

**Isolierung und Charakterisierung des
sporenspezifisch exprimierten
Gens *ssp1* in *Ustilago maydis***

Dissertation

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sieglinde Maria Franziska Elisabeth Huber
aus Altötting

Marburg/Lahn 2001

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: _____

Erstgutachter: Herr PD Dr. Jörg Kämper

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

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

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Isolierung und Charakterisierung des sporenspezifisch exprimierten Gens *ssp1* in *Ustilago maydis*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der on 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.

(Ort, Datum)

Sieglinde Huber

Die Abbildung auf der Umschlagseite stellt reife Teliosporen einer Infektion mit *U. maydis* Stämmen dar, die das Gen für grün fluoreszierendes Protein *eGFP* unter der Kontrolle des endogenen *spl*-Promotors exprimieren.

Gewidmet meinen Eltern und Annette

Wenn die Natur die Bildung überwiegt, so ist man nur ein Bauer.

Wenn die Bildung die Natur unterdrückt, dann ist man nur eine Schreiberseele.

Erst wenn Bildung und Natur harmonisch ausgeglichen sind, ist man ein Edler.

Konfuzius (551 - 479 v. Chr.)

Zusammenfassung

Ustilago maydis, der Erreger des Maisbeulenbrandes, ist ein fakultativ biotropher Pilz. Die saprophytisch wachsenden, haploiden Sporidien fusionieren zu einem infektiösen dikaryotischen Filament, dessen Eintritt in die Wirtspflanze *Zea mays* die biotrophe Lebensphase einleitet. Nach dem Durchschreiten verschiedener morphologischer Stadien *in planta* endet die sexuelle Entwicklung des Pilzes mit der Ausbildung diploider Dauerformen, den Teliosporen, in reifen Pflanzengallen. Das Ziel dieser Arbeit lag in der Isolierung eines spezifisch in Teliosporen exprimierten Gens sowie dessen Charakterisierung in Bezug auf Funktion und Regulation.

Über einen revers-genetischen Ansatz wurde durch den Vergleich des Protein-expressionsmusters haploider Sporidien und diploider Teliosporen das in Sporen differentiell exprimierte Protein Ssp1 (spore specific protein 1) identifiziert sowie das entsprechende Gen *ssp1* isoliert. Die Ssp1-Expression wird spät während der biotrophen Lebensphase spezifisch zum Zeitpunkt der Sporenreifung induziert. Ssp1 zeigt Homologie zu eukaryotischen Fettsäuredioxygenasen. Die mögliche Rolle von Ssp1 bei der Modifizierung von Fettsäuren wird durch die Lokalisierung eines Ssp1-eGFP Fusionsproteins mit lipidhaltigen Organellen unterstützt.

Ssp1 unterliegt einer komplexen, entwicklungsabhängigen Regulation. Die Charakterisierung des *ssp1*-Promotors führte zur Identifizierung von zwei Sequenzbereichen, die in die stadienspezifische *ssp1*-Expression involviert sind. Des Weiteren konnte ein negativ-regulatorischer Bereich im *ssp1*-Promotor definiert werden, der während der saprophytischen Lebensphase des Pilzes für die Repression des Gens mitverantwortlich ist. Die Histondeacetylase Hda1 konnte als Repressor der *ssp1*-Transkription in haploiden Sporidien identifiziert werden. Hda1 scheint jedoch nicht für die Repression von *ssp1* während der pathogenen Entwicklung verantwortlich zu sein. Die konstitutive Aktivierung des cAMP-Signalwegs führte zu einer Induktion der *ssp1*-Expression in haploiden Sporidien, die unabhängig von der Repression durch Hda1 zu agieren scheint. Möglicherweise resultiert ein konstitutiv aktiver cAMP-Signalweg in haploiden Sporidien in der Expression positiver regulatorischer Komponenten der *ssp1*-Transkription.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
AM	"ammonium minimal medium"	ORF	"open reading frame"
Amp	Ampicillin	PAA	Polyacrylamid
Ara	Arabinose	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaar(e)	PC	Phenol/Chloroform
C-terminal	carboxyterminal	PCR	"polymerase chain reaction"
Cbx	Carboxin	PD	"potato dextrose"
CM	"complete medium"	PEG	Polyethylenglycol
cpm	"counts per minute"	Phleo	Phleomycin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethansulphonat)
DIC	"differential interference contrast"	PKA	"protein kinase A"
DMF	Dimethylformamid	PKC	"protein kinase C"
DMSO	Dimethylsulfoxid	PRE	"pheromone response element"
Dpi	Tage nach der Infektion	r.p.m.	Umdrehungen pro Minute
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
EGFP	"enhanced green fluorescent protein"	SGFP	"synthetic green fluorescent protein"
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	Tab.	Tabelle
GFP	"green fluorescent protein"	TAE	Tris-Acetat + Na ₂ -EDTA
Glc	Glucose	TBE	Tris-Borat + Na ₂ -EDTA
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	TE	Tris-Cl + Na ₂ -EDTA
HMG	"high mobility group"	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
Hyg	Hygromycin	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
kb	Kilobasenpaar	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
MAPK	"mitogen activated protein kinase"	UARS	" <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence"
MAPKK	MAPK-Kinase	Ü/N	über Nacht
MAPKKK	MAPKK-Kinase	UV	ultraviolettes Licht
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat	wt	Wildtyp
N-terminal	aminoterminal		
Nat	Nourseothricin		
NLS	"nuclear localisation sequence"		
NM	"nitrate minimal medium"		

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 <i>USTILAGO MAYDIS</i>	1
1.2 DER LEBENSZYKLUS VON <i>USTILAGO MAYDIS</i>	3
1.3 DIE KREUZUNGSTYPLOCI VON <i>USTILAGO MAYDIS</i>	7
1.3.1 Der <i>b</i> -Locus	7
1.3.2 Der <i>a</i> -Locus und die Pheromon-Signalkaskade	8
1.4 cAMP-SIGNALTRANSDUKTION IN <i>USTILAGO MAYDIS</i>	9
1.5 KONTROLLE DER TELIOSPOREN-BILDUNG IN <i>USTILAGO MAYDIS</i>	9
1.6 FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT	12
2. ERGEBNISSE	13
2.1 ISOLIERUNG VON SSP1 (SPORE SPECIFIC PROTEIN 1) AUS <i>USTILAGO MAYDIS</i> TELIOSPOREN	13
2.2 KLONIERUNG DES <i>ssp1</i> GENS UND ISOLIERUNG VON <i>ssp1</i> -CDNA	14
2.3 DAS SSP1-PROTEIN BESITZT ÄHNLICHKEIT MIT LINOLEAT-DIOL-SYNTASE AUS <i>GAEUMANNOMYCES GRAMINIS</i> UND PROSTAGLANDIN-G/H-SYNTASEN AUS SÄUGERN	17
2.4 HERSTELLUNG UND ANALYSE <i>ssp1</i> -DEFIZIENTER <i>USTILAGO MAYDIS</i> STÄMME	19
2.4.1 Konstruktion von <i>ssp1</i> -Deletionsstämmen	19
2.4.2 <i>ssp1</i> -Deletionsstämmen sind pathogen und können Teliosporen bilden	20
2.4.3 Die Überproduktion des Ssp1-Proteins in Sporidien und Präsporulationsstadien zeigt keinen phänotypischen Effekt	23
2.5 ANALYSE DER <i>ssp1</i> -EXPRESSION WÄHREND DER PATHOGENEN ENTWICKLUNG	26
2.5.1 Die <i>ssp1</i> -Transkription wird im Tumor induziert	26
2.5.2 Die Induktion der Ssp1-Expression erfolgt in der Teliospore	26
2.6 REGULATION VON <i>ssp1</i>	28
2.6.1 Identifizierung regulatorischer DNA-Sequenzen stromaufwärts des <i>ssp1</i> -Translationsstarts	28
2.6.2 Die Histondeacetylase Hda1 agiert als Repressor der <i>ssp1</i> -Expression in haploiden Sporidien	33

2.6.3	<i>hda1</i> -Deletionsmutanten zeigen keine Deregulation der <i>ssp1</i> -Expression während der pathogenen Entwicklung	34
2.6.4	Untersuchung möglicher Einflüsse des <i>b</i> -Kreuzungstyplocus auf die <i>ssp1</i> -Expression	36
2.6.5	Untersuchung möglicher Einflüsse des <i>a</i> -Kreuzungstyplocus auf die <i>ssp1</i> -Expression	38
2.6.6	Das Pheromon-MAP-Kinase Modul hat keinen Einfluss auf die <i>ssp1</i> -Expression	39
2.6.7	Die Proteinkinase A beeinflusst die <i>ssp1</i> -Expression	40
2.7	SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG EINES SSP1-EGFP FUSIONSPROTEINS IN <i>USTILAGO MAYDIS</i>	42
2.7.1	Ssp1-eGFP lokalisiert auf globulären Organellstrukturen in Teliosporen	42
2.7.2	Ssp1-eGFP co-lokalisiert mit Nile Red anfärbbaren lipidhaltigen Strukturen in keimenden <i>Ustilago maydis</i> Teliosporen	43
2.8	ANALYSE DER UV-MUTANTE MR25-1	45
2.8.1	Die UV-Mutante MR25-1 zeigt eine Derepression der <i>ssp1</i> -Genexpression	45
2.8.2	Die Mutante MR25-1 besitzt einen Zellteilungsdefekt	46
2.8.3	Ansätze zur Komplementation des Phänotyps „Endoglukanase-Sekretion“ der UV-Mutante MR25-1	47
3.	DISKUSSION	49
3.1.	ISOLIERUNG DES STADIENSPEZIFISCH EXPRIMIERTEN PROTEINS SSP1	49
3.2	MULTIFAKTORIELLE REGULATION VON SSP1	50
3.2.1	Die positive Regulation der <i>ssp1</i> -Expression während der biotrophen Phase	50
3.2.2	Die negative Regulation der <i>ssp1</i> -Expression wird von der saprophytischen Phase bis zur Sporenreifung aufrecht erhalten	51
3.2.3	Die aktive cAMP-Signalkaskade beeinflusst die <i>ssp1</i> -Expression	54
3.2.4	Modell der Regulation von Ssp1	54
3.2.5	Ansätze zur Untersuchung der Teliosporenbildung in <i>Ustilago maydis</i>	56
3.3	FUNKTION VON SSP1	57
3.3.1	Ssp1 besitzt Homologie zu eukaryotischen Fettsäuredioxygenasen	57
3.3.2	Funktion von pilzlichen Oxylipinen	59
3.3.3	Mögliche Funktion von Ssp1 im Energiestoffwechsel	61
3.4	AUSBLICK	62
4.	MATERIAL UND METHODEN	63
4.1	MATERIAL UND BEZUGSQUELLEN	63
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	63
4.1.2	Oligonukleotide	71
4.1.4	Plasmide, Genbanken und Plasmidkonstruktionen	76
4.1.5	Strategie zur Isolierung des <i>ssp1</i> -Gens	84
4.2	MIKROBIOLOGISCHE, ZELLBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODEN	87
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	87
4.2.2	<i>Ustilago maydis</i>	88

4.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN_____	92
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren _____	92
4.3.2	<i>in vitro</i> -Modifikationen von DNA (Sambrook et al., 1989)_____	94
4.3.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren _____	95
4.3.4	Sequenz- und Strukturanalyse_____	99
4.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis et al., 1990) _____	99
4.4	BIOCHEMISCHE METHODEN_____	102
4.4.1	Proteinisolation und immunologischer Nachweis _____	102
4.4.2	Expression eines His ⁶ -SspI Fusionsproteins im pET Vektorsystem _____	105
4.5	VERGLEICH DER KEIMUNGSFÄHIGKEIT ZWISCHEN WT- UND Δ SSP1-TELIOsporen_____	108
4.5.1	Vergleich der Keimungsrate von wt- und Δ ssp1-Teliosporen _____	108
5. LITERATURVERZEICHNIS_____		111
DANKSAGUNG_____		118
LEBENS LAUF_____		121

1. Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*

In vielen Kulturen sind essbare Pilze seit Jahrtausenden ein Teil der Nahrungsgrundlage. Von den geschätzten 1.5 Millionen Pilzarten weltweit sind ca. 2000 essbare Spezies bekannt, von denen nur wenige, wie z. B. der als Champignon bekannte *Agaricus bisporus*, kommerziell gezüchtet werden. Schon die alten mittelamerikanischen Kulturen der Azteken und Maya schätzten „Huitlacoche“, wie sie die jungen Formen der wuchernden, gallenartigen Veränderungen auf Ähren und Kolben von Maispflanzen nannten, als eine Delikatesse (Valverde et al., 1995). Heute wissen wir, dass dem Lieblingsgericht der Azteken eine Infektion des phytopathogenen Basidiomyceten *U. maydis* zu Grunde liegt. Noch in unserer Zeit gilt „Huitlacoche“ in Mexiko als Spezialität und wird unter dem Synonym „Mexikanische Trüffel“ weltweit vertrieben.

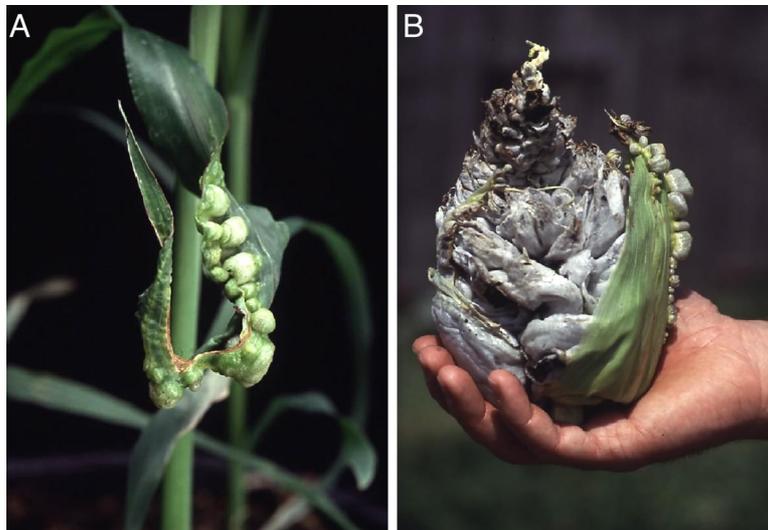


Abb. 1: Gallenbildung an Maispflanzen verursacht durch eine Infektion mit *Ustilago maydis*. A. Durch eine *U. maydis* Infektion induzierte Gallenbildung an einem Maisblatt (mit freundlicher Genehmigung von J. Kämper). **B.** Tumorbildung an einem Maiskolben (Mit freundlicher Genehmigung von J. Kämper).

Mit dem Mais gelangte auch *U. maydis* von der neuen in die alte Welt. Heute lassen sich fast in jedem Maisfeld Kolben finden, die aussehen, als hätten sie Feuer gefangen: vertrocknetes und wie verbrannt aussehendes Pflanzengewebe, angefüllt mit Millionen dunkler Pilzsporen. Dieses „rußige“ Aussehen der infizierten Pflanzenteile brachte der Krankheit ihren

Trivialnamen Maisbeulenbrand ein (Abb. 1). Der gemeine Maisbeulenbrand ist sowohl Biologen wie auch Bauern seit mindestens 250 Jahren ein Begriff. Die ersten Berichte über den „Maisbeulenbrand“ erschienen bereits 1760 (Anon, 1891), und schon 1883 bewies Brefeld durch Inokulationsversuche das Infektionspotential des Pilzes (Brefeld, 1883).

U. maydis zählt zu den fakultativ biotrophen Basidiomyceten aus der Gruppe der Brandpilze (*Ustilaginales*). Brandpilze sind weltweit verbreitet und zeichnen sich in der Regel durch ein sehr enges Wirtsspektrum aus, welches auch wirtschaftlich relevante Getreidesorten umfasst. Vorherrschend Vertreter des Genus *Ustilago* sind für signifikante Ernteschäden bei Hafer (*U. avenae*), Gerste (*U. nuda*), Weizen (*U. tritici*) sowie Zuckerrohr (*U. scitaminea*) verantwortlich (Kahmann et al., 2000).

Heute ist *U. maydis* als Modellorganismus für phytopathogene Pilze aus dem wissenschaftlichen Alltag nicht mehr wegzudenken. Vergleichbar mit *Saccharomyces cerevisiae* eignet sich *U. maydis* hervorragend für moderne molekularbiologische Analysen. Die hefeartige, haploide Form ist gut in Nährmedien propagierbar, und ein etabliertes Transformationssystem (Wang et al., 1988) und effiziente homologe Rekombination (Fotheringham und Holloman, 1989) erlauben eine einfache und gezielte Manipulation des pilzlichen Genoms. Mit diesen Voraussetzungen eröffnet *U. maydis* die Möglichkeit zur Untersuchung einer Vielzahl von biologischen Fragestellungen.

1.2 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Der Lebenszyklus von *U. maydis* umfasst drei in Bezug auf Kernphase und Morphologie unterschiedliche Abschnitte. Neben den saprophytisch wachsenden, haploiden Sporidien bildet der Pilz nach der Fusion zweier kompatibler Zellen ein filamentöses Dikaryon, das gleichzeitig die pathogene Form von *U. maydis* darstellt. Kompatible Sporidien beinhalten jeweils unterschiedliche Allele der beiden Paarungstyploci *a* und *b*, welche eine genetische Voraussetzung für die Zell/Zell-Erkennung und die erfolgreiche Infektion des Wirts darstellen (siehe Abschnitt 1.3). Als dritte morphologische Form gelten die diploiden Teliosporen, welche nur innerhalb der Pflanzengallen gebildet werden können (zusammengefasst bei Banuett, 1995 und Kahmann et al., 2000) (Abb. 2).

