkriptom-Vergleiche wurde mit Hilfe des Programms DNA-Chip Analyzer „dChip“ 2004 (Li & Wong, 2001) auf der Basis eines vorgegebenen Wahrscheinlichkeitswert von $p_{adj} < 0,01$ durchgeführt. Bei der vergleichenden Analyse der experimentellen Arrays mit den Kontrollarrays wurden Gene herausgefiltert, deren Expression mindestens zweifach induziert oder reprimiert war. Bei der Berechnung der faktoriellen Veränderung der Genexpression wurde ein Vertrauensintervall von 90% („lower confidence bound of fold change 2“) vorgegeben (Li & Wong, 2001).

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt (Laemmli, 1970). Dafür wurde eine Mini Protean II Apparatur (Biorad) benutzt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA für 1 h. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in

Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

SDS-PAGE-Probenpuffer (6×)

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 (N,N,N',N'-
 Tetramethylen-diamid)

Trenngel

375 mM Tris-Cl, pH 8,8
 10% bzw. 12% oder 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

Entfärbelösung

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

4.5.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Protein wurden mittels eines „Semi-Dry“ Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond P⁺, Amersham Biotech Pharma) transferiert. Dafür wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert und mit H₂O gewaschen. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten, der Kathode zugewandt nach oben, der Anode zugewandt): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrocellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt

in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der Spannung (1h, 1–2 mA/ cm² Gelfläche) 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
 15%(v/v) Methanol

4.5.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrocellulose-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst für 1 h in 5% Magermilchpulver in TBST inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen und für 1–12 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST mit 3% Magermilchpulver, inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: monoklonaler Gfp-Antikörper (Maus) (1µg/µl, Roche, in einer Verdünnung von 1:5.000); polyklonaler Gfp-Antikörper (Hase) (BioCat; 1:500 verdünnt), monoklonaler GAL4-AD-Antikörper (Maus) (Santa Cruz Biotechnology). Als sekundärer Antikörper der HRP-gekoppelte Anti-Maus-IgG (Ziege) (Promega, in einer Verdünnung von 1:10.000) bzw. der HRP-gekoppelte Anti-HaseIgG (Ziege) (Biorad, in einer Verdünnung von 1:5.000). Für die TAP-Tag-Aufreinigung wurde der Anti-TAP-Antikörper (Hase, polyklonal, Operon Biosystems) sowie der PAP-Antikörper (Hase, Sigma-Aldrich) verwendet. Zur Detektion wurde das ECL

Plus™ Detektionskit (GE Healthcare) verwendet. Lösung 1 wurde dazu 1:40 mit Wasserstoffperoxid (Lösung 2) gemischt, auf der Membran verteilt und diese nach 5 min Inkubation in Plastikfolie eingeschweißt. Darauf wurde ein Röntgenfilm gelegt und je nach Signalstärke 5 sec bis 20 min exponiert. Der Film wurde anschließend entwickelt.

TBST

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

4.5.4 Isolierung von Proteinen aus *U. maydis*

4.5.4.1 Anreicherung des Pra1-Rezeptors in einer Membranfraktion

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Fuchs, 2006. Der *U. maydis*-Stamm FB1pra1:gfp wurde bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5 in CM-Glucose-Medium vorkultiviert, mit Wasser gewaschen und je zweimal 50 ml Kultur mit a2-Pheromon in einer Verdünnung von 1:10000 für ca. 3,5 h stimuliert. Die Kulturen wurden durch Zentrifugation bei 3.000 Upm für 10 min pelletiert, mit Wasser gewaschen, in 10 ml GST-Lysepuffer gewaschen, in 2 ml GST-Lysepuffer aufgenommen und in vorgekühlte Behälter für die Retsch-Kugelmühle gegeben. Der Zellaufschluß erfolgte bei 4°C in der Kugelmühle für 5 min bei einer Frequenz von 30/s. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und dazwischen die Probenbehälter in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die bei 4°C aufgetaute Zellsuspension wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße transferiert und bei 4°C, 3.500 Upm, 10 min zentrifugiert um nicht-aufgeschlossene Zellen und große Fragmente zu pelletieren. Der zähflüssige Überstand (S1) mit dem Proteingestamtextrakt wurde bei 15.000 g für 30 min, 4°C (Heraeus Biofuge stratos) zentrifugiert um größere Membranfragmente und Zellorganellen (Mitochondrien,

Vakuolen) zu pelletieren. Der Überstand (S2) wurde weiter bei 50.000 g für 60–120 min, 4°C, zentrifugiert zur Pelletierung der Plasmamembran; darin enthalten sind auch Membranfragmente der Organellen mit ähnlichem Molekulargewicht. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 400 µl Solubilisierungspuffer mit der Pipette resuspendiert. Zur besseren Resuspendierung des Pellets wurde dieser Ansatz für 2 h über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 50.000 g für 10 min bei 4°C wurde der Überstand zur Detektion im Western-Blot oder in die Ko-Immunopräzipitation eingesetzt. Restlicher Überstand mit der Membrananreicherung wurde bei –20°C gelagert.

GST-Lysepuffer

100 mM Na₂PO₄-Puffer (pH 8)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
0,1 mM PMSF
1× Complete Proteaseinhibitor (Roche)

Solubilisierungspuffer

50% Glycerol
50 mM HEPES pH 7,5
150 mM NaCl
2% DBM (n-dodecyl-β-D-maltoside)

4.5.5 Ko-Immunopräzipitation und *in vitro*-Proteinsynthese

4.5.5.1 Ko-Immunopräzipitation

Im ersten Ansatz (Abb. 10A) wurden 250 µl Pra1:gfp-Membranfraktion (siehe 4.5.4.1), 2–5 µg Gfp-Antikörper (Maus) mit 50 µl G-Protein-Agarose (Roche) und 150 µl GST-Lysepuffer gemischt und für 2–4 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden nur Gfp-Antikörper mit 50 µl G-Protein-Agarose verwendet. Nach der Inkubation wurde viermal mit 1 ml Waschpuffer I gewaschen und in 666 µl Waschpuffer I aufgenommen. Davon wurde je ein 132 µl-Aliquot mit 10 µl der *in vitro*

synthetisierten G α -Untereinheiten gemischt, 358 μ l Bindepuffer zugegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die G-Protein-Agarose-Kügelchen wurden anschließend mit 1 ml Waschpuffer I rotierend bei 4°C für 20 min gewaschen. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde der Überstand verworfen und erneut mit Waschpuffer I gewaschen. Zwei weitere Wasch-Schritte wurden mit Waschpuffer II durchgeführt. Zuletzt wurden die Protein-G-Agarose-Kügelchen in 25 μ l SDS-PAGE Probenpuffer für die Auftrennung der Proteine aufgenommen und über Autoradiographie detektiert.