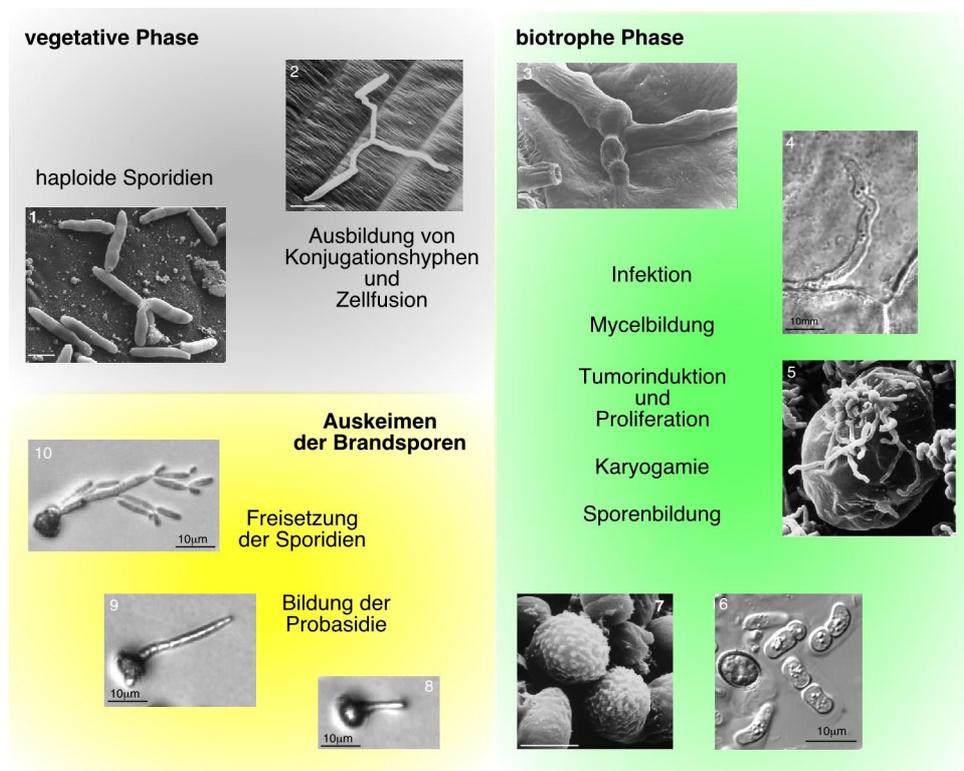


Abb. 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. (1) Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Sprossung (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, mit freundlicher Genehmigung von G. Wanner, C. Quadbeck-Seeger und J. Kämper). (2) Fusion zweier haploider Zellen und Dikarienbildung auf der Blattoberfläche (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, aus Snetselaar und Mims, 1993). (3) Penetration der Maispflanze durch das dikaryotische Filament (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, mit freundlicher Genehmigung von K. Snetselaar). (4) Wachstum der Pilzhypen im Pflanzengewebe (lichtmikroskopische Aufnahme, S. Huber). (5) Starke Proliferation des Pilzmycels im Tumor (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, mit freundlicher Genehmigung von K. Snetselaar). (6) Präsporulationsstadien bestehend aus sich abrundenden Zellen fragmentierter Hyphensegmente (lichtmikroskopische Aufnahme, S. Huber). (7) Bildung von Brand- oder Teliosporen in den sporogenen Hyphen (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, aus Snetselaar und Mims, 1994). (8, 9, 10) Keimung der diploiden Brandsporen und Abschnürung der haploiden Sporidien oder Basidiosporen (lichtmikroskopische Aufnahme, S. Huber).

In der Natur findet sowohl die gegenseitige Erkennung der kompatiblen Sporidien wie auch die Zellfusion auf der Blattoberfläche der Wirtspflanzen Mais (*Zea mays*) oder Teosinte (*Zea mexicana*) statt (Christensen, 1963; Holliday, 1961). Die wechselseitige Erkennung des vom Kreuzungspartner ausgeschütteten Pheromons resultiert in der Bildung einer Konjugationshyphne an einem Pol der Zelle, die wahrscheinlich entlang eines Pheromongradienten auf die jeweiligen Zielzelle zuwächst (Snetselaar et al., 1996). Nach ihrem Aufeinandertreffen fusionieren diese Hyphen an ihren Spitzen und stellen somit den Ausgangspunkt zur Bildung des infektiösen, dikaryotischen Filaments dar (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Außerhalb der Pflanze besteht das dikaryotische Filament aus einer wachsenden Spitzenzelle und durch regelmäßige Septen abgetrennte leere Abschnitte der vorhergehenden Wachstumszonen (Christensen, 1963). Sowohl die Zell/Zell-Erkennung als auch die Bildung des filamentösen Dikaryons kann unter artifiziellen Bedingungen im Labor auf aktivkohlehaltigem Medium nachvollzogen werden (Day und Anagnostakis, 1971; Banuett und Herskowitz, 1994b), wobei die leeren, septierten Filamente der dikaryotischen Hyphen weißlich erscheinen.

Für die pathogene Entwicklung und damit auch für die Ausbildung der sexuellen Sporen ist der Pilz strikt an seine Wirtspflanze gebunden. Das infektiöse Dikaryon dringt nach der Ausbildung einer appressorienartigen Struktur in die Pflanze ein (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Nach einigen Tagen kann neben Nekrosen an den ursprünglichen Infektionsstellen eine Anthocyanbildung in den Pflanzenzellen beobachtet werden (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1993). Zu diesem Zeitpunkt erscheinen verzweigte, septierte Hyphen innerhalb der Pflanzenzelle, wobei die Zellwand des Wirts anscheinend ohne eine Verletzung der Plasmamembran durchdrungen wird (Snetselaar und Mims, 1992; Banuett und Herskowitz, 1996). Fünf bis sechs Tage nach der Infektion können erste kleine Tumore detektiert werden (Banuett und Herskowitz, 1996). Die Pflanzenzellen im jungen Tumorgewebe sind im Vergleich zu denen der umgebenden Regionen vergrößert und beinhalten oft verzweigte Hyphen, die nun auch im interzellulären Raum zwischen den Wirtszellen wachsen (Callow und Ling, 1973; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1994; Banuett und Herskowitz, 1996). In den sich vergrößernden Tumoren kommt es in den folgenden Tagen zu einer starken Proliferation der verzweigten Hyphen. Ungefähr neun bis zehn Tage nach Inokulation erscheinen die Hyphen als „wurmartig“ umeinander gewundene, in eine gallertartige Masse eingebettete Strukturen (Banuett und Herskowitz, 1996). Nachfolgend zerfallen diese sporogenen Hyphen in Segmente. Eine Kernfärbung intakter oder fragmentierter Hyphen wies einen Nukleus pro Zelle nach, weswegen vermutet wird, dass die Karyogamie in diesem Stadium bereits stattgefunden hat (Banuett und Herskowitz, 1996). Zehn bis elf Tage nach der Infektion tritt ein morphologischer Wandel von zylindrisch geformten Hyphenfragmenten hin zu riesigen Mengen sich abrundender Zellen ein (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims,

1993). Die Zellen dieses Präsporulationsstadiums besitzen einen Nukleus und variieren stark in ihrer Morphologie, die von dreieckigen bis hin zu elipsoiden und mandelförmigen Zellen reicht (Banuett und Herskowitz, 1996). Die Zellen sind zu diesem Zeitpunkt noch immer in einer gallertartigen Matrix eingebettet, die möglicherweise von den ursprünglichen Hyphenwänden stammt (Fischer und Holton, 1957). Am 13. bis 14. Tag nach der Infektion sind die Gallen mit abgerundeten Zellen angefüllt, die sich in verschiedenen Stadien der Sporenwandreifung befinden. Unreife Teliosporen sind gelblich-braun gefärbt und lichtmikroskopisch leicht von der reifen Form zu unterscheiden, die neben der dunkelbraunen Pigmentierung eine charakteristische ornamentierte Oberflächenstruktur aufweisen (Banuett und Herskowitz, 1996; Christensen, 1963). Reife Pflanzengallen sind angefüllt mit Millionen braunschwarzer Brandsporen. Die reifen, trockenen Tumore platzen auf, wodurch die diploiden Sporen entlassen werden (Christensen, 1963). Dies stellt vermutlich den Hauptverbreitungsweg des Pilzes in der Natur dar.

Die dunkle Pigmentierung der ca. 8 μm großen, reifen Teliosporen wird durch Melaninablagerungen in den äußeren Teilen der 700 nm dicken, aus drei verschiedenen Schichten aufgebauten Zellwand verursacht (Ramberg und McLaughlin, 1980; O'Donnell und McLaughlin, 1984; Deml, 1977). Diese Zellwand verleiht den Sporen eine enorme Resistenz gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen. So zeigten Kedves und Tóth (1993), dass ein Ablösen der äußeren Sporenwandhülle erst nach zehnstündigem Erhitzen auf 200°C zu bewerkstelligen war (Kedves, 1993). Das Zytoplasma der Spore enthält neben dem Nukleus, den Ribosomen, Mitochondrien und dem rauhen und glatten endoplasmatischen Retikulum eine Ansammlung von Lipidtropfen (Ramberg und McLaughlin, 1980). Verglichen mit anderen Pilzsporen (Weete et al., 1969; Summer et al., 1969) besitzen *U. maydis* Teliosporen einen vergleichsweise hohen Lipidanteil (Gunasekaran et al., 1972).

Eine Voraussetzung für die Entwicklung der diploiden Teliosporen ist die Passage durch die Wirtspflanze. Für die ebenfalls zur Familie der *Ustilaginaceae* zählenden Arten *Tilletia indica* und *Tilletia controversa* wird die Bildung von Teliosporen *in vitro* beschrieben (Fuentes-Davila und Duran, 1986; Tirone et al., 1989). Ruiz-Herrera et al. (1999) berichten die Bildung dunkel pigmentierter, teliosporenähnlicher Zellen von *U. maydis* nach Kultivierung kompatibler Stämme auf einer Membran, die über eine embryogene *Zea mays* Zellkultur gelegt wurde. Obwohl in diesem System rekombinante, haploide Stämme erhalten werden können sowie eine Differenzierung der Maiszellen beobachtet wird (Ruiz-Herrera et al., 1999), ist es nicht gesichert, dass es sich bei den sporenartigen Strukturen wirklich um Teliosporen handelt. Die sporenähnlichen Strukturen besitzen, verglichen zu Teliosporen, nur eine zweischichtige Zellwand ohne die charakteristische Ornamentierung der Sporenoberfläche. Aus diesem Grund ist es nicht ausgeschlossen, dass es sich bei diesen Zellen um eine andere Dauerform handelt, wie z.B. die bereits beschriebenen *U. maydis* Chlamydosporen (Kusch und Schautz, 1989).

Während der Keimung der Teliosporen wächst das Promycel bis zu einer Länge von ca. 20 µm, bevor das erste Septum eingezogen wird. Dieser Zeitpunkt überlappt mit der Beendigung der ersten meiotischen Teilung (Ramberg und McLaughlin, 1980). Meist wird ein dreigeteiltes Promycelium ausgebildet, dessen Kompartimente in Bezug auf die Spore proximal, intermediär und distal positioniert und mit Lipidtropfen, Mitochondrien und Ribosomen angefüllt sind (O'Donell und McLaughlin, 1984; Ramberg und McLaughlin, 1980). Jedes dieser probasidialen Kompartimente besitzt einen haploiden Nukleus. Die Zellwand des Promycels entstammt der inneren Wandschicht der Teliospore (Ramberg und McLaughlin, 1980). Ausgehend von der septierten Probasidie werden die haploiden Sporidien, bei denen es sich im eigentlichen Sinn um Basidiosporen handelt, seitlich abgeschnürt (Christensen, 1963; Ramberg und McLaughlin, 1980).

Bei der Keimung der diploiden Sporen auf der Blattoberfläche kann es nach Fusion der kompatiblen Meioseprodukte zu einer direkten Infektion der Wirtspflanze kommen (Walther, 1934; Millis und Kotze, 1981). Sowohl die Sporenkeimung als auch die damit verbundene Meiose kann auf artifiziellem Medium unabhängig von der Wirtspflanze nachvollzogen werden (Banuett, 1992, Banuett, 1995). Die zigarrenförmigen Sporidien teilen sich hefeartig durch Knospung und können unter Laborbedingungen in Flüssig- oder auf Festmedium kultiviert werden.

1.3 Die Kreuzungstyploci von *Ustilago maydis*

Der Wechsel vom saprophytischen Wachstum der haploiden Zellen zur pathogenen und sexuellen Entwicklung innerhalb der Wirtspflanze unterliegt der genetischen Kontrolle der beiden Paarungstyploci *a* und *b*. Der *a*-Locus liegt in zwei unterschiedlichen Allelen *a1* und *a2* vor und vermittelt die interzelluläre Erkennung und die Zellfusion, während der multiallelische *b*-Locus für die intrazelluläre Erkennung kompatibler Zellen verantwortlich ist und die Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons und die pathogene Entwicklung steuert (zusammengefasst in Kahmann et al., 2000; Banuett, 1995).

1.3.1 Der *b*-Locus

Der multiallelischen *b*-Locus, von dem bereits 20 unterschiedliche Allele kloniert wurden (J. Kämper, pers. Mitteilung), beinhaltet die divergent transkribierten Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*). Die entsprechenden Proteine, bE und bW, besitzen zueinander bis auf die ihnen gemeinsame Homeodomäne keine signifikanten Homologien auf Aminosäureebene. Dennoch sind sich bE und bW in ihrem strukturellen Aufbau ähnlich. Die Proteine zeichnen sich durch einen hochkonservierten C-Terminus mit mehr als 90% Identität zwischen den einzelnen Allelen aus, dem sich ein Homeodomänenmotiv und ein variabler N-Terminus anschließt (Kronstad und Leong, 1989; Schulz et al., 1990; Gillissen et al., 1992). Nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien kommt es in der Zelle zur Dimerisierung der bE- und bW-Proteine unterschiedlichen allelischen Ursprungs. Die Bildung des aktiven bE/bW Heterodimers wird über die Interaktion des variablen N-Terminus beider Proteine vermittelt (Kämper et al., 1995). b-Proteine, die vom selben Allel kodiert werden, können kein aktives Heterodimer bilden. Die Herstellung eines haploiden solopathogenen Stammes, welcher bE- und bW-Proteine unterschiedlicher Allele exprimiert und pathogen ist, unterstreicht die zentrale Rolle des aktiven bE/bW Heterodimers für die Pathogenität (Bölker et al., 1995b). Das bE/bW Heterodimer kontrolliert als Transkriptionsfaktor die Expression seiner Zielgene auf direktem Weg oder über eine postulierte b-vermittelte Regulationskaskade (Kämper et al., 1995; Romeis et al., 2000, Brachmann, 2001a; Weinzierl, 2001).

1.3.2 Der *a*-Locus und die Pheromon-Signalkaskade

Zur gegenseitigen Erkennung sowie der nachfolgenden Ausbildung von Konjugationshyphen und Zellfusion benötigen beide Kreuzungspartner unterschiedliche Allele des *a*-Locus (Spellig et al., 1994b; Banuett, 1995; Kahmann et al., 2000). Diese kodieren jeweils für einen Pheromonvorläufer (Mfa1 bzw. Mfa2) und einen Pheromonrezeptor (Pra1 bzw. Pra2), welcher das sekretierte Pheromon des entsprechenden Kreuzungspartners erkennen und binden kann (Bölker et al., 1992). Nach posttranslationaler Modifikation werden die Pheromone Mfa1 und Mfa2 als dreizehn bzw. neun Aminosäuren lange Lipopeptide sekretiert (Spellig et al., 1994a). Ein derartiges Pheromon/Rezeptor vermitteltes Zell/Zell-Erkennungssystem ist auch von anderen pilzlichen Systemen wie z.B. in *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* bekannt (Anderegg et al., 1988, Davey, 1992; Tanaka et al., 1993).

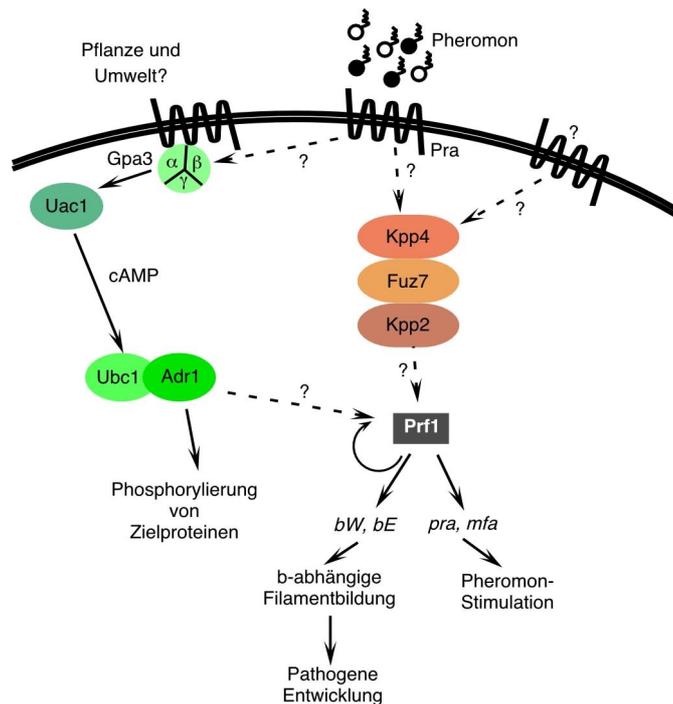


Abb. 3: Signaltransduktion in *Ustilago maydis* während der Zell/Zell-Erkennung (modifiziert nach Kahmann et al., 2000). Einzelheiten siehe Text (1.3.2 und 1.4).

In *U. maydis* wird das Pheromonsignal höchstwahrscheinlich über ein MAP-Kinase Modul auf den zentralen Transkriptionsfaktor Prf1, ein DNA-bindendes HMG-Domänenprotein (high mobility group), übertragen (Hartmann et al., 1996) (Abb. 3). Als mögliche Komponenten dieser MAP-Kinase Kaskade konnten die MAPKK-Kinase Kpp4 (P. Müller,

pers. Mitteilung; Andrews, 2000), die MAPK-Kinase Fuz7 (Banuett und Herskowitz, 1994a) und die MAP-Kinase Kpp2 (Müller et al., 1999; Mayorga und Gold, 1999) identifiziert werden. Mit Ubc2 wurde wahrscheinlich eine oberhalb der Pheromon-MAPK Kaskade agierendes Element isoliert (Mayorga und Gold, 2001). Da auch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu einer Induktion der Transkription der Pheromongene führt (Krüger et al., 1998), könnte der cAMP-Signalweg (Abb. 3, siehe 1.4) möglicherweise ebenfalls durch das Pheromonsignal aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Prf1 auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene durch den intrazellulären cAMP-Spiegel reguliert wird (Krüger et al., 1998, Hartmann et al., 1999).

1.4 cAMP-Signaltransduktion in *Ustilago maydis*

Der cAMP-Signalweg (Abb. 3) beeinflusst neben der Regulation von Zellmorphologie und Kreuzungsverhalten auch die sexuelle und pathogene Entwicklung in *U. maydis* (Kronstad, 1997; Krüger et al., 1998). Zu den bereits bekannten Komponenten der cAMP-abhängigen Signalkaskade zählen neben Gpa3, der G α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins (Regenfelder et al., 1997; Krüger et al., 1998) auch die Adenylatzyklase Uac1 (Barrett et al., 1993; Gold et al., 1994), sowie die katalytische und regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), Adr1 und Ubc1 (Dürrenberger et al., 1998; Gold et al., 1997a). Die Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins über ein noch unbekanntes Signal führt zur Dissoziation der α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit und zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Durch den Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels kommt es zur Trennung der Untereinheiten der PKA, worauf die Phosphorylierung von Zielproteinen durch die katalytische Untereinheit der PKA erfolgt (Gold et al., 1997b; Dürrenberger et al., 1998).

Die cAMP Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle für die Tumorbildung und die damit verbundene sexuelle Entwicklung. Deletionsmutanten in *gpa3*, *uac1* und *adr1* sind apathogen (Gold et al., 1994, Regenfelder et al., 1997, Dürrenberger et al., 1998). Δ *ubc1* Stämme sind noch zur Infektion der Wirtspflanze fähig, ihre Entwicklung endet aber nach der frühen Infektionsphase (Gold et al., 1994, Gold et al., 1997b). Die Expression der konstitutiv aktiven Form der G α Untereinheit Gpa3_{Q206L} oder einer punktmutierten Form von Ubc1 (Ubc1_{R321Q}) bewirkt die Ausbildung von Tumoren, in denen die massive Proliferation des Pilzes und die Ausbildung der Teliosporen unterbleibt (Regenfelder et al., 1997; Krüger et al., 2000).

1.5 Kontrolle der Teliosporenbildung in *Ustilago maydis*

In *U. maydis* sind bis heute verschiedene Einflüsse bekannt, die auf den Verlauf der sexuellen Reproduktionsphase einwirkenden (Abb. 4). So spielt die Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels für die Vollendung der sexuellen Entwicklung eine wichtige

Rolle. Dies verdeutlichen die phänotypischen Effekte von $\Delta ubc1$ -, $ubc1_{R321Q}$ - oder $gpa3_{Q206L}$ -Mutanten (siehe 1.4) (Gold et al., 1997b; Gold et al., 1994; Krüger et al., 2000; Regenfelder et al., 1997). *hgl1*-Mutanten (*hyphal growth locus*) zeigen einem Entwicklungsarrest während eines späten Stadiums der biotrophen Phase (Dürrenberger et al., 2001). *hgl1*, das als Suppressor von Mutanten in *adr1* (siehe 1.4) identifiziert wurde und das keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen in den Datenbanken besitzt, scheint für das Fortschreiten des Entwicklungsprogramms vom Stadium der Hyphenfragmentierung hin zur Teliosporenbildung eine Rolle zu spielen. Mutationen in *hda1* (*Histondeacetylase 1*, M. Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung) oder *rum1* (*regulator of Ustilago maydis 1*; Quadbeck-Seeger et al., 2000) führen ebenfalls zu einem Entwicklungsarrest im Verlauf der späten biotrophen Phase. Die Differenzierung *hda1*-defizienter Stämme endet mit der Ausbildung verzeigter, „wurmartig“ umeinander gewundener Hyphenstrukturen (M. Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung), während die pilzliche Entwicklung in *rum1*-Mutanten vor der Fragmentierung sporogener Hyphen abbricht (Quadbeck-Seeger et al., 2000). Das *hda1*-Genprodukt besitzt Ähnlichkeit zu *rpd3*-homologen Histonacetylase aus *S. cerevisiae* (M. Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung). Rum1, das vermutlich als transkriptioneller Regulator agiert, zeigt Homologie zu menschlichem Retinoblastoma-Bindeprotein 2 (Quadbeck-Seeger et al., 2000). Wahrscheinlich sind sowohl Rum1 wie auch Hda1 an der chromatinvermittelten Genregulation in *U. maydis* beteiligt (J. Kämper, pers. Mitteilung).

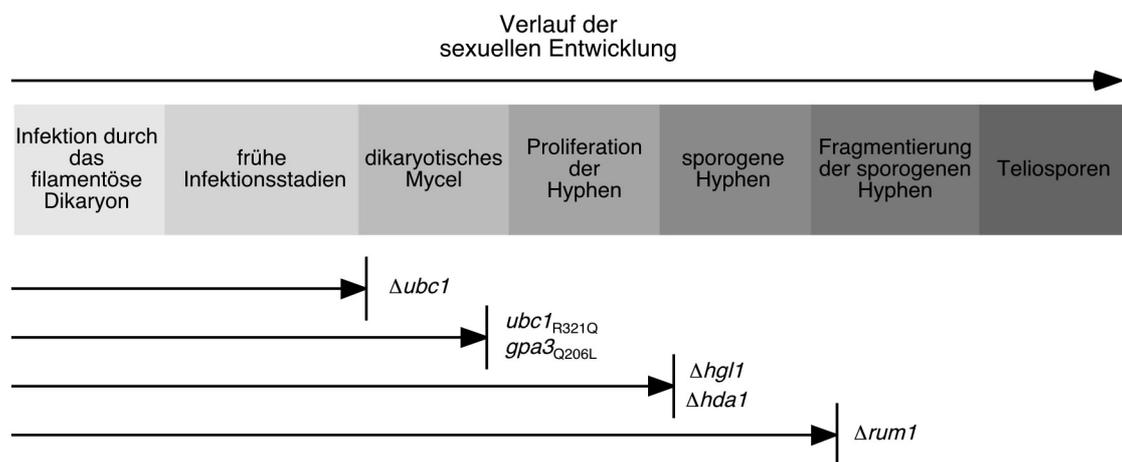


Abb. 4: Sporulationsdefiziente Mutanten in *Ustilago maydis*. Schematische Darstellung der pathogenen und sexuellen Entwicklung von *U. maydis* ist während der biotrophen Phase. Die Enden der Pfeile symbolisieren den Entwicklungsarrest der jeweils angeführten Mutanten anhand morphologischer Gesichtspunkte. Erläuterungen siehe Text.

Von allen pilzlichen Modellsystemen ist der Prozess der Sporenbildung in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher die überlappenden Prozesse von Meiose und sexueller Sporenbildung beinhaltet, am besten untersucht (zusammengefasst in Herskowitz, 1988;

Clancy, 1998; Chu et al., 1998). Da mittels umfassender DNA-Mikroarray Analysen die Genexpression während der Sporulation in *S. cerevisiae* analysiert werden konnte (Chu et al., 1998), ist heute ein detailliertes Gesamtbild dieses Entwicklungsabschnitts vorhanden. Von den etwa 6200 proteinkodierenden Genen im Hefegenom zeigen ungefähr 1000 eine signifikante Änderungen ihrer Transkriptionsstärke während der Sporulation. Auf Grund dieser Analyse läßt sich die Genexpression während der Sporulation der Bäckerhefe in sieben distinkte Expressionsklassen einteilen. Die zeitlich geordnete Regulation der Transkription im Verlauf dieses Entwicklungsprogramms beruht auf der Vorstellung eines Transkriptionskaskadenmodells (Chu et al., 1998; Chu und Herskowitz, 1998, Mitchell, 1994). So wird die Expression eines Großteils der während eines frühen Stadiums der Sporulation induzierten Gene durch einen Komplex der Transkriptionsregulatoren Ume6 und Ime1 kontrolliert (Rubin-Bejerano et al., 1996; Kupiec et al., 1997). Für die Koordinierung von meiotischer Kernteilung und Sporenbildung ist der meiosespezifische Transkriptionsfaktor Ndt80 zuständig (Clancy, 1998; Chu und Herskowitz, 1998).

Das Prinzip einer solchen transkriptionellen Regulationskaskade ist auch mit *brlA*-, *abaA*- und *wetA*, welche die spätere Expression entwicklungspezifischer Gene im Verlauf der asexuellen Sporenbildung von *Aspergillus nidulans* kontrollieren, wieder zu finden (Boylan et al., 1987; Mirabito et al., 1989; Adams et al., 1998). Die Mutation jedes der genannten Gene blockiert die asexuelle Sporulation in einem definierten Stadium der Konidiophorenentwicklung. BrlA, ein DNA-bindendes C₂H₂ Zink-Finger Protein, das alleine für die Steuerung der asexuellen Sporulation ausreichend ist (Adams et al., 1988; Chang und Timberlake, 1993), aktiviert *abaA*, dessen Genprodukt AbaA ebenfalls eine DNA-bindende Domäne enthält und die transkriptionelle Aktivierung einiger sporulationspezifischer Gene bewirkt (Mirabito et al., 1989; Andrianopoulos und Timberlake, 1994). AbaA induziert die Expression von *wetA*, welches wiederum die Expression weiterer Strukturgene stimuliert.

Die Besonderheit der sexuellen Sporenbildung in *U. maydis* liegt in der zeitlichen Trennung von Meiose und der Ausbildung diploider Dauerformen, deren Entwicklung die Passage durch die Wirtspflanze *Z. mays* voraussetzt. Dieser Entwicklungsweg des Pilzes setzt eine komplexe Regulation voraus und beinhaltet möglicherweise Komponenten, die in der Sporogenese anderer wirtsunabhängiger Pilze wie *S. cerevisiae* nicht vorhanden sind. Auch das Milieu innerhalb der Pflanzengallen könnte eine nicht unbedeutende Rolle in der Sporenbildung von *U. maydis* spielen. Das Vorliegen einer die Sporogenese kontrollierenden Regulationskaskade ähnlich der Situation in *S. cerevisiae* oder *A. nidulans* ist auch für *U. maydis* denkbar. Da es bis heute keine Information über Regulatoren dieser postulierten Kaskade in *U. maydis* gibt, gewinnen genetische Marker, die eine Isolierung solcher zentraler Faktoren mittels genetischer „Screens“ erlauben, immer mehr an Bedeutung.

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Die sexuell gebildeten Teliosporen in *U. maydis* stellen ein bislang nicht untersuchtes Entwicklungsstadium des Pilzes dar. *U. maydis* bietet die Möglichkeit, Sporenbildung ohne die zusätzlichen Komplikationen eines parallel ablaufenden Meioseprozesses zu studieren. Darüber hinaus besteht die Kopplung der sexuellen Reproduktion an die biotrophe Phase. Auf dieser Grundlage hatte die vorgelegte Arbeit zum Ziel, ein spezifisch in Teliosporen exprimiertes Gen über einen reversen genetischen Ansatz zu identifizieren. Daran sollte sich Studien zur Genfunktion und Regulation anschließen. Ein derartig entwicklungspezifisch exprimiertes Gen sollte für zukünftige genetische Ansätze zur Isolierung regulatorischer Komponenten der Sporenbildung dienen.

2. Ergebnisse

2.1 Isolierung von Ssp1 (spore specific protein 1) aus *Ustilago maydis* Teliosporen

Zur Isolierung eines sporenspezifischen Proteins wurde in einem biochemischen Ansatz das Proteinexpressionsprofil reifer Teliosporen dem haploider Sporidien gegenübergestellt, um so differentiell exprimierte Proteine zu identifizieren. Dieser Ansatz wurde aus technischen Gründen einem „Differential Display“ Ansatz vorgezogen, in dem die mRNA-Zusammensetzung verschiedener morphologischer Stadien verglichen wird, da sich aus reifen Sporen keine qualitativ hochwertige RNA isolieren ließ. Dies begründete sich im äußerst langwierigen und schwierigen Aufbrechen der Sporen.

Die hefeartige, vegetative Form von *U. maydis* wurde auf Grund ihrer unter Laborbedingungen leichten Kultivierbarkeit gewählt. Sie unterscheidet sich zusätzlich morphologisch signifikant von den diploiden Teliosporen. Präsporulationsstadien des Pilzes aus infizierten Pflanzengallen konnten für weitere Proteinexpressionsvergleiche nicht herangezogen werden, da es technisch derzeit nicht möglich ist, den pilzlichen vom pflanzlichen Proteinanteil zu trennen.

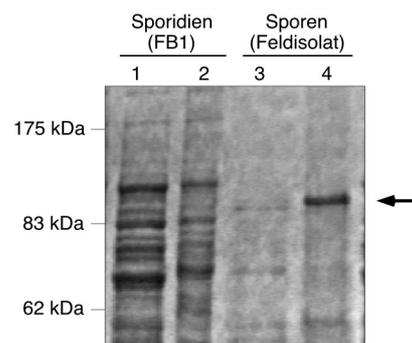


Abb. 5: Vergleich des Proteinexpressionsprofils haploider Sporidien und diploider Teliosporen. Haploide Sporidien des Stammes FB1 (*al b1*) wurden in $\text{YEPS}_{\text{light}}$ -Flüssigmedium bis $\text{OD}_{600} \sim 0.6$ kultiviert und die Zellen für die folgende Proteinpräparation geerntet. 1 g reife Teliosporen (Feldisolate) wurden aus getrockneten Pflanzentumoren isoliert. Nach dem Zellaufschluss wurden die SDS-löslichen Proteine aus Überstand und Pelletfraktion jeder Präparation auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Spur 1: Überstand FB1; Spur 2: Pellet FB1; Spur 3: Überstand Teliosporen; Spur 4, Pellet Teliosporen) und dieses mit einer Coomassie-Blue-R250-haltigen Lösung angefärbt. Die dem Ssp1 Protein entsprechende Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet, der Proteingrößenstandard eingezeichnet.

Für die Proteinpräparation wurden haploide Sporidien des Stammes FB1 (*al b1*; Banuett und Herskowitz, 1989) in YEPS_{light}-Flüssigmedium kultiviert und geerntet. Reife, mit Teliosporen gefüllte Tumore infizierter Maispflanzen (Feldisolate, Altötting, 1997) wurden gesammelt, getrocknet und die Teliosporen vom Pflanzenmaterial getrennt. In einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Zelmühle wurden Teliosporen und Sporidien aufgebrochen (M&M). Durch Zentrifugation des Proteinrohextrakts wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt. Im Anschluss wurden die SDS-löslichen Proteine beider Fraktionen in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. In der aus Teliosporen stammenden Pelletfraktion (Abb. 5; Spur 4) wurde eine prominente Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 110 kDa identifiziert, die in der entsprechenden Fraktion aus haploiden Sporidien nicht vorhanden war (Abb. 5; Spur 2). Dieses Protein Ssp1 (spore specific protein 1) wurde für eine weitere Bearbeitung ausgewählt.

2.2 Klonierung des *ssp1*-Gens und Isolierung von *ssp1*-cDNA

Im nächsten Schritt sollte das Ssp1 kodierende Gen aus dem *U. maydis* Genom isoliert werden, wobei mittels eines reversen genetischen Ansatzes durch die Bestimmung von Teilen der Ssp1-Aminosäuresequenz Rückschlüsse auf die Nukleotidsequenz des Gens gezogen werden sollten.

Für die Bestimmung der Aminosäuresequenz wurde das Ssp1-Protein aus dem SDS-Gel eluiert. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von Dr. F. Lottspeich durchgeführt. Dabei wurde Ssp1 durch einen Verdau mit der Endoprotease Lys-C in einzelne Peptidfragmente verschiedener Größe gespalten (Eckerskorn und Lottspeich, 1989). Mit Hilfe des Edman-Abbaus konnte die Aminosäuresequenz von vier internen Ssp1-Peptidfragmenten ermittelt werden (Eckerskorn und Lottspeich, 1989; Tabelle 1). Die Ermittlung des N-Terminus von Ssp1 war auf Grund einer N-terminaler Blockierung nicht möglich (F. Lottspeich, pers. Mitteilung).

Tabelle 1: Aminosäuresequenz der internen Ssp1-Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz
Lys-C1	TYSSFSEWNP DPR
Lys-C4	LSNDPERFNPSSK
Lys-C7	HNGRLAPAGPPPVVNDAGPTPNQ(K)
Lys-C14	FALQAVALPDVVAN(K)

Zur Isolierung des *ssp1*-Gens wurden auf der Basis der bekannten Aminosäuresequenz der Peptide degenerierte Oligonukleotide abgeleitet (M&M). Diese Oligonukleotide wurden in verschiedenen Kombinationen in eine PCR mit genomischer DNA des Stammes FB1 (*al b1*)

als Matrize eingesetzt (M&M). Die Analyse der PCR-Produkte nach der Auftrennung auf einem 1%igen Agarosegel ergab für die Oligonukleotidkombination SH14-1 (kodierender Strang) und SH7-4 (Gegenstrang) eine prominente Bande von ungefähr 260 bp, für SH1-1 (kodierender Strang) mit SH7-4 (Gegenstrang) eine von ~ 1600 bp und für SH4-1 (kodierender Strang) mit SH7-4 (Gegenstrang) ein Amplifikat von ~ 180 bp (M&M). Die Fragmente wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO kloniert. Die respektiven Plasmide pSH1, pSH2 und pSH3 wurden im Anschluss sequenziert (M&M). Die Analyse ergab, dass in allen drei Fällen ein gleicher Bereich des *U. maydis* Genoms amplifiziert worden war. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des größten isolierten DNA Fragments (1567 bp) der Oligonukleotidkombination SH7-4 mit SH1-1 beinhaltete die vier Peptide Lys-C1, -C4, -C7 und C14.

Zur Isolierung der vollständigen *spl*-Gensequenz wurde eine genomische *U. maydis* Cosmidbank (Bölker et al., 1995a) mit dem radioaktiv markierten 186 bp PCR-Produkt der Oligonukleotidkombination SH4-1/SH7-4 aus dem Plasmid pSH3 durchmustert (M&M). Auf diese Weise wurde der Cosmidsubklon B10 isoliert und im Anschluss über Restriktionsanalysen kartiert (eine detaillierte Beschreibung ist „M&M“ zu entnehmen). Ein 7.6 kb großes Fragment wurde für die nachfolgende Sequenzanalyse in verschiedene Subklone unterteilt (die einzelnen Subklone sind in „M&M“ beschrieben). Die Auswertung der Sequenzanalyse des 7.6 kb Fragments ergab einen offenen Leserahmen von 3192 bp, in dessen abgeleiteter Aminosäuresequenz die vier Peptide Lys-C1, Lys-C4, Lys-C7 und Lys-C14 identifiziert werden konnten (Abb. 6). Des Weiteren enthielt das Fragment 2588 bp der stromaufwärts des potentiellen *spl*-Translationsstarts liegenden Sequenz sowie 1826 bp stromabwärts des postulierten Stop-Codons (**Abb. E-3** und M&M). Der auf Grund der Sequenzinformation postulierte offene Leserahmen von *spl* kodiert für ein Protein von 1064 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 114 kDa, das mit der geschätzten Größe des Spl Proteins in der SDS-PAGE übereinstimmt.