Im zweiten Ansatz (Abb. 10B) wurden 50 μ l Dynabeads® Protein G, an denen 2 μ g GAD-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) immobilisiert worden war, mit je 10 μ l radioaktiv-markierten G α -Untereinheiten in 30 μ l PBS-Puffer gemischt und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen und je 26 μ l Pra:gfp Proteinfraction zugegeben und bei 4°C über Nacht rotierend inkubiert. Die Dynabeads wurden viermal mit Waschpuffer I-b gewaschen und einmal mit Waschpuffer II und für die Detektion im Western-Blot in 25 μ l SDS-Puffer aufgenommen.

Waschpuffer I

100 mM Na₂PO₄-Puffer (pH 7,5)
300 mM NaCl
0,1%DBM
2 mM EDTA

Waschpuffer II

100 mM Na₂PO₄-Puffer (pH 7,5)
300 mM NaCl (bis 500 mM NaCl)
1 mM EDTA
0,1%DBM
0,05%Deoxycholate

Bindepuffer

50 mM Tris-HCl pH 7.4
150 mM NaCl
1 mM EDTA
0,1%BSA

1 mM PMSF
1× Protease Cocktail mix (Roche)
0,01%Triton X-100

Waschpuffer I-b

50 mM Tris-Cl pH 7,5
150 mM NaCl
1 mM EDTA
0,01%Triton X-100

4.5.5.2 *in vitro*-Proteinsynthese

Die *in vitro*-Proteinsynthese wurde laut Herstellerprotokoll mit dem Synthese-Kit STP3 (Novagen) unter Verwendung von Redivue™ - L - ³⁵S-markiertem Methionin (*in vitro* translation grade; 555 MBq/ml; Amersham) durchgeführt. Die verwendeten Plasmide sind unter 4.1.4.3 beschrieben.

4.5.6 Proteinaufreinigung von Pra1 nach dem TAP-Tag Protokoll

Eine 1,2 l Übernachtkultur von *U. maydis* in CM-Glucose-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde durch Zentrifugation bei 3.500 Upm, 8 min, 10°C (Sorvall) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit Wasser und einmal mit GST- Lysispuffer gewaschen und in 10 ml GST-Lysispuffer aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend wie unter 4.5.4.1 beschrieben in einer Retsch-Kugelmühle aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Gefäße transferiert und bei 3.000 Upm, 10 min, 4°C zentrifugiert um nicht-aufgeschlossene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und die Membranfraktion durch mehrere Zentrifugationsschritte (siehe 4.5.4.1) angereichert. Das Pellet mit der Plasmamembran wurde in maximal 15 ml GST-Lysispuffer, dem Protease-Inhibitoren und Detergenz (1% Triton X-100) zugesetzt wurden, resuspendiert. Zur besseren Resuspension wurde dieser Ansatz bei 4°C für 2 h drehend inkubiert. Nach erneuter Zentrifu-

gation für 60 min, 4°C, 50.000 g (Heraeus Biofuge stratos) wurde der Überstand in einem 15 ml Falcon gegeben und 150 µl IgG-Agarose Beads (Maus-IgG-Agarose, Sigma-Aldrich), die zuvor mit 500 µl GST-Lysis-puffer gewaschen wurden, zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 4°C rotierend inkubiert und anschließend die Beads durch kurzes Anzentrifugieren pelletiert. Es wurde dreimal mit 1 ml IPP-150 Puffer gewaschen, gefolgt von dreimaligem Waschen mit je 1 ml TEV-CP-Puffer. Nach kurzem Anzentrifugieren und Abnehmen des Überstandes wurden die Beads in einem Eppendorf-Gefäß in 150 µl TEV-CP-Puffer aufgenommen, 50 U TEV-Protease (10 U/µl, Invitrogen) zugegeben und der Ansatz bei 4°C auf dem Drehrad mind. 2 h inkubiert. Diese Inkubation sollte laut Herstellerangaben ausreichend sein um 77% der TAP-Tag-gebundenen Proteine von den Beads zu lösen. Nach kurzem Anzentrifugieren, wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die Kügelchen wurden noch einmal mit 150 µl TEV-CP-Puffer gewaschen, kurz anzentrifugiert und dieser Überstand mit dem ersten vereint. Um restliche Beads zu entfernen wurde diese Ansatz nochmals kurz zentrifugiert (1 min, 4.000 Upm, 4°C) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nun wurde das dreifache Volumen des Überstandes an Calmodulin-Binde-Puffer und 1 µl CaCl₂-Lösung (1 M) zugegeben. Nach kurzer Inkubation (1 min) wurden 100 µl Calmodulin-Beads-Suspension (Stratagene) zugefügt, die zuvor mit 500 µl Calmodulin-Bindepuffer (CBP) gewaschen waren und 1 h bei 4°C drehend inkubiert. Dann wurden die Beads dreimal mit je 1ml CBP gewaschen. Für

die Analyse auf dem Western-Blot wurde ein Aliquot direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 150 µl CEB-Puffer (Calmodulin Elution Buffer) und 5minütiger Inkubation von den Beads gelöst. Nach Zentrifugation für 5 min, 4°C bei 13.000 Upm wurde der Überstand abgenommen.

GST-Lysispuffer

100 mM Na₂PO₄-Puffer (pH8)
 150 mM NaCl
 1× Complete Protease Inhibitor (Roche)
 1 mM EDTA
 0,1 mM PMSF

IPP-150 Puffer

10 mM Tris-HCl pH8
 150 mM NaCl
 0,1% Triton X-100
 150 mM DTT frisch zugeben

TEV-CP Puffer

10 mM Tris-HCl pH8
 150 mM NaCl
 0,1% Triton X-100
 0,5 mM EDTA
 1 mM DTT frisch zugeben

CBP-Puffer

10 mM Tris-HCl pH8
 150 mM NaCl
 0,1% Triton X-100
 1 mM Mg-Acetat
 1 mM Imidazol
 2 mM CaCl₂
 10 mM β-Mercaptoethanol frisch dazugeben

Literaturverzeichnis

- AbdAlla, S., Godovac-Zimmermann, J., Braun, A., Roscher, A.A., Muller-Esterl, W., Quitterer, U.** (1996). Structure of the bradykinin B2 receptors' amino terminus. *Biochemistry*. **35**, 7514-9.
- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R., Heitman, J.** (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev.* **11**, 3206-17.
- An, Z., Zhao, Q., McEvoy, J., Yuan, W.M., Markley, J.L., Leong, S.A.** (1997). The second finger of Urbs1 is required for iron-mediated repression of *sid1* in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**, 5882-7.
- Andrews, D.L., Egan, J.D., Mayorga, M.E., Gold, S.E.** (2000). The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**, 781-786.
- Ansari, K., Martin, S., Farkasovsky, M., Ehbrecht, I.M., Kuntzel, H.** (1999). Phospholipase C binds to the receptor-like GPR1 protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **274**, 30052-8.
- Apanovitch, D.M., Iiri, T., Karasawa, T., Bourne, H.R., Dohlman, H.G.** (1998). Second site suppressor mutations of a GTPase-deficient G-protein alpha-subunit. Selective inhibition of Gbeta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem.* **273**, 28597-602.
- Aro, N., Pakula, T., Penttila, M.** (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 719-739.
- Ausubel, M.A., Ausubel, M.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A.** (1987). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Baasiri, R.A., Lu, X., Rowley, P.S., Turner, G.E., Borkovich, K.A.** (1997). Overlapping functions for two G protein alpha subunits in *Neurospora crassa*. *Genetics*. **147**, 137-45.
- Baldwin, J.M.** (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **6**, 180-190.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumours in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F., & 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., & 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., & 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., & Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Barbacid, M.** (1987) *ras* genes. *Annu Rev Biochem.* **56**, 779-827.
- Bardwell, L.** (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**, 339-350.