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob *spl* verborgene Intronsequenzen beinhalten könnte, die sich im gleichen Leserahmen („in frame“) wie das Gen selbst befinden, und aus diesem Grund nicht identifiziert werden konnten. Zu diesem Zweck sollte *spl*-cDNA isoliert werden. Da zu diesem Zeitpunkt keine cDNA-Bank mit *U. maydis* cDNA aus Tumormaterial zur Verfügung stand, wurde die bereits vorhandene *U. maydis* cDNA-Phagenbank λ gt10 verwendet, für deren Erstellung mRNA des diploiden Stammes FBD11 nach 48-stündiger Kultivierung auf aktivkohlehaltigem Medium benutzt wurde (Schauwecker et al., 1995; M&M). Da eine schwache Expression von Spl während der vegetativen Phase nicht ausgeschlossen werden konnte, bestand die Möglichkeit, aus der λ gt10-Phagenbank *spl*-cDNA zu isolieren.

1/1	ATG AAA TTG TTC GTC CAG GAC AAG GTA TCT	31/11	CAG ACC ACC GAT GCG GCA GGT CTT TCC GCT	61/21	ACT GAC GGG CAC AAA AAG GCG CAA AAC ACC
M K L F V Q D K V S Q T T D A A G L S A T D G H K K A Q N T					
91/31	TTG AAG TAC GCT CAG CAA AAG ACT TCG TCG	121/41	GCA GCC ACT TCG TCG GTC GAG GCG TTG CAG	151/51	AGC TTG GTG GAC CAG CTC AAC CGC AGC AGG
L K Y A Q K T S G A Q A L V S S V E A L S L V D T L I K I I W					
181/61	ATC GTT AAC GAT GTC AAG CTG CTC GGT CAA	211/71	GCG CCC AAC CTA CTC GTG TCT GGT CTC ACG	241/81	GGC GGA GGT TTA GAT GAC CGA AAG CTC CTG
I V N D V K L L G Q A P N L L V S G L T T G G L T					
271/91	CTC GAG CAG ATT GTC ACT CTG CTC GCC AGC	301/101	ATG CCC GTC TCT TCT AAT ATC AGC CGA ACT	331/111	CTA TCA GAC ACC TTG ATC AAG ATC ATT TGG
L E Q I V T L L A S M P V S S N I S R T L S D T L I K I I W					
361/121	GGC GAT CTG CCA CAT CCA GCC GTC TCC TTC	391/131	ATG GGT TCC GAG CAT CGC TTT CGA CGC CCC	421/141	GAT GGC TCT GAC AAC AAT GTC ATG AGT CCC
G D L P H P A V S F M G S E H R F R R P P D G S D N N V M S P					
451/151	AAG CTC GGT GCA TCA GGC CAG CCC TAC TCG	481/161	CGC AAC GTC CAG CGC ATG CAG CCG CAG CAG	511/171	GTC AAC CTA CCA GAC CCC GGC ACT GTT TAC
K L G A S A Q L Y R N V F V S S N I S R T L S D T L I K I I W					
541/181	GAC CTC CTC CTA GCA CGA GAC AGC TTT GAA	571/191	CCT CAC CCG ACT GGC ATC AGC TCA CTG CTG	601/201	TTT GCC AAC ATT ATC ATT CAC GAC
D L L L A R D S F E P H P T G I S S L L F N F A N I I I H D					
631/211	ATC TTT TCC ACC ACC CGA CAG CCA GGC GCA	661/221	CAT TCG GCG TAC AAC GAG CAC TCA TCT TAT	691/231	CTC GAC TTG CAG GTG GTC TAC GGT GCC AAT
I F Q I V T L L A S M P V S S N I S R T L S D T L I K I I W					
721/241	CAA GAA GAG CAA AGG CGT GTG CGC ACG GGC	751/251	ACG CTC GGC CTT CTC AAG GCT GAT GCC GTC	781/261	GGC GAC TGG CGT ATG GCC ATG ATG CCG CCC
Q E E Q R R V R T G T L G L L K A D A V G D W R M A M M P P					
811/271	GCA ACG GCC GCA CTC GCA GTG CTG TTC AGT	841/281	CGT AAC CAC AAC TTC ATC GCC AAG CGC CTC	871/291	TAC GAG GTC AAT GAA AAC CAC CGT TTT GAC
A T A S A V L A Q L Y R N V F V S S N I S R T L S D T L I K I I W					
901/301	GAT CTC GAA GGT GAG CCG CTT GAT GAG GAG	931/311	CTG TTT GGC ATT GCA CGT CTG GTC AAC TGC	961/321	GGC CTC TTC CTG CAT ATT ATC CTA CGT GAC
D L E G E P L D E E L F G I A R L V N C G L F L H I I L R D					
991/331	TAT ATT CCA GTC ATT CTC AAC ACC AAC GAC	1021/341	TCG GAA TGG TTT GTC GAC CCC TTG AAC GTG	1051/351	ATC AAG GGT GTC GGC GGA CCA GGT GCT CTT
Y I P L E S A A V S S N I S R T L S D T L I K I I W					
1081/361	GAA CGT GGC ATT GGT AAT TCC GTC GCT GCC	1111/371	GAG TTC TCG ATT CTC TAC CGA TGG CAC GCA	1141/381	GCT GTG TCG CAG AAC GAC GAA AAG TGG ATG
E R G I G N S V A A E F S I L Y R W H A A V S Q N D E K W M					
1171/391	AAC GAC TTC CTC GAA TCT CAG TTT CCC GGC	1201/401	AAG AGA CCT GAA GAT GTG GGT CCC AGA GAG	1231/411	TTC GTC GAA GCA GCC GCG GTC AAC GTC
N D F L E S Q L K R P E D V G P R E F V E A A A G C G C L A A V					
1261/421	TCT TTC CTT GAC ACG GAT CCG AGC GAG TGG	1291/431	AAC CTT CAT GGC TGG GAG CGC GAC GCC CAG	1321/441	GGC AAG TTC GAC GAT GGA TTG CTA GCA CAG
S F L D T D P S E W N L H G W E R D A Q G K F D D G L L A Q					
1351/451	GTC ATC AAG GAT GCC GTG TCG GAC VTG GCT	1381/461	GCA GCT TTC CGT GCT CGT GGA CAT CCC AGC	1411/471	TGG TTC CGT CCC ATC GAA ATC CTC GGC ATG
V I K D A V S A A F T A A A P R A R C S W F R P I E I L G M					
1441/481	ATC ACG GCT CGC AAG GAT TGG GCT ATG TGC	1471/491	ACC ATG AAC GAG TTC CGA CAC TTT TTG GGC	1501/501	CTC AAG ACC TAT TCT TCG TTC AGC GAG TGG
I T A R R K D W A M C T M N E F R H F L G L K T Y S S F S E W					
1531/511	AAT CCT GAT CCC AGA ATT TCG AAG GCA GCG	1561/521	GAG ATG CTC TAC GGC GAC ATT GAC AAT CTC	1591/531	GAG CTC TAT CCT GGC CTG ATG GCG GAA GAG
N P D P R I S K R A E M L Y D N L E L Y P G L M A A L T R G					
1621/541	GCC AAG CCC AGT ATC CCT GGA AGT GGT CTC	1651/551	TGC CCC GGT TAC ACC ATC TCG CGA GGA ATT	1681/561	CTC AGC GAC GCT GCT GCC CTG ACC CGC GGC
A K P S I P G S G L C P G Y T I S R G I L S D A A A L T R G					
1711/571	GAC CGC TTC TAC ACG AAC GAC TTT TCG ACG	1741/581	TCC AAT CTG ACG AGC GCC GGC TAT GAG TAC	1771/591	TGC ACC ACA CCT CAG CCT GC AGT CAC GGC
D R F Y T N D N G T S N L T S A A G Y E Y I N T L N V M K N R S V S H G					
1801/601	ATG ATG GGC AAG CTC ATC ATG GCT ACG CTA	1831/611	CCT GGT CAG TTC CCG TAC AAC TCG ATC TAT	1861/621	GCG CTC TAC CCC TTC CGC GTG CCC GAG AAG
M M G K L I M A T L P G Q F P Y N S I Y A L Y P F R V P E K					
1891/631	ACC ATC GAA ATG CTC AAG GGC AAG CGT GTG	1921/641	ATC GAG CAC TAC GAC ACA GCT TAC CCT CGC	1951/651	CCT GCT CGC CGA TGG TAC GCC ATT GAA TCG
T I E M L K G R V I E H Y D T A C P A R R W Y P A R R W Y P E S					
1981/661	TAT TCA GCG AGC AAG GAC ATT CTG GAA GAC	2011/671	AGC CGA TAC TTT ACT GCG CTG CCA CCC ATG	2041/681	TCG TAT GAC GAG AGC CTG ATG TCC TCG GCG
Y S A S K D I L E D S R Y F T A L P P M S Y D E S L M S S A					
2071/691	CTA GCC TCA ATT CCA CGT TGG CAA GAT GAA	2101/701	GTG ACG GAC TTC TAC AGC ATC AAC ACC CTC	2131/711	AAT GTG ATG AAG AAT CGA AGC GTC TCG TTT
L A S I P R W R D E V T D F Y S A I N T L N V M K N R S V S F					
2161/721	TCG CCT ACG GGT CGT CAG CGC ATC GTT GAT	2191/731	CTG CTC GAG GTT GTC AAC ACG GTC TCG GCT	2221/741	CAG TTC ACG TCG AAG CTC TTT GCG CTG CCC
S P T G R Q R I V D L L E V V N T V S A Q F T S K L F A L P					
2251/751	ACG CCT GGC AGT CAT GGC CTG CAT CTC GGC	2281/761	ATG TCG CCC GAT GAG CTC TCC TCG GCA CTT	2311/771	GCC AAG CCT CTC GCC TAC GCC ATG TAT GGC
T P G S H G L H C M S P D E L S A L A K P L A A K P L A A M Y G					
2341/781	TCG TTT GAC TTC CAG GGT CAT CAG ACA TGG	2371/791	CAG CTC GAG GAG GAG TCC GAA GCT TGC ACG	2401/801	CGT CGT CTC AAG ACG CTT CTT TGG GCA CGT
S F D F Q G H Q T W Q L E E E S E A C T R R L K T L L W A R					
2431/811	CTT CAC ACG GTG GAC GGC ATT CTG TCG CCC	2461/821	GTG TTT GCT CTT GTG CAG AAC ATA TCA AAC	2491/831	ATT GTC GGT GGC CCC GGC AAC CTT GCT GCT
L H T V D G I L S P V F A L V Q N I S N I V I V G P G Y A A A					
2521/841	AAC GGC ATG GCT AGG CAC TTC TAC CAC ACG	2551/851	ATC TTT GCT TCA GGA AAG AGC AAC GAC GAG	2581/861	CTC GTC AAA GAC TGC CTG CAC ATG ATG GTG
N G M A R H F Y H T I F A S G K S N D E L V K D C L H M M V					
2611/871	TCG CTG ACG GCA ACG CAC TCG CTT GTA CTC	2641/881	ATG CAG GCG TTT AAA TGG TTC TTC CAG GAG	2671/891	GAG AAT GCC GAG CAC CTT TCG GTC ATG TAC
S L T A T H S L V L M Q A F K W F T C E E N A E H L S V M Y					
2701/901	CAG CTG GCC CAG AAG AAC GAC CCT GTC TCA	2731/911	AAT GCT GAG CTG CGC CAC CGC ATT ATG GAG	2761/921	GCT TAC CGA CTC AAC AGC ATC ACC CCG CCG
Q L A Q K N D P V S N A E L R H R I M E A Y R L N S I T P P					
2791/931	CAA GCC AAG TTT GCG CTC CAG GCG GTG GCT	2821/941	CTC CCC GAT GTG GTC GCA AAC AAG GTG TAC	2851/951	GTG CAA GTG GGC GAC GGC GTT TAC ATT TCC
Q A K F A L Q A V A L P D V V A N K V Y V Q V G D G V Y I S					
2881/961	CCT TCG GCT CTG TAC CGC GAT CCA AAG CTA	2911/971	TCG AAC GAT CCC GAG CGT TTT AAC CCG AGC	2941/981	AGC AAG GCG CCC GTC CGT CTT GGT CTC GGC
P S A L Y R D P K L S N D P E R F N P S S K A P V R L G L G					
2971/991	GAT GCA CCC AGC CAG TCG ATT CTC GAA ATT	3001/1001	GCC CTT CPT GCC ATT GCT AAG CAG TTC TTC	3031/1011	AAG CAC AAC GGT CTT CGC TTG GCT CCT GCT
D A P S Q S I A L P A L V A F K H N G L R L S A A P A					
3061/1021	GGT CCA CCT CCT GTT GTC AAC GAT GCG GGT	3091/1031	CCG ACT CCC AAC CAG AAG TTA CCC TAC TTT	3121/1041	ATC AGT AAC CAT GGC GCC GAG TAC CCG CTT
G E P P P V V N D A G P T P N Q K L P Y F I S N H G A E Y P L					
3151/1051	CCC ATT GAC ACC TCT ATG CAC GTC ATC TAC	3181/1061	GAG GCC CGC TGA		
P I D T S M H V I Y E A R *					

Abb. 6: Aminosäure- und Nukleotidsequenz des Ssp1-Proteins bzw. des *ssp1*-Gens. Die Positionen der Aminosäuren und Nukleotide sind angegeben. Die Sequenzen der isolierten Peptide Lys-C1, Lys-C1, Lys-C1 und Lys-C1 sind grau hinterlegt.

Nach Durchmusterung der Phagenbank mit radioaktiv markierten Sonden aus dem offenen Leserahmen von *ssp1* (M&M) wurden aus ca. 100.000 Phagenplaques ca. 20 Plaques, die nach der Hybridisierung ein Signal zeigten, reisoliert und die Durchmusterung mit diesen Klonen wiederholt. Schlussendlich wurde aus sieben Klonen Phagen-DNA präpariert (die einzelnen Schritte sind in „M&M“ beschrieben). Die in den Phagen enthaltenen *U. maydis* cDNA-Fragmente wurden als *EcoRI*-Fragmente reisoliert und in den Vektor pTZ18R kloniert (M&M). Das Plasmid pSH12-2 (M&M) beinhaltet das größte isolierte cDNA-Fragment mit einer Länge von 2023 bp. Die Sequenzanalyse ergab, dass die isolierte cDNA den Bereich von Position +1169 in *ssp1* bis zum Stop-Codon an Position +3192 überspannte und identisch mit der genomischen Sequenz war. Die Polyadenylierungsstelle konnte 183 bp nach dem Stop-Codon identifiziert werden.

Die Durchmusterung der cDNA-Bank zeigte, dass es im diploiden Stamm FBD11 zu einer Transkription des *ssp1*-Gens kommt. Da FBD11 durch die Protoplastenfusion zweier haploider Stämme entstanden ist (Banuett und Herskowitz, 1989), ist dies ein erster Hinweis darauf, dass *ssp1* nicht nur in den reifen Sporen, sondern auch in Sporidien exprimiert wird.

2.3 Das Ssp1-Protein besitzt Ähnlichkeit mit Linoleat-Diol-Synthase aus *Gaeumannomyces graminis* und Prostaglandin-G/H-Synthasen aus Säugern

In öffentlichen Datenbanken wurde unter Verwendung des Programms „Blast2“ (Altschul et al., 1990) nach zu *ssp1* ähnlichen Genen oder Genprodukten anderer Organismen gesucht. Dabei zeigt das Protein Linoleat-Diol-Synthase (LDS) aus *Gaeumannomyces graminis* (blast e^{-118} ; 33% Identität und 50% Ähnlichkeit über die Aminosäureposition 74 bis 785 in Ssp1) (Hornsten et al., 1999). Ferner existiert Ähnlichkeit zu zwei potentiellen offenen Leserahmen aus der genomischen Sequenz von *Neurospora crassa* (Sequencecontig 1.73 (Supercontig 9), e^{-121} , 33% Identität, 48% Ähnlichkeit Sequencecontig 1.951 (Supercontig 137), $2e^{-35}$, 33% Identität, 53% Ähnlichkeit, über den Bereich von Aminosäureposition 120 bis 710 in Ssp1). Des Weiteren finden sich Homologien zu Cyclooxygenase-1 aus Ratte (e^{-09} , 24% Identität und 35% Ähnlichkeit über die Aminosäurepositionen 173 bis 543 in Ssp1) (Feng et al., 1993) und zu humaner Prostaglandin G/H Synthase 2 ($4e^{-09}$, 22% Identität und 34% Ähnlichkeit über die Aminosäurepositionen 173 bis 543 in Ssp1) (Kosaka et al., 1994) (Abb. 7). Sowohl Linoleat-Diol-Synthase wie auch Prostaglandin-G/H-Synthasen sind hämhaltige Enzyme, die ungesättigte Fettsäuren oxygenieren (Su et al., 1998; Smith et al., 1996). Konservierte Aminosäurepositionen in Linoleat-Diol-Synthase wie Histidin 203 und Histidin 379, den postulierten Häm-Liganden, oder Tyrosin 376 (Hornsten et al., 1999) sind ebenfalls in Ssp1, Nc1.73 und Nc1.951 vorhanden.

Ssp1	83	GLDDRKLLLEQIVTLLASMEVSSNISRTLLSDTLIKIITWGDLPHPAVSFMGSEHRFRFRPDGSDNNVMSPKLGAS
LDS	75	VNDDQOFLLEKMIQLLAKLPPASREGKLLDGLINDLWDSLDHPPVASLGGKGFSPREPDSNNIHLPSLGA
Nc1.73	145	LADDKTMIMKVIQIVSNLLESNKSLRVELTNGFLGELWYTLLEHPPSYVGEYQYRKADGSCNNIMFPQLGAA
Nc1.951	95	YLKERRLDIKAGASLLAVSNNISVARADIIIEQVKIKYDRMLHPPLSYLGDFAFKYRTADGKFNISAINBHLGQA
<hr/>		
Ssp1	156	GQPYSRNVRQRMQPOOVNLPDPTGVYDITLLAR--DSFEPHPTGISSLTFNFANIITIHDFISITROPGAHSAYNE
LDS	148	NTPYARSTKPLVFNPNPDPATIFDITLMVRDPAKFRPHFNKISSMLFYLATIITIHDFISITSPR---FNINL
Nc1.73	218	GTTIYARSVRPNVIRQALPDPELIFDSVMKR--TEYKSHENNVSSITLWYWASITIIHDLIFWTDYRD---MSKSK
Nc1.951	168	GAPYAKTVPKATHPLGALPDEGDIFDCLMARE--ENGRFSQSGLISSMLTYHATITIIHDLIFRINDND---KNISD
<hr/>		
Ssp1	227	HSSYLDLQVYGANQEEQRVRR--TGTLLGLKADAVGDWRMAMMPFATAALAVLFSRNHNFIAKRLIYEVNENH
LDS	218	TSSYLDLSPLYGRNHDEQMAVR--TGKDGLLKEDTFSSKRVIGFPPGVGAFILMFNRFHNWVVTQIAKINEGG
Nc1.73	286	TSSYLDLSPLYGSMQDMQDTIR--TFKDKGLKLVDCYADKRLLGMPPGVSVLLIIFNRFHNWVTCDNLIATINEDG
Nc1.951	237	TSSYLDLSPLYGFTTEEMQRKVRDEYVGLGLLKEDTFEAEDRLLRQPPGVCIIMLVMYNRYHNVAATQIRINENG
<hr/>		
Ssp1	298	RFDDLEG-----E--PLDEELFGIARTVNCGLFLHITILRDYIPVILNTN--DSEWFDPLN-VIKGVGG
LDS	289	RFKRFTT---PDDTAGMETYDNSLFCITGRLLTFCGLYINIVLGDYVRIITLNLNRANTITWNLDPRTKEGKSLLS
Nc1.73	357	RFNKPSPKLEGEKAAEAWKKYDNDLFCIARLITSGLYINITLIDYVRNIVNLRVDTTITWLDPRADTGIDVGT
Nc1.951	310	RFSVREYR-EANYDAWKKLDDDLHHTARLITCGLYIQVSVHDIYLRALMGFHYQYDITNFILDRV---N-QSE
<hr/>		
Ssp1	357	PGALERIGIGNVAAEFSLIYRWHAAVSQNDEKWMNDFLESQEPGKRPEEDVGPREFVEAAAQLKVSFLDTPSE
LDS	358	KP-TPEAVGNQVSVFENLTYRWHCITSERDDKWTNAMREALGGQDPAT-AKMEVMRALGMFEKKNIPDEPEK
Nc1.73	430	KDGAERGTGNVSAEFNLQYRWHSICISAKDEAWIEDDFYIELFG--KFGSDLSFHELMGKFGFEGGPADEPAD
Nc1.951	378	AKEVSRGLGNQVTFEFLNLYRFHCATISRGDEYLENYLDEYFEKHSRSDWNPKEMGLQEFMEMG-----QA
<hr/>		
Ssp1	430	WNL---HG-WERDAQGKFDGGLLAQVIKDAVSDVAAAFRARGHPSWFRPIEILGMITARKDWMAMCTMNEFRHF
LDS	429	RTL---AG-LTROSDFGDDTELVKILQESIIEVAGAFGNHVPACMRATEIILGIKQSRIT-WNVATLNEFRQF
Nc1.73	501	RPIRKDKGHFSRDANGKISDELAEICADAIIEEAFAGSFGAKNVPPSMRAVEILGITQCRK--WNLAGLNEFRKH
Nc1.951	445	RER-----RKNDDPPVKPS-----NFGPRNVPRSLKAVEVMGILQARK-WGVGTLNDFRFF
<hr/>		
Ssp1	499	LGLTYSSFSSEWNPDPRISSKAAMELYGDIDNLELYPGLMAEAK-PSIPGSGLCQGYTISRGLSDAAALIRG
LDS	497	IGLTPHDSFYHMPDPKICKILLAQMYDSDPAVELYPGIMAAEAKPPFSPGSGLCQFPYTTISRALLSDAVSLVRG
Nc1.73	573	FGLRKYETTFEDINSDPGVSEALRRLYDHPDFVELYPGIVAEHKSSEMPVGVGIAPTYTISRVLSDAVLVRG
Nc1.951	494	FGMKRHTTFESVSGCDEVQNALRDLYEHPDKIEFYPGVFCESDASQADPGPSDVSALWAALIFSDAITLVRG
<hr/>		
Ssp1	571	DRFYTNDFFSTSNLTSAGYEYCTTTPGSHGMMG-KIIMATLPGQFPYNSIYALYFFRVPEKTIEMLKGRVIE
LDS	570	DRFYTVDYTPRNTINWGFNEASTDKAVDWGHVLYKLFRRAFPNNHFLPNSVYAHFFVVPSENKLIFEGLGAAN
Nc1.73	646	DRFYTIDYNPRLNTNMGYNEVQYDLNLKKGCVFYKLFMRALPNHFKENSVYAHYFVMTVAENKKILTDLKRDH
Nc1.951	567	DRFYTLDWNTNSLTSWGMKEVTPDNDVLKSSVFHRLLRSSFFEWFPSTSVRFHFHYTAQRNAEYATAQGYDK
<hr/>		
Ssp1	643	HYDTAYP-APARRWYAIESYSASKDILLESRY-----FTALP-----P--MSYDESL
LDS	643	KYSWDEPKARAP-IQFIRSHKAVLEVLSNQKD-----YKVTWGPALKMLSGDPATSFALAGDEP-ANAASRHH
Nc1.73	719	LFDWARP-TRQPKPHQVKTHAGAQHVLVNDKKEGTSGAYMSSWHAGLESLLGKP-----LSNNPDAHDSQRD
Nc1.951	640	DFAIKPTVEKSE--RNWSPATVTQTFFDTSAS-----NPRKPVQPKILTDE-----RQ--IMEVLNDDTNI
<hr/>		
Ssp1	687	MSSALASIPRMQDEVTDYYSINTLVNMKNRSVSFSPTGR---QRIVDLLEVWVNTVSAQFTSKLFAALPTPGSH
LDS	709	VIAALTAPKQWRDEVRRFYEVTTTRDLLRRHGAPVHVGAGPRTHEVDVIRDVIGLAHARFMASLFSPLKKEEG
Nc1.73	786	IHEQLYS-ABWADQVKAFFAQTTDALL---AGESYNVGG---HLLVLDLVRDVGNIVPTLFAAKVFEISLQTKN
Nc1.951	697	VHPVRLEPEILPAKVAEVLAVREQEDTAD-GRKSHGEHR---KEIDTDTDLMTYFTDLMRDIIRRESVVMKPP
<hr/>		
Ssp1	756	GLHLGMSPELSSALAKPLAYAMYGSFDFQ
LDS	782	KEEGAYGEHELYSRLVTIFAIFW---DSD
Nc1.73	852	NTNGLYTPQELVAVLAVIFAIFY---DHD
Nc1.951	766	GQRNSEVDPIYQLDVTREFAVPVVTRYVAD

Abb. 7: Vergleich der Sequenzähnlichkeiten von Ssp1, Linoleat-Diol-Synthase (LDS, *Gaeumannomyces graminis*) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz zweier potentiellen offener Leserahmen aus *Neurospora crassa* (Nc1.73 und Nc1.951) auf Proteinebene. Angegeben ist die Ssp1-Proteinsequenz von Aminosäureposition 83 bis 785 sowie die dazu ähnlichen Proteinsequenzen von LDS, Nc1.73 und Nc1.951. Identische Aminosäuren sind mit einem Kasten versehen, ähnliche sind grau hinterlegt. Die zu Cyclooxygenasen bzw. Prostaglandinsynthasen aus Säugern ähnlichen Bereiche der Ssp1-Sequenz sind durch Balken gekennzeichnet. Konservierte Aminosäurepositionen der LDS wie Histidin 203, Histidin 379 oder Tyrosin 376 sind eingezeichnet.

2.4 Herstellung und Analyse *ssp1*-defizienter *Ustilago maydis* Stämme

2.4.1 Konstruktion von *ssp1*-Deletionsstämmen

Um Hinweise auf die Funktion des Ssp1-Proteins zu erhalten, wurden *ssp1*-defiziente Stämme hergestellt.

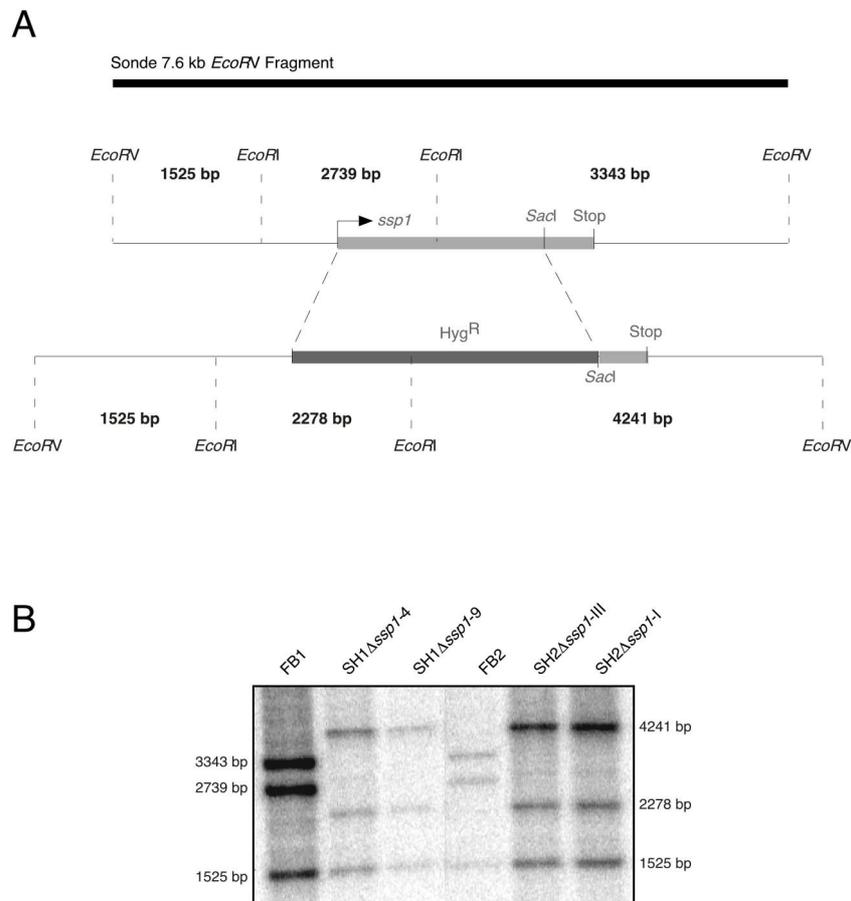


Abb. 8: Schematische Darstellung der Konstruktion von *ssp1*-Deletionsstämmen. **A.** Schematische Darstellung des *ssp1*-Locus vor und nach der Insertion des Deletionskonstrukts. Die Position der Restriktionsschnittstellen und die Fragmentgrößen sind angegeben. *ssp1* symbolisiert das *ssp1*-Gen, Hyg^{R} die Hygromycin-B Resistenzkassette und Stop die Position des Stop-Codons. Der Balken markiert das als radioaktiv markierte Sonde verwendete 7.6 kb-*EcoRV* Fragment. **B.** Für Southern Analysen wurde genomische DNA der erhaltenen Transformanten und ihrer Ausgangsstämme FB1 und FB2 isoliert, mit *EcoRI* und *EcoRV* restringiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten 7.6 kb *EcoRV*-Fragment aus dem Vektor pSH4 (M&M), welches den offenen Leserahmen von *ssp1* sowie die flankierenden 5'- und 3'-Bereiche beinhaltet, ergaben sich nach Exposition der Membran für die Transformanten SH1 Δ *ssp1*-4 (*a1 b1*, *ssp1*:: Hyg^{R}), SH1 Δ *ssp1*-9 (*a1 b1*, *ssp1*:: Hyg^{R}), SH2 Δ *ssp1*-III (*a2 b2*, *ssp1*:: Hyg^{R}) und SH2 Δ *ssp1*-I (*a2 b2*, *ssp1*:: Hyg^{R}) die bei korrekter Integration des Plasmids erwarteten Signale für Banden von 4241 bp, 2278 bp und 1525 bp. Die Ausgangsstämme FB1 und FB2 zeigten die dem Wildtyp-*ssp1*-Locus entsprechenden Fragmentgrößen von 3343 bp, 2739 bp und 1525 bp.

Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pSH13 Δ *ssp1* konstruiert (M&M), in dem der offene Leserahmen des *ssp1*-Gens von Position +1 (ATG) bis zu einer *SacI*-Restriktionsschnittstelle an Position +2575 durch die Hygromycin-B Resistenzkassette ersetzt wurde (Abb. 8 A), und in die haploiden Wildtypstämme FB1 und FB2 transformiert. Um die homologe Integration des Deletionskonstrukts nachzuweisen, wurde von den erhaltenen Transformanten DNA isoliert und Southern Analysen durchgeführt (Abb. 8 B). In den FB1-Derivaten SH1 Δ *ssp1*-4 und SH1 Δ *ssp1*-9 sowie in den FB2-Derivaten SH2 Δ *ssp1*-III und SH2 Δ *ssp1*-I war das endogene *ssp1*-Gen durch die Hygromycin-B Resistenzkassette ersetzt worden.

2.4.2 *ssp1*-Deletionsstämme sind pathogen und können Teliosporen bilden

Als Nächstes wurde eine funktionelle Charakterisierung der *ssp1*-Deletionsmutanten SH1 Δ *ssp1*-4, SH1 Δ *ssp1*-9, SH2 Δ *ssp1*-III und SH2 Δ *ssp1*-I vorgenommen. Ein Vergleich von Kolonimorphologie und Wachstum eines Vereinzlungsausstrichs der genannten Mutanten mit ihren Ausgangsstämmen FB1 und FB2 nach Kultivierung auf PD-Festmedium zeigte keine Unterschiede (nicht gezeigt). Ebenso ergab die mikroskopische Analyse haploider Sporidien *ssp1*-defizienter Stämme nach Kultivierung in YEPS_{light}- oder in PD-Flüssigmedium keine Veränderung der zigarrenförmigen Zellmorphologie (nicht gezeigt). Auch in ihrem Kreuzungsverhalten unterschieden sich die *ssp1*-defizienten Stämme nicht von ihren Ausgangsstämmen (Abb. 9 A; M&M).

Um einen möglichen Einfluss der *ssp1*-Deletion auf Pathogenität und Teliosporenentwicklung zu untersuchen, wurden kompatible Kreuzungen der *ssp1*-Deletionsmutanten sowie ihrer Ausgangsstämme in 14 Tage alte Maispflanzen der Varietät „Early Golden Bantam“ durch Spritzinfektion inokuliert (M&M). Infektionen der Kreuzungen SH1 Δ *ssp1*-4 x SH2 Δ *ssp1*-I sowie SH1 Δ *ssp1*-9 x SH2 Δ *ssp1*-III führen zu normaler Tumorbildung (Tabelle 2). Die entstandenen Tumore unterschieden sich weder in Morphologie noch Anzahl von den durch die Wildtyp-Kreuzung FB1 x FB2 induzierten Tumoren (nicht gezeigt). Überraschenderweise besaßen *ssp1*-Deletionsstämme keinen Defekt in der Ausbildung der Sporen, die bei lichtmikroskopischer Untersuchung keine offensichtliche morphologische Veränderung im Vergleich zum Wildtyp zeigten (nicht gezeigt).

Tabelle 2: Analyse der Pathogenität der *ssp1*-Deletionsmutanten. Angegeben sind die Anzahl der Pflanzen mit Tumorbildung (15dpi) im Verhältnis zur insgesamt infizierten Pflanzenmenge.

Inoculum	Tumorbildung	%
FB1/FB2	75/78	96%
SH1 Δ <i>ssp1</i> -4/SH2 Δ <i>ssp1</i> -I	83/77	92%
SH1 Δ <i>ssp1</i> -9/SH2 Δ <i>ssp1</i> -III	79/74	93%

Als nächstes wurde die mögliche Rolle von *Ssp1* im Keimungsprozess der diploiden Teliosporen untersucht. Zu diesem Zweck wurden aus den Infektionen FB1 x FB2 und SH1 Δ *ssp1*-4 x SH2 Δ *ssp1*-I stammende Teliosporen nach einer Behandlung mit 1.5% CuSO₄ auf PD-Festmedium (150 μ g/ml Ampicillin, 34 μ g/ml Chloramphenicol) plattiert, bei 28°C inkubiert und nach 16 bis 24 Stunden mikroskopiert (M&M). Δ *ssp1* Teliosporen zeigten weder im zeitlichen Ablauf des Keimungsprozesses noch in der Ausbildung der Keimungsstrukturen signifikante Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 9 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Deletion des *ssp1*-Gens weder morphologische Unterschiede noch Veränderungen im Kreuzungsverhalten, Pathogenität, Sporogenese oder Teliosporenkeimung in *U. maydis* bewirkt.