- Basse, C.W., Lottspeich, F., Steglich, W., Kahmann, R.** (1996). Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eur J Biochem.* **242**, 648-56.
- Battle, M., Lu, A., Green, D. A., Xue, Y., Hirsch, J. P.** (2003). Krh1p and Krh2p act downstream of the Gpa2p G(alpha) subunit to negatively regulate haploid invasive growth. *J. Cell Sci.* **116**, 701-710.
- Bayle, D., Weeks, D., Sachs, G.** (1997). Identification of membrane insertion sequences of the rabbit gastric cholecystokinin-A receptor by in vitro translation. *J Biol Chem.* **272**, 19697-707.
- Benito, B., Garcíadeblas, B., Schreier, P., Rodríguez-Navarro, A.** (2004). Novel P-Type ATPases Mediate High-Affinity Potassium or Sodium Uptake in Fungi. *Eukaryot. Cell*, **3**, 359-368
- Blumer, K.J. & Thorner, J.** (1991). Receptor-G protein signaling in yeast. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 37-57
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., Fagni, L.** (2003). The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* **546**, 65-72
- Bölker, M.** (1998). Sex and Crime: Heterotrimeric G Proteins in Fungal Mating and Pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology* **25**, 143-156.
- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., und Kahmann, R.** (1995). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Botany* **73**, 320-325.
- Bölker, M., Urban, M., Kahmann, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bottin, A., Kämper, J., Kahmann, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 342-352.
- Bowman, D.H.** (1946). Sporidial fusion in *Ustilago maydis*. *J. Agric. Res.* **72**, 233-243.
- Boyce, K.J., Chang, H., D'Souza, C.A., Kronstad, J.W.** (2005) An *Ustilago maydis* septin is required for filamentous growth in culture and for full symptom development on maize. *Eukaryot Cell.* **4**, 2044-56.
- Brachmann, A.** (1995). Suche nach frühen *b*-regulierten Genen in *Ustilago maydis* mit Hilfe der Methode des "Differential Display", Diplomarbeit, LMU München.
- Brachmann, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bE/bW-Heterodimer. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., Feldbrügge, M.** (2004). Reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P., 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., Weinzierl, G., Kämper, J., Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **42**, 1047-1063.
- Brefort, T.** (2004). Identifizierung von Effektoren der Pheromon-MAPK-Kaskade in *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.

- Brefort, T., Müller, P., Kahmann, R.** (2005). The high-mobility-group domain transcription factor Rop1 is a direct regulator of *prf1* in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*. **4**, 379-391.
- Brzostowski, J.A. & Kimmel, A.R.** (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci*. **26**, 291-297.
- Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodriguez-Pena, J.M., Arroyo, J.** (2007). Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol*. **63**, 921-35.
- Cai, K., Itoh, Y., Khorana, H.G.** (2001). Mapping of contact sites in complex formation between transducin and light-activated rhodopsin by covalent crosslinking: use of a photoactivatable reagent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 4877-82.
- Chang, M.H., Chae, K.S., Han, D.M., Jahng, K.Y.** (2004). The GanB Galpha-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. **167**, 1305-15.
- Chaturvedi, K., Bandari, P., Chinen, N., Howells, R.D.** (2001). Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of mu and delta opioid receptors. *J Biol Chem*. **276**, 12345-55
- Chen, L. & Davis, N.G.** (2000). Recycling of the Yeast a-Factor Receptor. *J Cell Biol*. **151**, 731-738.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc. Monogr.* **2**.
- Chung, K.S., Won, M., Lee, S.B., Jang, Y.J., Hoe, K.L., Kim, D.U., Lee, J.W., Kim, K.W., Yoo, H.S.** (2001). Isolation of a novel gene from *Schizosaccharomyces pombe*: *stm1+* encoding a seven-transmembrane loop protein that may couple with the heterotrimeric Galpha 2 protein, *Gpa2*. *J Biol Chem*. **276**, 40190-40201.
- Ciriacy, M.** (1975). Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Mol Gen Genet*. **138**, 157-164.
- Clark, C.D., Palzkill, T., Botstein, D.** (1994). Systematic Mutagenesis of the Yeast Mating Pheromone Receptor Third Intracellular Loop. *J Biol Chem*. **269**, 8831-8841.
- Conklin, B.R. & Bourne, H.R.** (1993). Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell*. **73**, 631-41.
- Davey, J.** (1998). Fusion of a fission yeast. *Yeast*. **14**, 1529-66.
- Day, P.R. & Anagnostakis, S.L.** (1971). Corn smut dikaryon in culture. *Nature New Biol*. **231**, 19-20.
- Dohlman, H.G., Song, J., Ma, D., Courchesne, W.E., Thorner, J.** (1996). Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). *Mol Cell Biol*. **16**, 5194-209.
- Dosil, M., Schandel, K.A., Gupta, E., Jenness, D.D., Konopka, J.B.** (2000). The C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-factor receptor contributes to the formation of preactivation complexes with its cognate G protein. *Mol Cell Biol*. **20**, 5321-9.
- Duran-Avelar, M.J., Ongay-Larios, L., Zentella-Dehesa, A., Coria, R.** (2001). The carboxy-terminal tail of the Ste2 receptor is involved in activation of the G protein in the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-pheromone response pathway. *FEMS Microbiol Lett*. **197**, 65-71.

- Dürrenberger, F., Laidlaw, R.D., Kronstad, J.W.** (2001). The *hgl1* gene is required for dimorphism and teliospore formation in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* **41**, 337-48.
- Dürrenberger, F., Wong, K., 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.
- Eichhorn, H.** (2004). Pathogenitätsrelevante Signalkaskaden in *Ustilago maydis*: Identifikation von Zielgenen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kämper, J., Müller, P., Kahmann, R.** (2006). A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 3332-3345.
- Enders, E.** (1998). Die Rolle der G-Protein α -Untereinheit Gpa3 im Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G., Kahmann, R.** (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-672.
- Fischer, G.W. & Holton, C.S.** (1957). Biology and control of the smut fungi. *Ronald Press Co., New York*.
- Forsberg, H. & Ljungdahl, P.O.** (2001). Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **40**, 91-109.
- Froeliger, E.H., & Leong, S.A.** (1991). The *a* mating-type alleles of *Ustilago maydis* are idiomorphs. *Gene* **100**, 113-122.
- Fuchs, U.** (2006). The role of endocytosis for pathogenic development of the corn smut fungus *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.
- Fuchs, U., Hause, G., Schuchardt, I., Steinberg, G.** (2006). Endocytosis Is Essential for Pathogenic Development in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 1-16.
- Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T., Yamamoto, M.** (1986). Role of a ras homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell.* **44**, 329-336.
- Gancedo, J.M.** (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**, 334-361.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., Perez-Martin, J.** (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Euk. Cell* **2**, 494-500.
- Garrido, E., Voß, U., Müller, P., Castillo-Lluva, S., Kahmann, R., 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.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M., Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Gold, S.E., Brogdon, S.M., Mayorga, M.E., 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.
- Gold, S.E., Duncan, G., Barrett, K., Kronstad, J.** (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes. Dev.* **8**, 2805-2816.

- Guo, M., Aston, C., Burchett, S.A., Dyke, C., Fields, S., Rajarao, S.J., Uetz, P., Wang, Y., Young, K., Dohlman, H.G.** (2003). The yeast G protein alpha subunit Gpa1 transmits a signal through an RNA binding effector protein Scp160. *Mol Cell*. **12**, 517-524.
- Han, K.H., Seo, J.A., Yu, J.H.** (2004). Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Galpha) signalling. *Mol Microbiol*. **53**, 529-40.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. In Rickwood, D. Hames, B.D. (eds.). DNA cloning, a practical approach, *IRL Press*, **1**, 109-135.
- Harashima, T. & Heitman, J.** (2002). The G α protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic G β subunits. *Mol. Cell* **10**, 163–173.
- Harashima, T. & Heitman, J.** (2005). G α Subunit Gpa2 recruits Kelch Repeat Subunits that inhibit Receptor-G Protein Coupling during cAMP induced dimorphic transitions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**, 4557–4571.
- Harris, S.D. & Hamer, J.E.** (1995). sepB: an *Aspergillus nidulans* gene involved in chromosome segregation and the initiation of cytokinesis. *EMBO J*. **14**, 5244-57.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R., Bölker, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.
- Hartmann, H.A., Krüger, J., Lottspeich, F., 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.
- Hein, P., Frank, M., Hoffmann, C., Lohse, M.J., Bunemann, M.** (2005). Dynamics of receptor/G-protein coupling in living cells. *EMBO J*. **24**, 4106-14.
- Hewald, S., Josephs, K., Bölker, M.** (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol*. **71**, 3033-40.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M.A., Kamper, J., Bölker, M.** (2006). Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol*. **72**, 5469-77.
- Hicke, L., Zanolari, B., Riezman, H.** (1998). Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol*. **141**, 349-358.
- Hirota, K., Tanaka, K., Watanabe, Y., Yamamoto, M.** (2001). Functional analysis of the C-terminal cytoplasmic region of the M-factor receptor in fission yeast. *Genes Cells* **6**, 201-214.
- Hirsch, J.P. & Cross, F.R.** (1992). Pheromone response in yeast. *Bioessays*. **14**, 367-73.
- Ho, J. & Bretscher, A.** (2001) Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton through the stress response pathway. *Mol Biol Cell*, **12**, 1541-1555.
- Ho, M.K. & Wong, Y.H.** (2000). The amino terminus of Galpha(z) is required for receptor recognition, whereas its alpha4/beta6 loop is essential for inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol*. **58**, 993-1000.
- Hoffman, C.S.** (2005a). Except in every detail: comparing and contrasting G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. **4**, 495-503.
- Hoffman, C.S.** (2005b). Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans*. **33**, 257-60.

- Hoffman, C.S., & 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). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **2**, 204-230.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R.C. King, (ed.). Plenum Press, 575-595.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* **9**, 789-798.
- Hu, G., Stehen, B.R., Lian, T., Sham, A.P., Tam, N., Tangen, K.L., Kronstad, J.W.** (2007). Transcriptional regulation by protein kinase A in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* **3**, e42.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego, USA: Academic Press.
- Itoh, Y., Cai, K., Khorana, H.G.** (2001). Mapping of contact sites in complex formation between light-activated rhodopsin and transducin by covalent crosslinking: use of a chemically preactivated reagent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 4883-7.
- Ivey, F.D., Kays, A.M., Borkovich, K.A.** (2002). Shared and independent roles for a Galpha(i) protein and adenylyl cyclase in regulating development and stress responses in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* **1**, 634-42.
- Ivey, F.D., Yang, Q., Borkovich, K.A.** (1999) Positive regulation of adenylyl cyclase activity by a galphai homolog in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* **26**, 48-61.
- Jahng, K.Y., Ferguson, J., Reed, S.I.** (1988). Mutations in a gene encoding the alpha subunit of a *Saccharomyces cerevisiae* G protein indicate a role in mating pheromone signaling. *Mol Cell Biol.* **8**, 2484-93.
- Jeong, J., Kim, S.K., Ahn, J., Park, K., Jeong, E.J., Kim, M., Chung, B.H.** (2006). Monitoring of conformational change in maltose binding protein using split green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **339**, 647-51.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R., Feldbrügge, M.** (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 5817-5826.
- Kahmann, R. & Bölker, M.** (1996). Self/nonself recognition in fungi: old mysteries and simple solutions. *Cell* **85**,145-148.
- Kahmann, R. & Kämper, J.** (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* **164**, 31-42.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Kämper, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kämper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., Kahmann, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.

- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Muller, O., Perlin, M.H., Wosten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B.W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kataoka, T., Broek, D., Wigler, M. (1985). DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell*. **43**, 493-505.
- Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J., Wigler, M. (1984). Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell*. **37**, 437-45.
- Kays, A.M. & Borkovich, K.A. (2004). Severe impairment of growth and differentiation in a *Neurospora crassa* mutant lacking all heterotrimeric G alpha proteins. *Genetics*. **166**, 1229-40.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem*. **60**, 349-400.
- Kemp, E.H., Waterman, E.A., Hawes, B.E., O'Neill, K., Gottumukkala, R.V., Gawkrödger, D.J., Weetman, A.P., Watson, P.F. (2002). The melanin-concentrating hormone receptor 1, a novel target of autoantibody responses in vitiligo. *J Clin Invest*. **109**, 923-30.
- Keon, J.P., White, G.A., Hargreaves, J.A. (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet*. **19**, 475-81.
- Kojic, M. & Holloman, W.K. (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can. J. Microbiol*. **46**, 333-338.
- Konopka, J.B., Jenness, D.D., Hartwell, L.H. (1988). The C-terminus of the *S. cerevisiae* alpha-pheromone receptor mediates an adaptive response to pheromone. *Cell*. **54**, 609-20.
- Kronstad, J.W., De Maria, A.D., Funnell, D., Laidlaw, R.D., Lee, N., de Sa, M.M., Ramesh M. (1998). Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch Microbiol*. **170**, 395-404.
- Kronstad, J.W., & Leong, S.A. (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev*. **4**, 1384-1395.
- Krüger, J. (1999). Der cAMP-Weg und sein Einfluß auf Pheromonsignaltransduktion und Pathogenität in *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A., Kahmann, R. (1998). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**, 193-198.
- Kurjan, J., Hirsch, J.P., Dietzel, C. (1991). Mutations in the guanine nucleotide-binding domains of a yeast G alpha protein confer a constitutive or uninducible state to the pheromone response pathway. *Genes Dev*. **5**, 475-483.