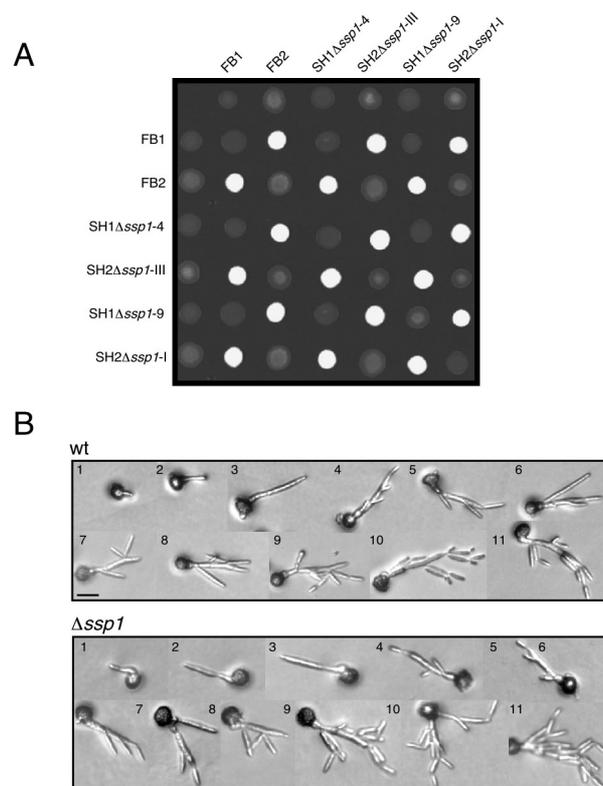


Abb. 9: Phänotypische Analyse der *ssp1*-Deletionsmutanten. **A.** Zur Analyse des Kreuzungsverhaltens wurden die oben aufgeführten *ssp1*-Deletionsmutanten sowie die Wildtypstämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) in PD-Flüssigmedium bis OD₆₀₀ 0.6. bis 0.8 kultiviert, einzeln oder jeweils Mischungen zweier unterschiedlicher Stämme auf aktivkohlehaltiges PD-Medium getropft und 24 h bei 28°C inkubiert. Kompatible Sporidien bilden nach erfolgreicher Fusion ein filamentös wachsendes Dikaryon, wobei ihnen das entstehende Luftmycel ein weißliches Aussehen verleiht. **B.** Teliosporen der Infektionen FB1/FB2 und SH1 Δ *ssp1*-4/SH2 Δ *ssp1*-I wurden auf PD-Festmedium plattiert und 16 h bei 28°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Sporenkeimung bis 24 h nach Inkubationsbeginn mikroskopisch verfolgt (DiC). Der obere Teil der Abbildung stellt die Keimung der Wildtypeliosporen, der untere Teil die Keimung *ssp1*-defizienter Teliosporen dar. Die Bilder 1, 2 und 3 zeigen jeweils die Ausbildung der Probasidie. Die Bilder 4 bis 11 zeigen den Entwicklungsprozess bis zur Abschnürung der haploiden Sporidien. Die Größenbalken entsprechen 10 μ m.

Weiterhin wurde untersucht, ob *ssp1*-defiziente Teliosporen eine größere Empfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen besitzen als die Sporen des Wildtyps. Als Maß dafür wurde die Rate der Keimfähigkeit gewählt. In diesem Zusammenhang wurde die Keimungsfähigkeit *ssp1*-defizienter Teliosporen nach UV-Bestrahlung, nach Inkubation mit organische Lösungsmitteln wie Methanol und Chloroform im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Zusätzlich wurde die Teliosporenkeimung von Wildtyp und Mutante in Abhängigkeit von unterschiedlichen Medien und Zuckerquellen untersucht und eine Segregationsanalyse der aus gekeimten Wildtyp- und Δ *ssp1*-Teliosporen erhaltenen Meioseprodukte durchgeführt. In keinem der angeführten Experimente konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Auf Grund ihres Umfangs werden diese Experimente im M&M aufgeführt.

Nach dem überraschenden Ergebnis, dass *ssp1*-defiziente Stämme keinen offensichtlichen Phänotyp besaßen, sollte überprüft werden, ob das identifizierte Gen *ssp1* für die 110 kDa Proteinbande aus Sporen kodiert. Hierfür wurden Proteinpräparationen aus wt- und Δ *ssp1*-Sporen hergestellt (M&M) und in einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Anfärben der Proteinbanden mit Coomassie-Brillinat-Blue war in den *ssp1*-defizienten Sporen im Vergleich zum Wildtyp keine prominente 110 kDa Bande mehr vorhanden (Abb. 10 A). Dies zeigt eindeutig, dass das isolierte Gen *ssp1* für die Ssp1 entsprechende Proteinbande kodiert.

Eine Aussage über die Ssp1-Proteinexpression während der vegetativen Phase von *U. maydis* sollte mit Hilfe einer Western Analyse getroffen werden. Zur Detektion des Ssp1-Proteins wurde ein polyklonales Anti-Ssp1-Serum hergestellt. Mit Hilfe des pET Expressionssystems (Novagene) wurde ein Fusionsprotein bestehend aus einem N-terminalen 6xHis-Epitop und der kompletten Ssp1-Sequenz in *E. coli* produziert, über eine Nickel-Sepharose Säule aufgereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (die detaillierte Vorgehensweise ist in M&M beschrieben). Für die folgende Western Analyse wurden parallel zum Wildtyp auch Proteinpräparationen haploider Sporidien und Teliosporen *ssp1*-defizienter Mutanten analysiert. Die SDS-löslichen Proteine der jeweiligen Pelletfraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels eines Elektrobloot-Verfahrens auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert (M&M). Für den immunologischen Nachweis des Ssp1-Proteins in der angestellten Western Analyse wurde das polyklonale Anti-Ssp1-Serum in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt (M&M). Haploide Sporidien des Stammes FB1 exprimieren eine geringe Menge des Ssp1-Proteins (Abb. 10 B; Spur 1), während in der Δ *ssp1*-Mutante erwartungsgemäß keine Bande zu detektieren ist (Abb. 10 B; Spur 2). Aus dem Vergleich der Signalstärken für Ssp1 zwischen haploiden Sporidien (Abb. 10 B; Spur 1) Teliosporen des Wildtyps (Abb. 10 B; Spur 3) wird der enorme Expressionsunterschied zwischen diesen beiden morphologischen Stadien deutlich. *ssp1*-defiziente Teliosporen (Abb. 10 B; Spur 4) zeigen kein Ssp1-Signal mehr. Zum

Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen wurde die Membran mit einem heterologen Anti-Tubulin-Antikörper inkubiert (M&M).

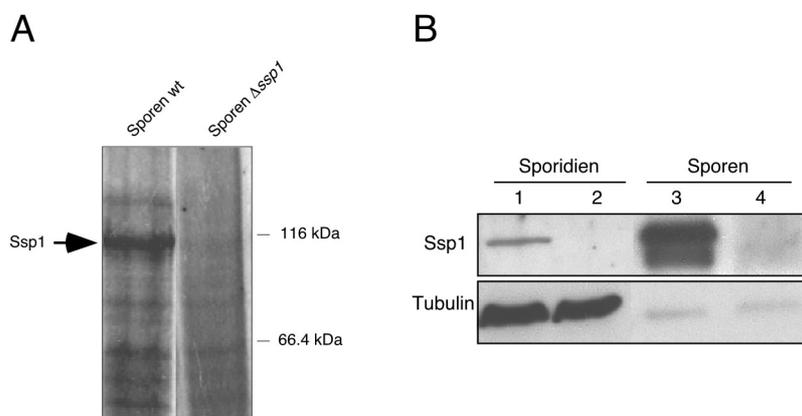


Abb. 10: A. Proteinexpressionsvergleich von wt- und Δ ssp1-Teliosporen. Die SDS-löslichen Proteine aus Teliosporen der Infektionen FB1/FB2 (wt, Spur 1) und SH1 Δ ssp1-4/SH2 Δ ssp1-III (Δ ssp1, Spur 2) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit einer Coomassie-Brilliant-Blue-R250 Lösung gefärbt. Der Pfeil kennzeichnet die Position der Ssp1 entsprechenden Bande. Molekulare Größenmarker sind angegeben. **B. Western Analyse der Ssp1-Expression.** Die Stämme FB1 (*a1 b1*) und SH1 Δ ssp1-4 (*a1 b1 ssp1::Hyg^R*) wurden in CM-Flüssigmedium bis $OD_{600} \sim 0.6$ kultiviert, in einer Dichte von $0.1 OD_{600}/cm^2$ auf aktivkohlehaltigem CM Medium ausgestrichen, für 48 h bei 28°C inkubiert und die Zellen anschließend für Protein-Präparationen geerntet. 1 g reife Teliosporen der Infektionen FB1/FB2 und SH1 Δ ssp1-4/SH2 Δ ssp1-III wurden aus getrockneten Pflanzentumoren isoliert. Nach dem Zellaufschluss wurden die SDS-löslichen Proteine aus der Pelletfraktion der jeweiligen Präparation auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Spur 1, FB1 Sporidien; Spur 2, SH1 Δ ssp1#4 Sporidien; Spur3, FB1/FB2 Teliosporen; Spur 4, SH1 Δ ssp1-4/SH2 Δ ssp1-III Teliosporen). Zur Detektion von Ssp1 wurde das polyklonale Anti-Ssp1-Serum in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Um die aufgetragenen Proteinmengen vergleichen zu können, wurde die Membran mit einem heterologen Anti-Tubulin-Antikörper inkubiert.

2.4.3 Die Überproduktion des Ssp1-Proteins in Sporidien und Präsporulationsstadien zeigt keinen phänotypischen Effekt

Da *ssp1*-Deletionsmutanten keinen ersichtlichen phänotypischen Defekt zeigten, sollten durch die Überproduktion des Ssp1 Proteins in Entwicklungsstadien, die normalerweise nur eine schwache bzw. keine Expression des Proteins zeigen, Hinweise auf eine mögliche Funktion erhalten werden. Zu diesem Zweck wurden die Stämme SH48 (*a1 b1 P_{otef}::ssp1*) und SH49 (*a2 b2 P_{otef}::ssp1*) hergestellt, in denen das endogene *ssp1*-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotors (Spellig et al., 1996) exprimiert wird (M&M; Abb.11 A). Die Funktionalität des *o2tef*-Promotors während der pathogenen Entwicklung des Pilzes *in planta* konnte in vorherigen Experimenten bereits gezeigt werden (Spellig et al., 1996; G. Weinzierl, pers. Mitteilung). Des Weiteren wurden die Stämme SH50 (*a1 b1 P_{crg1}::ssp1*) und SH51 (*a2 b2 P_{crg1}::ssp1*) konstruiert, die das *ssp1*-Gen im endogenen Locus unter der transkriptionellen Kontrolle des durch Glukose

reprimierbaren und mit Arabinose induzierbaren *U. maydis* *crg1*-Promotors (Bottin et al., 1996) enthalten (M&M; Abb. 11 A).

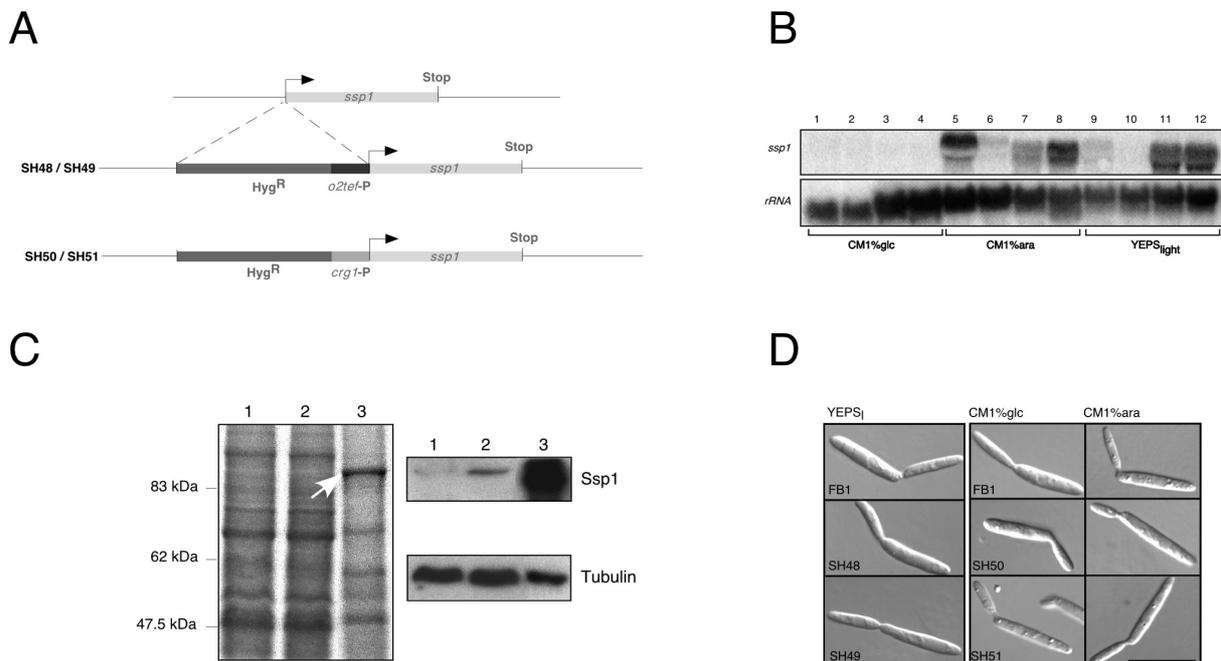


Abb. 11: Überproduktion des *ssp1*-Gens in haploiden Zellen. **A.** Schematische Darstellung der *ssp1*-Überproduktionsstämme SH48 (*a1 b1 P_{o2tef}:ssp1*), SH49 (*a2 b2 P_{o2tef}:ssp1*), SH50 (*a1 b1 P_{crg1}:ssp1*) und SH51 (*a2 b2 P_{crg1}:ssp1*). Die Konstruktion der Stämme ist „M&M“ zu entnehmen. *o2tef-P* symbolisiert den *o2tef*-Promotor, *crg1-P* den *crg1*-Promotor. *ssp1* steht für das *ssp1*-Gen, Hyg^R für die Hygromycin-B Resistenzkassette und Stop für die Position des *ssp1* Stop-Codons. **B.** Expressionsanalyse. Die Stämme SH50 und SH51 wurden in CM-glc bzw. in CM-ara Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 kultiviert. Die Stämme SH48 und SH49 wurden in YEPS_{light}-Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur RNA- und Proteinpräparation geerntet. Die Ausgangsstämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) dienen als Kontrolle. Reife Teliosporen aus einer FB1 x FB2-Infektion wurden aus getrockneten Tumoren isoliert. Für die Northern Analyse wurden jeweils ca. 25 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Zum Nachweis der *ssp1*-mRNA wurde ein 1091 bp *HpaI-BamHI* Fragment aus dem offenen Leserahmen von *ssp1* radioaktiv markiert und zur Hybridisierung eingesetzt. Zur Mengenkontrolle wurde die Membran mit einem für *U. maydis* 18S rRNA spezifischen Oligonukleotid hybridisiert. **C.** Für die biochemische Analyse wurden nach dem Zellaufschluss die SDS-löslichen Proteine der einzelnen Pelletfraktionen in einem SDS-Gel aufgetrennt (Spur 1, FB1 Pelletfraktion; Spur 2, SH48 Pelletfraktion; Spur 3, wt-Teliosporen Pelletfraktion). Die Proteine wurden durch eine Färbung mit einer Coomassie-R-250 Lösung im SDS-PA-Gel sichtbar gemacht. Die Ssp1-Proteinbande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der immunologische Nachweis erfolgte unter Verwendung des polyklonalen Anti-Ssp1-Serums (M&M). Um die aufgetragenen Proteinmengen vergleichen zu können, wurde die Membran mit einem heterologen Antikörper gegen *U. maydis* Tubulin inkubiert. **D.** Zur mikroskopischen Analyse wurden die Stämme SH48 und SH49 in YEPS_{light}-Flüssigmedium, SH50 und SH51 in CM-glc bzw. CM-ara Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 angezogen und anschließend lichtmikroskopisch untersucht (DiC). Als Kontrolle diente der Wildtypstamm FB1.

Um die Überexpression auf transkriptioneller Ebene nachzuprüfen, wurden Northern Analysen durchgeführt. Nach der Hybridisierung mit einer *ssp1*-spezifischen Sonde war in den Stämmen SH50 und SH51 unter reprimierenden Bedingungen kein *ssp1*-Transkript nachweisbar (Abb. 11 B; Spur 3 und 4), wogegen bei Kultivierung der Zellen in

arabinosehaltigem Medium die Expression von *sps1* induziert wurde (Abb. 11 B; Spur 7 und 8). Interessanterweise zeigte der Ausgangsstamme FB1 nach dem Wechsel der Zuckerquelle von Glucose zu Arabinose ebenfalls eine Induktion der *sps1*-Expression. Die Stärke der arabinoseinduzierten *sps1*-Expression in FB1 war vergleichbar mit der *sps1*-Transkriptmenge, die in SH50 unter Induktionsbedingungen erhalten wurde. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die vorhandene Zuckerquelle sowie vermutlich auch stammspezifische Unterschiede die Transkription des *sps1*-Promotors in haploiden Sporidien beeinflussen können. Interessanterweise konnte der Medieneffekt von Arabinose und Glucose auf die *sps1*-Transkription in haploiden Zellen nur nach Kultivierung in den entsprechenden Flüssigmedien und z. B. nicht auf aktivkohlehaltigen Festmedium beobachtet werden (nicht gezeigt).

In den *sps1* konstitutiv überexprimierenden Stämmen SH48 (*al b1 P_{o2tef}::sps1*) und SH49 (*a2 b2 P_{o2tef}::sps1*) (Abb. 10 B; Spur 11 und 12) konnte gegenüber ihren Ausgangsstämmen FB1 und FB2 (Abb. 11 B; Spur 9 und 10) eine um ein Vielfaches erhöhte Menge an *sps1*-mRNA nachgewiesen werden. In einer nachfolgenden Western Analyse unter Verwendung des polyklonalen Anti-Sps1-Antiserums (M&M) wurde in dem Stamm SH48 (Abb. 11 C; Spur 2) eine vier- bis fünffache Anreicherung der Sps1-Proteinmenge im Vergleich zur Wildtypsituation (Abb. 11 C; Spur 1) detektiert. Die Menge an Sps1-Protein in den Überproduzenten war im Vergleich zur Wildtypsituation in den reifen Teliosporen (Abb. 11 C; Spur 3) jedoch um ein Vielfaches geringer. Dies zeigt, dass in haploiden Sporidien selbst durch die Verwendung des *o2tef*-Promotors keine Sps1-Expressionsstärke wie in reifen Wildtyp-Sporen erzielt werden kann.

Die mikroskopische Untersuchung haploider Sporidien der Stämme SH48 und SH49 nach Kultivierung in YEPS_{light}-Flüssigmedium ergaben keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den Ausgangsstämmen. Auch haploide Sporidien der Stämme SH50 und SH51 zeigten nach Induktion der *sps1*-Expression keine Unterschiede zum nicht induzierten Zustand und zum Wildtyp (Abb. 11 D). Auch bezüglich ihres Wachstums- und Kreuzungsverhaltens, der Pathogenität und Morphologie von pilzlichen Präsporulationsstadien und Teliosporenbildung zeigten die Überproduktionsstämme keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (nicht gezeigt).