- Ladds, G., Davis, K., Das, A., Davey J.** (2005). A constitutively active GPCR retains its G-protein specificity and the ability to form dimers. *Mol. Microbiol.* **55**, 482-497.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larraya, L.M., Boyce, K.J., So, A., Steen, B.R., Jones, S., Marra, M., Kronstad, J.W.** (2005). Serial analysis of gene expression reveals conserved links between protein kinase A, ribosome biogenesis, and phosphate metabolism in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **4**, 2029-2043.
- Lee, N., D'Souza, C.A., Kronstad, J.W.** (2003). Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* **41**, 399-427.
- Lee, N. & Kronstad, J. W.** (2002). *ras2* controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **1**, 954-966.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J.D., Whiteway, M., Thomas, D.Y. Leberer, E.** (1998). Interaction of a G-protein β subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* **391**, 191-195.
- Lefkowitz, R.J.** (2000). The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol.* **2**, E133-136.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., & Heitman, J.** (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-785.
- Liu, H., Suresh, A., Willard, F.S., Siderovski, D.P., Lu, S., Naqvi, N.** (2007). Rgs1 regulates multiple Ga subunits in Magnaporthe pathogenesis, asexual growth and thigmotropism *EMBO J.* **26**, 690-700.
- Liu, S. & Dean, R.A.** (1997) G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of Magnaporthe grisea. *Mol Plant Microbe Interact.* **10**, 1075-86.
- Lorenz, M.C. & Heitman, J.** (1997). Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein alpha homolog. *EMBO J.* **16**, 7008-18.
- Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M., Kahmann, R.** (2001). A homolog of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **40**, 719-730.
- Mahlert, M.** (2006). Charakterisierung kleiner G-Proteine der Ras- und Rho/Rac-Familie in *Ustilago maydis*: Zentrale Schalter in komplexen Netzwerken und ihr Einfluss auf die Organisation der Zellmorphologie. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.
- Martinez-Espinoza, A.D., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol.* **35**(1), 1-20.
- Masuda, T., Kariya, K., Shinkai, M., Okada, T., Kataoka, T.** (1995). Protein kinase Byr2 is a target of Ras1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* **270**, 1979-1982.
- Mayorga, M.E., & Gold, S.E.** (1998). Characterization and molecular genetic complementation of mutants affecting dimorphism in the fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **24**, 364-376.
- Mayorga, M.E., & Gold, S.E.** (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol. Microbiol.* **34**, 485-497.

- Mayorga, M.E. & Gold, S.E.** (2001). The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol Microbiol.* **41**, 1365-79.
- Milewski, S., Gabriel, I., Olchowy, J.** (2006). Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast. *Yeast.* **23**, 1-14.
- Milkowski, C., Krampe, S., Weirich, J., Hasse, V., Boles, E., Breunig, K.D.** (2001). Feedback regulation of glucose transporter gene transcription in *Kluyveromyces lactis* by glucose uptake. *J Bacteriol.* **183**, 5223-9.
- Miller, R.T., Masters, S.B., Sullivan, K.A., Beiderman, B., Bourne, H.R.** (1988). A mutation that prevents GTP-dependent activation of the alpha chain of Gs. *Nature.* **334**, 712-715.
- Mochizuki, N. & Yamamoto, M.** (1992). Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet.* **233**, 17-24.
- Müller, P.** (2003). Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*: Die Kpp4/Fuz7/Kpp2 MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung. Dissertation, Fakultät für Biologie, Philipps-Universität, Marburg.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M., Kahmann, R.** (1999). The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-1017.
- Müller, P., Katzenberger, J. D., Loubradou, G., Kahmann, R.** (2003b). Guanyl nucleotide exchange factor Ssl2 and Ras2 regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 609-617.
- Müller, P., Leibbrandt, A., Teunissen, H., Cubasch, S., Aichinger, C., Kahmann, R.** (2004). The Gbeta-subunit-encoding gene *bpp1* controls cyclic-AMP signaling in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **3**, 806-814.
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M., Kahmann, R.** (2003a). Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell* **2**, 1187-1199.
- Nadin-Davis, S.A., Nasim, A., Beach, D.** (1986). Involvement of ras in sexual differentiation but not in growth control in fission yeast. *EMBO J.* **11**, 2963-2971.
- Nakayama, N., Miyajima, A., Arai, K.** (1985). Nucleotide sequences of STE2 and STE3, cell type-specific sterile genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **4**, 2643-2648.
- Neubig, R.R.** (1998). Specificity of Receptor-G Protein Coupling: Protein Structure and Cellular Determinants. *Sem. Neurosc.* **9**, 189-197.
- Neubig, R.R., Gantzog, R.D., Thomsen W.J.** (1988). Mechanism of Agonist and Antagonist Binding to α_2 Adrenergic Receptors: Evidence for a Precoupled Receptor-Guanine Nucleotide Protein Complex. *Biochemistry* **27**, 2374-2384.
- Noel, J.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B.** (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* **366**, 654-663.
- Nomoto, S., Nakayama, N., Arai, K., Matsumoto, K.** (1990). Regulation of the yeast pheromone response pathway by G protein subunits. *EMBO J.* **9**, 691-696.
- Obara, T., Nakafuku, M., Yamamoto, M. Kaziro, Y.** (1991). Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein α subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: involvement in mating and sporulation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5877-5881.