2.5 Analyse der *ssp1*-Expression während der pathogenen Entwicklung

2.5.1 Die *ssp1* Transkription wird im Tumor induziert

Da durch die vorhergehenden Experimente bekannt war, dass das Ssp1-Protein in haploiden Sporidien nur basal exprimiert wird, während es in Teliosporen zu den hoch exprimierten Proteinen zählt, sollte im Folgenden die Expression des *ssp1*-Gens während der pathogenen Entwicklung des Pilzes aufgeklärt werden. Northern Analysen von Tumormaterial der Wildtypinfektion FB1 x FB2 ergaben wie erwartet eine starke Induktion der *ssp1*-Transkription (16 dpi; Abb. 12, Spur 3). Haploide Sporidien der Stämme FB1 (Abb. 12, Spur 1) und (Abb. 12, Spur 2) exprimierten *ssp1* nach Kultivierung auf aktivkohlehaltigem CM-Festmedium (in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Western- und Northern Analysen) nur schwach.

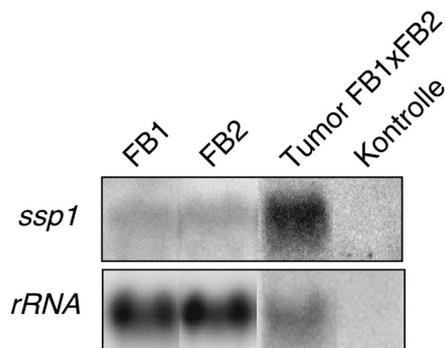


Abb. 12: Northern Analyse der *ssp1*-Transkription in haploiden Sporidien und Tumormaterial einer Wildtyp-Infektion. Die Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) wurden in CM-glc Flüssigmedium bis $OD_{600} \sim 0.6$ inkubiert, in einer Dichte von $0.1 OD_{600}/cm^2$ auf aktivkohlehaltigem CM-glc Festmedium ausgestrichen, für 24 h bei $28^\circ C$ kultiviert und die Zellen anschließend für RNA-Präparationen geerntet. Aus Tumormaterial einer FB1 x FB2 Infektion (16 dpi) in Maispflanzen der Varietät "G. Flint" wurde Gesamt-RNA isoliert. Für die Northern Analysen wurde jeweils ungefähr $25 \mu g$ Gesamt-RNA aufgetrennt (Spur 1, FB1; Spur 2, FB2; Spur 3; Tumor einer FB1 x FB2 Infektion; Spur 4 Pflanzenkontrolle). Eine gleiche Menge Gesamt-RNA uninfizierter Maispflanzen diente als Kontrolle für mögliche Kreuzhybridisierungen mit den verwendeten Sonden. Als *ssp1*-spezifische radioaktive Sonde wurde ein 1091 bp großes *HpaI-BamHI* Fragment aus dem offenen Leserahmen gewählt (M&M). Zum Vergleich der geladenen RNA Mengen wurde mit einer Sonde spezifisch für *U. maydis* 18S-rRNA Sonde hybridisiert (M&M).

2.5.2 Die Induktion der Ssp1-Expression erfolgt in der Teliospore

Um eine Aussage über die Ssp1-Expression während der pathogenen Entwicklung des Pilzes *in vivo* treffen zu können, wurde *ssp1* in den Stämmen FB1 und FB2 durch das Gen für grün fluoreszierendes Protein (eGFP) ersetzt und unter der Kontrolle des natürlichen *ssp1*-Promotors exprimiert (Abb. 13 A; M&M). Die kompatible Kreuzung aus dem so

entstandenen Reporterstamm SH2 (*a2 b2 Δssp1::eGFP*) mit FB1 (*a1 b1*) wurde in Maispflanzen der Varietät „Gaspar Flint“ inokuliert und die eGFP-Aktivität der Pilzzellen während unterschiedlicher morphologischer Stadien fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dafür wurden Schnittpräparate von Maisblättern und Tumorgewebe angefertigt (M&M). Eine intensive grüne Fluoreszenz konnte nur in reifen Teliosporen detektiert werden (Abb. 13 B; Bild 5). Weder Infektionshyphen (Abb. 13 B; Bild 2), sporogene Hyphen (Abb. 13 B; Bild 3) noch unreife Sporen (Abb. 13 B; Bild 4) zeigten eine Aktivität des Reporters. Die Fluoreszenz haploider Sporidien des Stammes SH2 lag unter dem Detektionslimit (Abb. 13 B; Bild 1). Als Kontrolle dienten haploide Sporidien und Pflanzeninfektionen der entsprechenden Ausgangsstämme. Diese mikroskopische Analyse zeigte eindeutig, dass die starke Expression von *Ssp1* ausschließlich in reifen Sporen stattfindet.

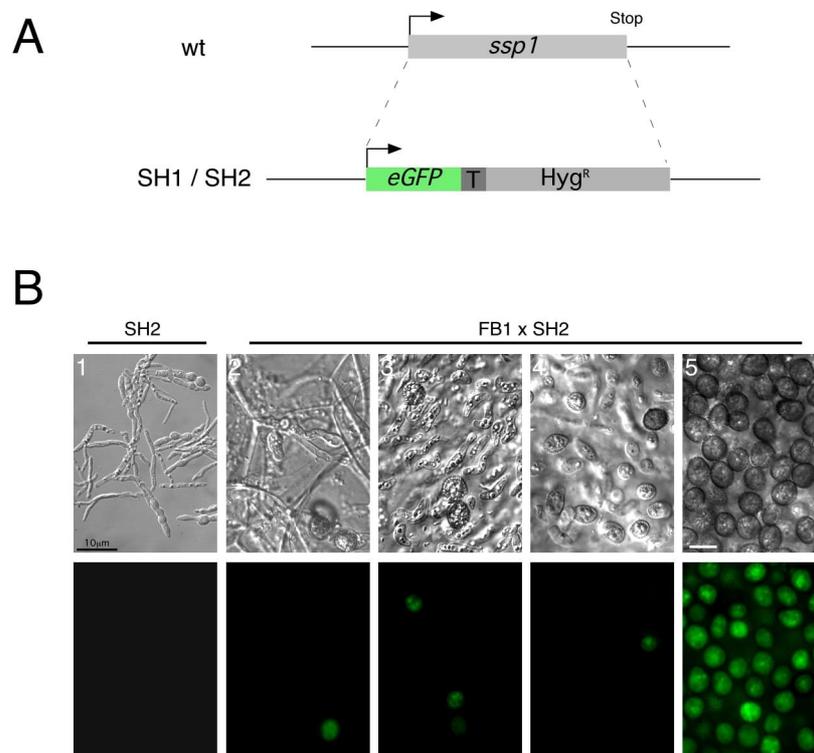


Abb. 13: Analyse der stadienspezifischen *Ssp1*-Expression unter Verwendung des eGFP-Reportersystems. **A:** Schematische Darstellung der Stämme SH1 (*a1 b1; Δssp1::eGFP*) und SH2 (*a2 b2; Δssp1::eGFP*), in dem der offene Leserahmen von *ssp1* nach homologer Rekombination komplett deletiert und durch das *eGFP*-Reportergen und die Hygromycin-B Resistenzkassette ersetzt wurde. **B:** Mikroskopische Analyse der eGFP-Reporteraktivität. Maispflanzen der Varietät „Gaspar Flint“ wurden mit der Kreuzung FB1 x SH2 infiziert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurden Schnittpräparate aus Pflanzenmaterial angefertigt und lichtmikroskopisch (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch (eGFP) untersucht (M&M). Der Stamm SH2 wurde in PD-Flüssigmedium bis $OD_{600} \sim 0.6$ kultiviert, die Zellen geerntet, auf aktivkohlehaltiges PD-Festmedium getropft, 36 h bei 28°C inkubiert und anschließend mikroskopiert. Größenbalken entsprechen 10 μm .

2.6 Regulation von *ssp1*

2.6.1 Identifizierung regulatorischer DNA-Sequenzen stromaufwärts des *ssp1*-Translationsstarts

Die *ssp1*-Expression wird zu einem definierten Entwicklungsschritt während der biotrophen Lebensphase des Pilzes induziert. Um in diese Regulation involvierte *cis*-aktive Sequenzelemente zu identifizieren, wurde eine Charakterisierung der stromaufwärts des *ssp1*-Translationsstarts liegenden Sequenzen mittels Deletionsanalysen vorgenommen. Da bei der Analyse der regulatorischen Sequenzen der *U. maydis* Gene *prf1* (Hartmann et al., 1999), *mig1* (Basse et al., 2000) und *dik6* (Weinzierl, 2001) Bereiche von ca. 2 kb stromaufwärts der jeweiligen Translationsstartpunkte für eine zur Wildtypsituation identische Genregulation ausreichend waren, wurde im Fall von *ssp1* der bereits sequenzierte Bereich von Position - 2589 bis +1 stromaufwärts des *ssp1*-Translationsstarts für die Promotorcharakterisierung ausgewählt. In diesem Bereich konnten keine offensichtlich proteinkodierenden Gene identifiziert werden.

Tabelle 3: Promotoranalyse

Stamm	Genotyp	Lage des verwendeten Fragments Relativ zum <i>ssp1</i> Translationsstart	Fragment
SH10	<i>a1b1</i> , P _A : <i>eGFP</i>	- 2589 bp bis +1 bp	A
SH11	<i>a2b2</i> , P _A : <i>eGFP</i>	- 2589 bp bis +1 bp	A
SH12	<i>a1b1</i> , P _D : <i>eGFP</i>	- 1655 bp bis +1 bp	D
SH13	<i>a2b2</i> , P _D : <i>eGFP</i>	- 1655 bp bis +1 bp	D
SH14	<i>a1b1</i> , P _E : <i>eGFP</i>	- 1062 bp bis +1 bp	E
SH15	<i>a2b2</i> , P _E : <i>eGFP</i>	- 1062 bp bis +1 bp	E
SH16	<i>a1b1</i> , P _F : <i>eGFP</i>	- 630 bp bis +1 bp	F
SH17	<i>a2b2</i> , P _F : <i>eGFP</i>	- 630 bp bis +1 bp	F
SH19-11	<i>a1b1</i> , P _B : <i>eGFP</i>	- 2143 bp bis +1 bp	B
SH20-18	<i>a2b2</i> , P _B : <i>eGFP</i>	- 2143 bp bis +1 bp	B
SH21-45	<i>a1b1</i> , P _C : <i>eGFP</i>	- 1869 bp bis +1 bp	C
SH22-63	<i>a2b2</i> , P _C : <i>eGFP</i>	- 1869 bp bis +1 bp	C
SH23-69	<i>a1b1</i> , P _G : <i>eGFP</i>	- 2589 bp bis -2143 bp, fusioniert an -1869 bp bis +1 bp	G
SH24-90	<i>a2b2</i> , P _G : <i>eGFP</i>	- 2589 bp bis -2143 bp, fusioniert an -1869 bp bis +1 bp	G

Verschieden große Fragmente des Promotorbereichs, beginnend am Start-Codon von *ssp1*, wurden an das *eGFP*-Reportergen fusioniert und ektopisch als singuläre Kopien in den *U. maydis ip*-Locus inseriert. (M&M, Tabelle 3 und Abb. 14 A).

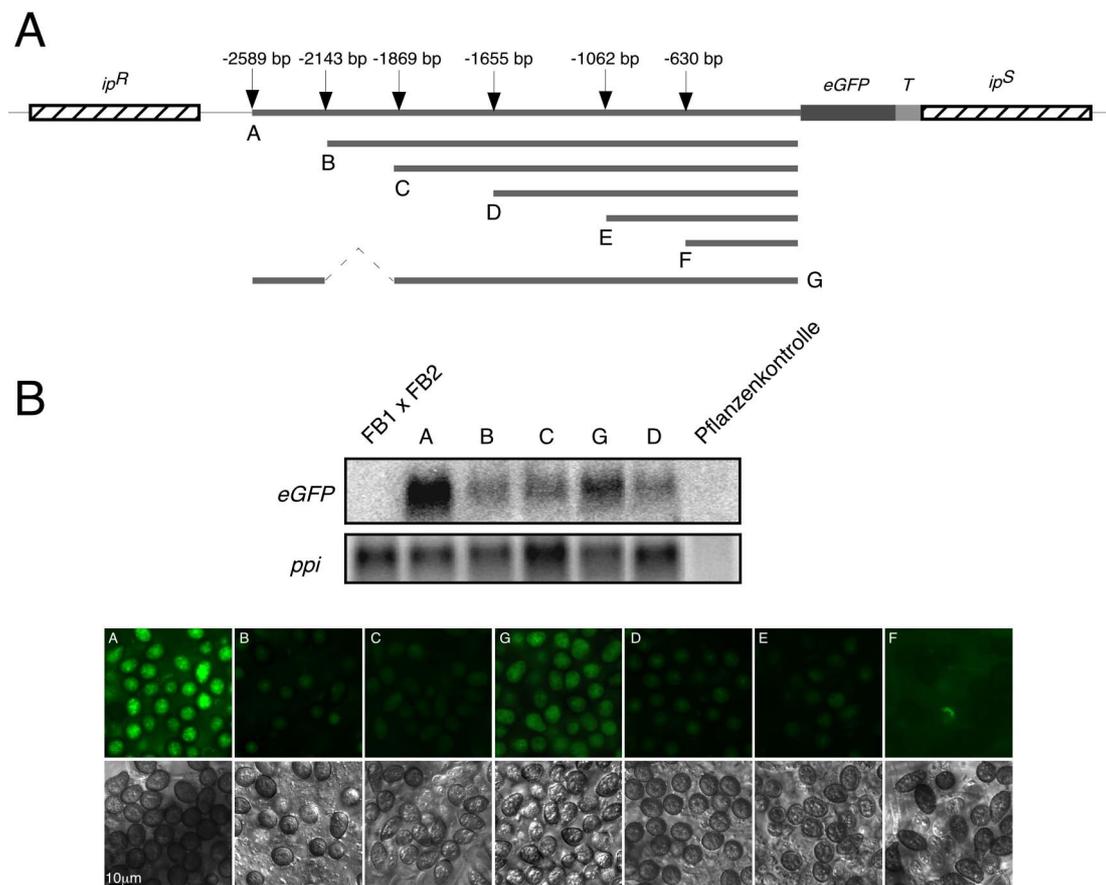


Abb. 14: Identifikation regulatorischer DNA-Sequenzen stromaufwärts des *ssp1*-Translationsstarts. **A.** Schematische Darstellung des *U. maydis ip*-Locus der *eGFP*-Reporterstämme: SH10 und SH11 (A), SH19-11 und SH20-18 (B), SH21-45 und SH22-65 (C), SH12 und SH13 (D), SH14 und SH15 (E), SH16 und SH17 (F) und SH23-69 und SH24-90 (G) (siehe Text und Tabelle). Die verschiedenen Fragmente aus dem 5'-Bereich von *ssp1* sind als graue Balken dargestellt. *ip^S* und *ip^R* symbolisiert die sogenannte Carboxin-Resistenzkassette (*ip* kodiert die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinatdehydrogenase in *U. maydis*, siehe Brachmann, 2001), *eGFP* das Gen für das grün fluoreszierende Protein eGFP und T den Terminator des *mfa2*-Gens. **B.** Für Northern Analysen wurde Gesamt-RNA aus Tumormaterial (15 dpi) der Wildtyp-Infektion FB1 x FB2 sowie der angeführten Kreuzungen der *eGFP*-Reporterstämme isoliert. Eine gleiche Menge Gesamt-RNA uninfizierter Maispflanzen diente als Kontrolle für mögliche Kreuzhybridisierungen der *eGFP*-spezifischen Sonde. Für die Northern Analysen wurde jeweils ungefähr 40 µg Gesamt-RNA aufgetrennt und die Membranen mit einer für *eGFP* spezifischen Sonde hybridisiert (M&M). Zur Mengenabschätzung des Anteils an geladener *U. maydis* RNA wurde mit einer für das konstitutiv exprimierte Gen *ppi* (Peptidyl Prolyl *cis, trans* Isomerase (Bohlmann, 1996) spezifischen Sonde hybridisiert. Zur mikroskopische Analyse der *eGFP*-Reporteraktivität wurden Maispflanzen der Varietät „Gaspar Flint“ mit den genannten Kreuzungen inokuliert. An verschiedenen Zeitpunkten wurden Schnittpräparate von Blättern und Tumoren angefertigt und lichtmikroskopisch (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch (eGFP) untersucht (M&M).

Um die transkriptionelle Aktivität der verschiedenen Fragmente aus dem stromaufwärts gelegenen Bereich des *ssp1*-Gens während der pathogenen Entwicklung des Pilzes zu untersuchen, wurden Maispflanzen mit kompatiblen, in Bezug auf das enthaltene *eGFP*-Reporterkonstrukt identischen Stämmen infiziert und die *eGFP*-Aktivität im Tumormaterial fluorezenzmikroskopisch und mittels Northern Analysen untersucht (Abb. 14 B). In einer SH10 x SH11 Infektion (A) war die *eGFP*-Aktivität ausschließlich in den reifen Teliosporen detektierbar. Dieses Ergebnis läßt den Schluss zu, dass das von Basenpaarposition –2589 bis zum Start-Codon (+1) von *ssp1* reichende Fragment für eine dem *ssp1*-Wildtyplocus äquivalente Regulation des Reportergens ausreichend ist. Inokulationen der Kombinationen SH19-11 x SH20-18 (B), SH21-45 x SH22-63 (C), SH12 x SH13 (D) und SH14 x SH15 (E) zeigen im Vergleich zur SH10 x SH11 Infektion einen starken Abfall der *eGFP*-Aktivität in den Sporen. Teliosporen der Kreuzung SH16 x SH17 (F) zeigten schließlich keine grüne Fluoreszenz mehr. Während Teliosporen der Infektion SH21-45 x SH22-63 (C) nur eine schwache *eGFP*-Expression zeigten, besaßen Sporen einer Kreuzung der Stämme SH23-69 und SH24-90 (G), welche 455 bp von Position –2598 bis –2143 fusioniert an Fragment C (-1869 bis +1) beinhalteten, wieder eine stark erhöhte *eGFP*-Aktivität. Wie auch die Northern Analysen zeigen, kann das Fusionskonstrukt G nicht die gleiche transkriptionelle Aktivität vermitteln wie das Ausgangsfragment A. In keiner der untersuchten Kombination konnte eine Reporteraktivität während der Präsporulationsstadien detektiert werden (nicht gezeigt).