- Olesnicky, N.S., Brown, A.J., Dowell, S.J., Casselton, L.A. (1999). A constitutively active G-protein-coupled receptor causes mating self-compatibility in the mushroom *Coprinus*. *EMBO J.* **18**, 2756-63.
- Ongay-Larios, L., Savinon-Tejeda, A.L., Williamson, M.J. Jr., Duran-Avelar, M., Coria, R. (2000). The Leu-132 of the Ste4(Gbeta) subunit is essential for proper coupling of the G protein with the Ste2 alpha factor receptor during the mating pheromone response in yeast. *FEBS Lett.* **467**, 22-26.
- Ott, C.M. & Lingappa, V.R. (2003). Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict. *J Cell Sci.* **115**, 2003-9.
- Özcan, S. & Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**, 554-569.
- Pandey, S. & Assmann, S.M. (2004). The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell.* **16**, 1616-32.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 639-50.
- Puhalla, J.E. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-474.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M., Kahmann, R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J* **16**, 1934-1942.
- Reneke, J.E., Blumer, K.J., Courchesne, W.E., Thorner, J. (1988). The carboxy-terminal segment of the yeast alpha-factor receptor is a regulatory domain. *Cell.* **55**, 221-34.
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A., Fink, G.R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 5984-8.
- Rohrer, J., Benedetti, H., Zanolari, B., Riezman, H. (1993). Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled alpha-pheromone receptor in yeast. *Mol Biol Cell* **4**, 511-521.
- Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* **2**, 183-201.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R., 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., & DeVay, J.E. (1954). Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**, 356-362.
- Ruijter, G.J., Vanhanen, S.A., Gielkens, M.M., van de Vondervoort, P.J., Visser, J. (1997). Isolation of *Aspergillus niger* creA mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzymes. *Microbiology.* **143**, 2991-8.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V., Kämper, J.** (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-2401.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., Trumpower, B.L.** (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**, 3091-3092.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., 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.
- Schulze-Gronover, C.S., Kasulke, D., Tudzynski, P., Tudzynski, B.** (2001). The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact.* **14**, 1293-302.
- Slessareva, J.E., Routt, S.M., Temple, B., Bankaitis, V.A., Dohlman, H.G.** (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell.* **126**, 191-203.
- Sleumer, H.O.** (1932). Über Sexualität und Zytologie von *Ustilago zae* (Beckm.) Unger. *Z. Botan.* **25**, 209-263.
- Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E., Perlin, M.H.** (2003). Isolation and characterization from pathogenic fungi of genes encoding ammonium permeases and their roles in dimorphism. *Mol Microbiol.* **50**, 259-275
- Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Hong, W., Yu, Z., Gold, S.E., Perlin, M.H.** (2004). An ste20 homologue in *Ustilago maydis* plays a role in mating and pathogenicity. *Eukaryot Cell.* **3**, 180-189.
- Snetselaar, K.M.** (1993). Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Experimental Mycology* **17**, 345-355.
- Snetselaar, K.M., & Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M., & Mims, C.W.** (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- Snetselaar, K.M., & Mims, C.W.** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**, 347-355.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 299-312.
- Song, J., Hirschman, J., Gunn, K., Dohlman, H.G.** (1996). Regulation of Membrane and Subunit Interactions by N-Myristoylation of a G Protein α Subunit in Yeast. *J Biol Chem.* **271**, 20273-83.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spellig, T.** (1996). Signale im Pathogenitätsprozeß von *Ustilago maydis*. Dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W., Kahmann R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **13**, 1620-1627.

- Spoeckner, S., Wray, V., Nimtz, M., Lang, S.** (1999). Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Appl Microbiol Biotechnol.* **51**, 33-39
- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Söldner, R., Kahmann, R., Steinberg, G.** (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO J* **20**, 5091-5100.
- Tangen, K.L., Jung, W.H., Sham, A.P., Lian, T., Kronstad, J.W.** (2007). The iron- and cAMP-regulated gene SIT1 influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* **153**, 29-41.
- Tatchell, K., Chaleff, D.T., DeFeo-Jones, D. Scolnick, E.M.** (1984) Requirement of either of a pair of ras-related genes of *Saccharomyces cerevisiae* for spore viability. *Nature*, **309**, 523-527.
- Tatchell, K., Robinson, L.C. Breitenbach, M.** (1985) RAS2 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for gluconeogenic growth and proper response to nutrient limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 3785-3789.
- Teertstra, W.R., Deelstra, H.J., Vranes, M., Bohlmann, R., Kahmann, R., Kamper, J., Wösten, H.A.** (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology.* **152**, 3607-12.
- Thevelein, J.M., Gelade, R., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Popova, Y., Rolland, F., Stolz, F., Van de Velde, S., Van Dijck, P., Vandormael, P., Van Nuland, A., Van Roey, K., Van Zeebroeck, G., Yan, B.** (2005). Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem Soc Trans.* **33**, 253-6.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. Wigler, M.** (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, **40**, 27-36.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- Urban, M., Kahmann, R., Bölker, M.** (1996a). The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet* **250**, 414-420.
- Urban, M., Kahmann, R., Bölker, M.** (1996b). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 31-37.
- Vallier, L.G., Segall, J.E., Snyder, M.** (2002). The alpha-factor receptor C-terminus is important for mating projection formation and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil Cytoskeleton.* **53**, 251-266.
- vanKuyk, P.A., de Groot, M.J., Ruijter, G.J., de Vries, R.P., Visser, J.** (2001). The *Aspergillus niger* D-xylulose kinase gene is co-expressed with genes encoding arabinan degrading enzymes, and is essential for growth on D-xylose and L-arabinose. *Eur J Biochem.* **268**, 5414-23.
- Volschenk, H., van Vuuren, H.J., Viljoen-Bloom, M.** (2003). Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr Genet.* **43**, 379-391.
- Vranes, M.** (2002). Untersuchung zur Lokalisierung und Interaktion der Transmembranproteine Dik6 und Dkh6 in *Ustilago maydis*. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.

- Wang, J., Holden, D.W., Leon, S.A.** (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 865-869.
- Wang, P., Perfect, J.R., Heitman, J.** (2000). The G-Protein β Subunit GPB1 Is Required for Mating and Haploid Fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol.* **20**, 352–362.
- Waugh, M.S., Nichols, C.B., DeCesare, C.M., Cox, G.M., Heitman, J., Alspaugh, J.A.** (2002) Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, **148**, 191-201.
- Welton, R.M. & Hoffman, C.S.** (2000). Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor. *Genetics* **156**, 513-521.
- Wennerberg, K., Rossman K.L. Der C.J.** (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **118**, 843-846.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D.Y., Bell, L., Saari, G.C., Grant, F.J., O'Hara, P., MacKay, V.L.** (1989). The *STE4* and *STE18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* **56**, 467–477.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L.** (1999). Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module from Yeast to Human. *Physiological Reviews* **79**, 143-179.
- Wilson, P.T. & Bourne, H.R.** (1995). Fatty acylation of α_z . *J Biol Chem.* **270**, 9667-9675.
- Wösten, H.A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bölker, M., Kahmann, R.** (1996). A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **15**, 4274-81.
- Wu, Y.L., Hooks, S.B., Harden, T.K., Dohlman, H.G.** (2004). Dominant-negative inhibition of pheromone receptor signaling by a single point mutation in the G protein alpha subunit. *J Biol Chem.* **279**, 35287-97.
- Xu, H.P., White, M., Marcus, S., Wigler, M.** (1994). Concerted action of RAS and G proteins in the sexual response pathways of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* **14**, 50-58.
- Xue, C., Bahn, Y.S., Cox, G.M., Heitman, J.** (2006). G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell.* **17**, 667-679.
- Xue, Y., Batlle, M., Hirsch, J.P.** (1998). GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J.* **17**, 1996-2007.
- Yamagishi, K., Kimura, T., Suzuki, M., Shinmoto, H.** (2002). Suppression of fruit-body formation by constitutively active G-protein alpha-subunits ScGP-A and ScGP-C in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Microbiology.* **148**, 2797-809.
- Yang, Q. & Borkovich, K.A.** (1999). Mutational activation of a Galpha1 causes uncontrolled proliferation of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in *Neurospora crassa*. *Genetics.* **151**, 107-117.
- Yu, J.H., Wieser, J., Adams, T.H.** (1996). The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* **15**, 5184-90.

Zarnack, K. (2006). Die Auswirkung der posttranslationalen Aktivierung des Transkriptionsfaktors Prflauf die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.

Zhu, X. & Williamson, P.R. (2004). Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* **5**, 1-10.

6 Anhang

Tabelle 15. Gpa3/cAMP-regulierte Gene in *U. maydis*.

Probenstet	MUMDB ¹	Funktion/MUMDB Annotation	Expressionsänderung x-fach ²				
			$\Delta gpa3$	$\Delta uac1$		$P_{crg1:adr1}$	
				80 min	180 min	75 min	180 min
Gruppe I³							
W120um002G_at	um03924	Rep1 repellent protein 1 precursor	75.0	16.9	29.1	-3.6	-2.0
W60um134G_at	um05104	putative protein	38.8	20.3	29.7	-41.6	12.8
W130um021G_at	um10636	Mac2 - predicted protein	5.4	3.9	2.7	-3.1	-1.6
C120um021G_at	um03117	Emt1 - Glycosyltransferase	5.4	4.6	2.9	-4.5	-1.0
W130um013G_at	um03523	probable aldehyde dehydrogenase	5.2	2.2		-4.0	1.1
C30um217G_at	um04503	related to Alpha-N-acetyl-galactosaminidase precursor	4.5			-7.4	-1.1
C110um127G_at	um04884	related to cellulase	4.2			-2.5	-3.1
W170um056G_at	um01858	conserved hypothetical protein	4.0			-5.3	3.8
C85um097G_at	um11514	probable HXT15	3.1			-3.9	1.5
W45um057G_at	um06085	conserved hypothetical protein	3.0			-2.9	1.4
C200um003G_at	um10454	related to 4-coumarate-CoA ligase	3.0	6.1	4.3	-11.0	5.3
C45um186G_at	um04742	related to stomatin	2.9		3.9	-2.1	-1.1
C110um021G_at	um03115	Mmf1 - related to Sge1 drug resistance protein	2.6	21.0	13.1	-6.2	1.0
C115um021G_at	um03116	Mac1 - predicted protein	2.5	10.2	8.0	-9.4	1.3
C117um228G_at	um01902	conserved hypothetical protein	2.3	3.4	2.9	-2.4	1.9
C15um268G_at	um04482	hypothetical protein	2.1	7.3	5.0	-2.8	3.8
C40um184G_at	um05514	putative protein	2.1	4.9	3.3	-3.4	4.9
W40um030G_at	um10528	related to STE6 ABC transporter	-2.0			5.3	17.6
W12um235G_at	um10186	putative protein	-2.1	-2.1		5.3	-3.0
W35um022G_at	um00118	probable UDP-glucose 6-dehydrogenase	-2.1		-2.2	3.5	-2.4
W45um213G_at	um03658	conserved hypothetical protein	-2.1	-2.3	-2.8	4.1	-2.1
C115um163G_at	um00672	probable urate oxidase (uricase)	-2.2			2.9	-2.4
UG24-1d14-47c8_RC_at	um00813	conserved hypothetical protein	-2.2			3.3	-2.0
W55um007G_at	um05348	related to RAM1 protein farnesyl-transferase, beta subunit	-2.3			4.0	3.5
W45um256G_at	um05787	hypothetical protein	-2.3			6.1	-2.8
W20um235G_at	um05152	conserved hypothetical protein	-2.4	-2.1	-2.6	6.6	-4.5
W20um114G_at	um05633	conserved hypothetical protein	-2.6	-2.7	-2.0	4.3	-3.2
C160um132G_at	um10189	Sid2- Ferrichrome siderophore peptide synthetase	-2.6	-3.1	-2.7		
W25um008G_at	um04362	related to Cytochrome P450 8B1	-2.7			2.0	-2.1
C75um055G_at	um03982	hypothetical protein	-2.8			2.7	-2.2
C20um110G_at	um00578	b mating type locus, bW1 allele	-2.9			4.7	2.3

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/MUMDB Annotation	Expressionsänderung x-fach ²				
			$\Delta gpa3$	$\Delta uac1$		$P_{crg1}:adr1$	
				80 min	180 min	75 min	180 min
C15um235G_at	um05153	related to MNT4putative alpha-1,3-mannosyltransferase	-3.0	-2.8	-3.3	4.2	-3.3
C15um066G_at	um04197	related to purine-cytosine permease	-3.2		-5.1	2.5	-1.3
W20um276G_at	um05997	hypothetical protein	-3.2			3.5	-1.2
W50um041G_at	um05386	hypothetical protein	-3.4	-3.1	-4.1	5.1	1.2
W21um256G_at	um05782	capsule-associated protein-like protein	-3.4	-2.5	-3.5	5.9	-2.1
W170um132G_at	um10188	Sid1 - L-Ornithine N5-oxygenase	-3.5	-3.1		9.8	-3.1
W10um232G_at	um04538	probable DAL5 Allantoate and ureidosuccinate permease	-4.0		-5.8	3.6	-1.4
W35um256G_at	um05785	acyl transferase-like protein	-4.0	-2.8	-3.6	8.8	-3.0
C120um049G_at	um00105	Fer1Iron transport multicopper oxidase	-4.2	-3.2		22.5	-2.5
W115um178G_at	um02002	hypothetical protein	-4.6		-2.1	3.7	-2.2
C158um132G_at	um10189	Sid2Ferrichrome siderophore peptide synthetase	-4.6	-2.6	-2.3	10.4	-3.3
C30um256G_at	um11585	related to capsular associated protein	-4.7	-2.9	-4.2	6.7	-3.3
C140um075G_at	um06071	related to Para-nitrobenzyl esterase	-4.8			14.4	1.7
W60um280G_at	um00375	conserved hypothetical protein	-4.9	-2.6	-2.5	5.2	-3.7
W40um256G_at	um05786	related to UDP N-acetylglucosamine transporter	-5.0	-3.3	-4.9	7.0	-2.6
W60um167G_at	um04248	putative protein	-6.2			12.1	-1.2
C25um256G_at	um05783	related to UDP-galactose transporter	-7.0	-3.0	-4.4	10.0	-3.6
W125um049G_at	um10023	Fer2 High-affinity iron permease	-7.3	-5.5	-2.9	54.0	-3.2
W15um280G_at	um00384	hypothetical protein	-33.4			32.3	-1.7
Gruppe II⁴							
C40um084G_at	um06255	hypothetical protein	25.6			-1.0	-4.8
C97um209G_at	um10002	related to NADH-dependent flavin oxidoreductase	5.4		3.3	2.0	-3.0
W50um040G_at	um00738	hypothetical protein	4.8		2.5	2.9	-3.9
C65um135G_at	um01655	related to lipase family	4.0		2.6	1.5	-3.2
W70um213G_at	um03651	hypothetical protein	3.0			4.5	-4.7
W82um185G_at	um05483	hypothetical protein	2.6			3.5	-2.1
C52um065G_at	um04145	putative protein	2.5		2.3	-1.6	-2.5
W95um036G_at	um02758	related to Chitinase A precursor	2.4			2.4	-2.4
W130um209G_at	um00027	putative protein	2.3			1.0	-4.7
W35um144G_at	um11063	conserved hypothetical protein (fragment)	2.2			3.5	-2.9
W105um119G_at	um01725	hypothetical protein	2.1			2.9	-3.3
W140um132G_at	um05170	probable formate dehydrogenase	-2.7			-2.4	2.0
W54um256G_at	um05789	conserved hypothetical protein	-3.9			-1.3	2.1
W65um063G_at	um05366	conserved hypothetical protein	-7.8		-14.3	-1.2	2.8

Probenset	MUMDB ¹	Funktion/MUMDB Annotation	Expressionsänderung x-fach ²			
			$\Delta gpa3$		$P_{crg1:adr1}$	
			80 min	180 min	75 min	180 min
Gruppe III⁵						
W16um206G_at	um00826	hypothetical protein	8.4		3.4	-1.5
C15um206G_at	um06497	putative protein	5.3		3.9	-1.7
W7um082G_s_at	um04617	hypothetical protein	2.7		-1.9	2.6
W75um036G_at	um02763	conserved hypothetical protein	2.2		-1.9	2.6
W25um089G_at	um10815	conserved hypothetical protein	-2.2		-2.5	1.3
W115um074G_at	um01812	conserved hypothetical protein	-2.4		1.7	-2.5
C85um257G_at	um05764	related to Malic acid transport protein	28.5	2.7		
C110um002G_at	um03923	putative protein	10.5	16.6	50.8	
C155um002G_at	um03932	hypothetical protein	6.7		4.1	
C65um192G_at	um00196	probable FUN34 – transmembrane protein involved in ammonia production	5.1		2.9	
C60um135G_at	um01656	probable sugar transporter	4.1		6.2	
C45um177G_at	um11922	related to Chitin deacetylase precursor	3.6		2.1	
W5um267G_at	um06125	putative protein	2.7	2.3		
W45um171G_at	um00056	probable neutral amino acid permease	2.5	2.8	2.3	
C59um169G_at	um11700	conserved hypothetical protein	2.2		3.6	
C40um092G_at	um03795	hypothetical protein	2.0	2.7	3.1	
C35um276G_at	um06002	hypothetical protein	-2.2	-2.9	-2.6	
C26um005G_at	um05848	related to galactoside O-acetyltransferase	-2.4		-3.5	
C121um068G_at	um04910	conserved hypothetical protein	-2.8		-3.3	
C65um152G_at	um05270	conserved hypothetical protein	-3.2		-2.8	
C30um003G_at	um01976	hypothetical protein	-3.8		-2.8	
W25um222G_at	um01439	Fer9 - probable FRE3 Ferric reductase	-5.7		-7.1	
W25um114G_at	um10717	conserved hypothetical protein	-10.7	-3.8	-3.9	
W27um222G_at	um01439	Fer9 - probable FRE3 Ferric reductase	-26.0		-10.3	

¹ <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>

² Die Expressionänderung bezieht sich auf den Vergleich der Stämme FB1 $\Delta gpa3$ (diese Arbeit), FB1 $\Delta uac1$ (M. Vranes, persönl. Mittlg.), FB1 $P_{crg1:adr1}$ (Eichhorn et al., 2006) mit dem Wildtypstamm des jeweiligen Experiments; für genauere Informationen siehe Ergebnisteil.

³ In Gruppe I sind diejenigen Gene zusammengefasst, die *gpa3* bzw. *uac1*-abhängig reguliert sind und 75 min nach *adr1*-Expression eine inverse differentielle Regulation aufweisen.

⁴ In Gruppe II sind diejenigen Gene zusammengefasst, die *gpa3* bzw. *uac1*-abhängig reguliert sind und 180 min nach *adr1*-Expression eine inverse differentielle Regulation aufweisen.

⁵ In Gruppe III sind diejenigen Gene zusammengefasst, die *gpa3* bzw. *uac1*-abhängig reguliert sind und eine knappe oder keine differentielle Regulation nach *adr1*-Expression aufweisen.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Kahmann bedanken für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Gruppe durchführen zu können, ihre Unterstützung sowie die schriftliche Korrektur dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein großer Dank den Mitgliedern des „Thesis Advisory Committee“ Frau Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Michael Bölker für die konstruktiven Diskussionen und Anregungen, die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. An dieser Stelle nochmal ein herzliches Dankeschön an Prof. Michael Bölker für das stete Interesse an diesem Projekt und anregende hilfreiche Diskussionen. Bei Frau Renkawitz-Pohl möchte ich mich zusätzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Den Mitgliedern der Promotionskommission Frau Renate Renkawitz-Pohl, Herrn Prof. Michael Bölker und Herrn Prof. Alfred Batschauer danke ich für die freundliche Übernahme der Gutachten und ihre Mühen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Juliane Dörr für die gute Zeit in der IMPRS-Research School und die persönliche Unterstützung bedanken.

Herzlicher Dank geht an die Mitglieder des Kahmann-Labors. Im Besonderen danke ich Lazaro Molina, Artemio Mendoza-Mendoza und Robert Chaikowsky, die durch ihre fröhliche Art halfen den Laboralltag zu meistern sowie an Karin Münch, die bei allen labortechnischen Fragen stets eine Antwort wusste.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren wissenschaftlich unterstützt haben und so diese Arbeit ermöglichten. Dazu bedanke ich mich bei Philip Müller, Hedwich Teunissen, Miroslav Vranes, Kathi Zarnack und Heiko Eichhorn für die Bereitstellung von Materialien und Gespräche. Den Gruppenleitern Christoph Basse, Michael Feldbrügge und Jan Schirawski danke ich für anregende Diskussionen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für ihre große Unterstützung während meiner ganzen Ausbildung und euer Verständnis in manchmal nicht einfachen Zeiten.

Lebenslauf

Doris Greilinger

geboren am 20. Februar 1976
in München

Schulausbildung

1982 – 1995 Grundschule und Gymnasium in München
1995 Abschluss Abitur

Studium

1997 – 2002 Studium der Biologie an der Universität Konstanz
Schwerpunkte: Ökotoxikologie und Limnologie
biochemisch-analytische Diplomarbeit am Lehrstuhl
von Prof. Dr. Rothhaupt zum Thema
«Isolierung und Charakterisierung bioaktiver Fischerelline
aus benthischen Cyanobakterien der Gattung *Fischerella*»
Dez. 2002 Abschluß Diplom mit der Note „sehr gut“

2004 – 2007 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie, Abteilung Organismische Interaktionen,
unter der Betreuung von Prof. Dr. R. Kahmann

Auslandsaufenthalt

Sept. 2000 – Juni 2001 Auslandsstudium an der Oregon State University, Oregon, USA
Studienschwerpunkte: Aquatische Toxikologie und Ozeanographie
Projektarbeit: Eisengehalte von pazifischen Makroalgen