Zusammengefasst ergab die Auswertung der *ssp1*-Promotorcharakterisierung, dass die Sequenz von Basenposition –2589 bis +1 für eine zur Wildtypsituation identischen Regulation ausreichend ist. Die Deletion des Bereichs von Position –2589 bis –2143 stromaufwärts von *ssp1* resultiert in einer dramatischen Reduktion der Reporteraktivität in den diploiden Sporen. Das Fusionskonstrukt G, welches eine Deletion des Promotorbereichs von Position –2143 bis –1869 im 2589 bp großen Ausgangsfragment beinhaltet, resultiert in einem funktionellen Promotor. Im Verlauf der sukzessiven Verkürzung des *ssp1* 5'-Bereichs führte der Verlust der Region –1062 bis –630 zur Inaktivität des Promotors *in planta*.

Die starke Induktion der *ssp1*-Transkription im Tumormaterial lässt auf aktivierende Faktoren schließen, die während der biotrophen Phase auf die *ssp1*-Expression wirken. Dies schließt allerdings nicht aus, dass auch reprimierende Komponenten, die während der anderen morphologischen Lebensstadien, in denen *ssp1* nur schwach transkribiert wird, zum Tragen kommen. Aus diesem Grund wurde die transkriptionelle Aktivität des *ssp1*-Promotors in haploiden Sporidien unter Verwendung der oben bereits angeführten *eGFP*-Reporterstämme untersucht (**Tab. 3**). Die fluorezenzmikroskopische Analyse haploider Zellen von SH11, SH13, SH15 und SH17 nach 48 h Kultivierung auf aktivkohlehaltigem CM-Festmedium ergab eine schwache grüne Fluoreszenz für SH11 (A) und SH13 sowie eine erhöhte *eGFP*-Aktivität der Stämme SH15 (E) und SH17 (F) (Abb. 15). Der Ausgangsstamm FB2 diente als

interne Kontrolle. Diese mikroskopischen Daten konnten durch Northern Analysen mit einer für *eGFP*-spezifischen Sonde bestätigt werden (Abb. 15).

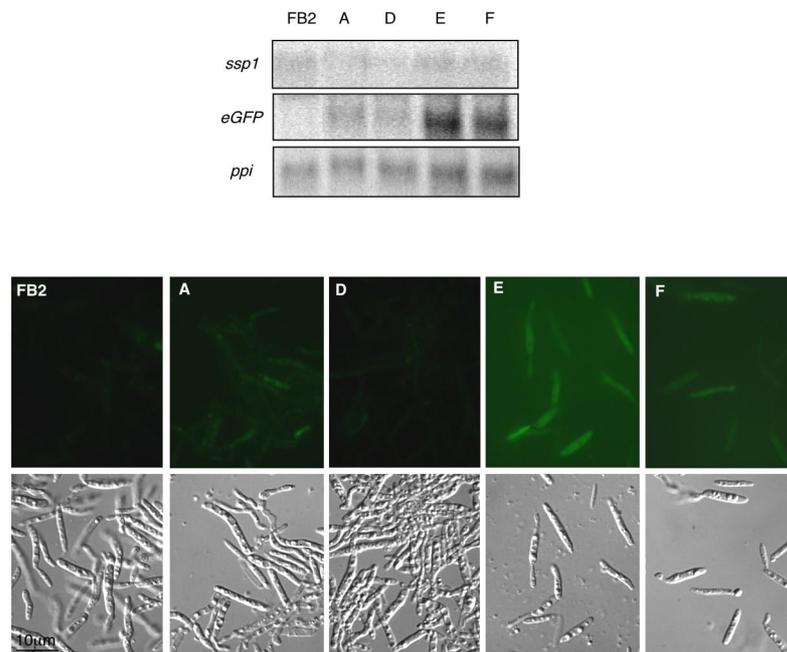


Abb. 15: Analyse der *eGFP*-Expression. **A.** Northern Analyse der *eGFP*-Reporterstämme SH11 ($a2 b2 P_A:eGFP$) (A), SH13 ($a2 b2 P_D:eGFP$) (D), SH15 ($a2 b2 P_E:eGFP$) (E) und SH17 ($a2 b2 P_F:eGFP$) (F). Die genannten Stämme so wie ihr Ausgangsstamm FB2 ($a2 b2$) wurden in CM-glc Flüssigmedium bis $OD_{600} \sim 0.6$ inkubiert, in einer Dichte von $0.1 OD_{600}/cm^2$ auf aktivkohlehaltigem CM-glc Festmedium ausgestrichen, für 48 h bei $28^\circ C$ kultiviert und die Zellen anschließend für RNA-Präparationen geerntet. Für die Northern Analysen wurden jeweils ungefähr $10 \mu g$ Gesamt-RNA aufgetrennt. Die Transkription des Reportergens wurde mit einer *eGFP*-spezifischen Sonde detektiert (M&M). Zur Mengenabschätzung der geladenen *U. maydis* RNA wurde mit einer für das konstitutiv exprimierte Gen *ppi* (Peptidyl Prolyl *cis, trans* Isomerase (Bohlmann, 1996) spezifischen Sonde hybridisiert. **B.** Die haploiden Stämme FB2, SH11, SH13, SH15 und SH17 wurden in CM-glc Flüssigmedium bis $OD_{600} \sim 0.6$ inkubiert, auf aktivkohlehaltiges CM-Festmedium getropft und nach 48 h Inkubation bei $28^\circ C$ lichtmikroskopisch (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch (eGFP) untersucht (M&M).

Diese Daten zeigen, dass, im Gegensatz zur Situation *in planta*, die zunehmende Verkürzung der regulatorischen *ssp1* 5'-Sequenz eine Zunahme der *eGFP*-Expression in haploiden Sporidien bewirkt. Dies lässt auf die Existenz eines in die negative Regulation von *ssp1* involvierten Sequenzelements im Bereich -1655 bis 1062 des *ssp1*-Promotors schließen. Die Stärke der Induktion liegt aber weit unter derjenigen, die in der Wildtypsituation in Sporen beobachtet werden kann.

Durch die Ergebnisse der Promotoranalyse *in planta* stellte sich die Frage, ob der identifizierte regulatorische Bereich von Position -2589 bis -2143 alleine für die stadienspezifische Induktion der *ssp1*-Expression verantwortlich ist. Um dies zu beantworten, wurden haploide Stämme hergestellt, in denen der Sequenzbereich von Position -2589 bis -2143 bzw. ein Fragment von Position -2589 bis -1869 in beiden Orientierungen an den *mfa1*-

Basalpromotor (C. Aichinger, pers. Mitteilung) fusioniert ist. Diese Hybridpromotoren wurden jeweils vor das *eGFP*-Reportergen gesetzt und ektopisch als singuläre Kopien in den *U. maydis ip*-Locus inseriert (Tab. 4, Abb. 16 A, M&M).

Tabelle 4: Promotoranalyse

Stamm	Genotyp	Promotor	Orientierung
SH30	<i>a1 b1 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S</i>	<i>mfa1</i> _{basal} + <i>ssp1</i> (-2589 bis -2143)	A: 3'-5' (-)
SH31	<i>a2 b2 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S</i>	<i>mfa1</i> _{basal} + <i>ssp1</i> (-2589 bis -2143)	A: 3'-5' (-)
SH32	<i>a1 b1 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S</i>	<i>mfa1</i> _{basal} + <i>ssp1</i> (-2589 bis -2143)	B: 5'-3' (+)
SH33	<i>a2 b2 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S</i>	<i>mfa1</i> _{basal} + <i>ssp1</i> (-2589 bis -2143)	B: 5'-3' (+)
SH34	<i>a1 b1 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S</i>	<i>mfa1</i> _{basal} + <i>ssp1</i> (-2589 bis -1869)	C: 5'-3' (-)
SH35	<i>a2 b2 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S</i>	<i>mfa1</i> _{basal} + <i>ssp1</i> (-2589 bis -1869)	C: 5'-3' (-)
SH36	<i>a1 b1 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S</i>	<i>mfa1</i> _{basal} + <i>ssp1</i> (-2589 bis -1869)	D: 3'-5' (+)
SH37	<i>a1 b1 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S</i>	<i>mfa1</i> _{basal} + <i>ssp1</i> (-2589 bis -1869)	D: 3'-5' (+)

Als Kontrolle wurde der haploide Stamm UMa2 (*a2b2 P_{mfa1}:eGFP*) verwendet (C. Aichinger, S. Gilles, M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). Maispflanzen der Varietät „Gaspar Flint“ wurden mit den kompatiblen Reporterstammpaaren inokuliert und die *eGFP*-Aktivität im Tumormaterial fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 16 A).

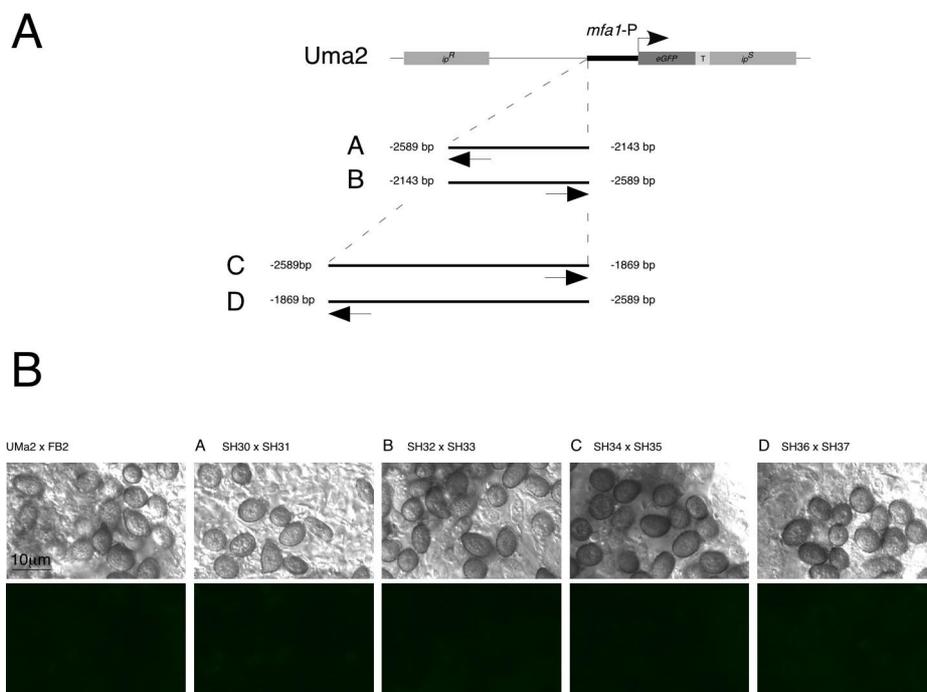


Abb. 16: Analyse der eGFP-Expression. **A.** Schematische Darstellung des *ip*-Locus der Reporterstämme SH30 und SH31 (A), SH32 und SH33 (B), SH34 und SH35 (C), SH36 und SH37 (D) sowie des Kontrollstammes UMa2. *ip^R* bzw. *ip^S* steht für die Carboxin-Resistenzkassette (siehe Abb. 14), *eGFP* für das *eGFP* Gen, *mfa1-P* für den *mfa1*-Basalpromoter. Die Pfeile geben die Orientierung der klonierten *ssp1*-Promotorfragmente an. **B.** Zur mikroskopischen Analyse der eGFP-Reporterstämme

wurden Maispflanzen der Varietät „Gaspar Flint“ mit den Kreuzungen SH30 x SH31, SH32 x SH33, SH34 x SH35, SH36 x SH37 sowie der Kontrolle Uma2 x FB2 inokuliert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurden Schnittpräparate angefertigt und lichtmikroskopisch (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch (eGFP) untersucht (M&M).

In Teliosporen konnte keine Induktion der eGFP-Expression beobachtet werden, d. h. die ausgewählten Sequenzbereiche des *ssp1*-Promotors konnten keinen Einfluss auf die Aktivität des *mfa1*-Basalpromotors ausüben. Hieraus wurde geschlossen, dass zusätzliche regulatorische Elemente und/oder ein definierter Abstand zwischen den regulatorischen DNA-Sequenzen und dem basalen Promotor notwendig für deren Funktionalität sind.

2.6.2 Die Histondeacetylase Hda1 agiert als Repressor der *ssp1*-Expression in haploiden Sporidien

Im vorherigen Kapitel wurde die Identifizierung eines stromaufwärts des *ssp1*-Translationsstarts liegenden Elements beschrieben, das in die negative Regulation von *ssp1* in haploiden Sporidien involviert ist. Dies deutet auf die Existenz möglicher Repressoren hin, die auf den *ssp1*-Promotor wirken.

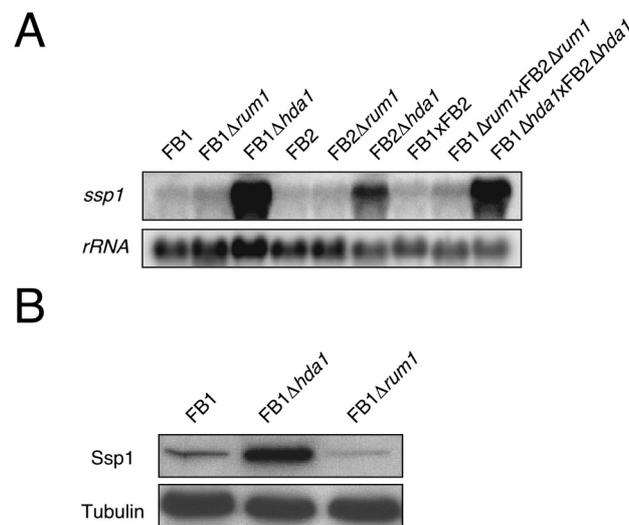


Abb. 17: *ssp1*-Expression in *hda1*- und *rum1*-Deletionsstämmen. **A.** Die Stämme FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB1Δ*hda1* (*a1 b1* Δ*hda1*::Hyg^R), FB2Δ*hda1* (*a2 b2* Δ*hda1*::Hyg^R), FB1Δ*rum1* (*a1 b1* Δ*rum1*::Hyg^R) und FB2Δ*rum1* (*a2 b2* Δ*rum1*::Hyg^R) wurden in CM-Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 kultiviert. Haploide Stämme sowie die angeführten kompatiblen Kreuzungen wurden in einer Dichte von 0.1 OD₆₀₀/cm² auf aktivkohlehaltigem CM-glc Festmedium ausgestrichen, für 48 h bei 28°C kultiviert und die Zellen anschließend für Protein- und RNA-Präparationen geerntet. Für die Northern Analysen wurde jeweils ungefähr 15 µg Gesamt-RNA aufgetrennt (Spur 1, FB1; Spur 2, FB1Δ*rum1*, Spur 3, FB1Δ*hda1*, Spur 4, FB2; Spur 5, FB2Δ*rum1*, Spur 6, FB2Δ*hda1*, Spur 7, FB1 x FB2; Spur 8, FB1Δ*rum1* x FB2Δ*rum1*, Spur 9, FB1Δ*hda1* x FB2Δ*hda1*). Als *ssp1*-spezifische Sonde wurde ein 1059 bp *HpaI*-*BamHI* Fragment aus dem offenen Leserahmen verwendet. Die Hybridisierung mit einem für *U. maydis* 18S rRNA spezifischen Oligonukleotid diente als interne RNA-Mengenkontrolle. **B.** Für Western Analysen wurden SDS-lösliche Proteinpräparationen der Pelletfraktionen der Stämme FB1 (Spur 1), FB1Δ*hda1* (Spur 2) und FB1Δ*rum1* (Spur 3) aufgetrennt (M&M). Es wurden jeweils ungefähr 100 µg

Proteinextrakt aufgetragen. Zur Detektion von Ssp1 wurde das polyklonale Anti-Ssp1-Serum in einer Verdünnung 1:10.000 verwendet. *U. maydis* Tubulin diente als interne Mengenkontrolle.

In *U. maydis* konnten mit den Proteinen Rum1 (regulator of *U. maydis* 1; Quadbeck-Seeger et al., 2000) und Hda1 (Histondeacetylase 1; M. Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung) bereits zwei in Genepression involvierte Faktoren isoliert werden (siehe Einleitung 1.5). Vermutlich sind Rum1 wie auch Hda1 an der chromatinvermittelten Genregulation in *U. maydis* beteiligt (J. Kämper, pers. Mitteilung).

Um einen möglichen Einfluss von Rum1 und Hda1 auf die *ssp1*-Transkription zu untersuchen, wurden Northern Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die *ssp1*-Expression in den haploiden Stämmen FB1, FB2, FB1 Δ *hda1*, FB2 Δ *hda1*, FB1 Δ *rum1* und FB2 Δ *rum1* sowie aus deren kompatiblen Kreuzungen isoliert. Nach Hybridisierung mit einer für *ssp1*-spezifischen Sonde zeigten die *rum1*-defizienten Stämme (Abb. 17 A, Spur 2 und 5) sowie deren Kreuzung (Abb. 17 A, Spur 8) keine Expressionsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 17 A, Spur 1, 4 und 7). Im Gegensatz dazu war die Menge an detektierter *ssp1*-mRNA in *hda1*-Deletionsstämmen (Abb. 17 A, Spur 3 und 6) sowie in der Kreuzung dieser Stämme (Abb. 17 A, Spur 9) um ein Vielfaches höher. Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, dass die Histondeacetylase Hda1 in die Repression der *ssp1*-Transkription in haploiden Sporidien involviert ist. Dieses Ergebnis wurde durch eine Western Analyse der Stämme FB1, FB1 Δ *hda1* und FB1 Δ *rum1* unter Verwendung des polyklonalen Anti-Ssp1-Serums auf Proteinebene bestätigt (Abb. 17 B).

2.6.3 *hda1*-Deletionsmutanten zeigen keine Deregulation der *ssp1*-Expression während der pathogenen Entwicklung

Um die *ssp1*-Expression während der pathogenen Entwicklung nach Infektion mit *rum1*- bzw. *hda1*-defizienten Stämmen zu untersuchen, wurden Northern Analysen durchgeführt. Nach Hybridisierung mit einer *ssp1*-spezifischen Sonde konnte, wie erwartet, in RNA aus Tumormaterial einer Infektion der Wildtypstämme FB1 x FB2 ein Signal detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in Gesamt-RNA aus Δ *rum1*-Tumoren kein *ssp1*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 18 A), was auf Grund der fehlenden Teliosporenentwicklung in Δ *rum1*-Tumoren nicht unerwartet war. Überraschenderweise konnte auch in Gesamt-RNA aus Tumoren *hda1*-defizienter Stämme kein *ssp1*-Signal detektiert werden, obwohl mit dem Verlust eines potentiellen Repressors eine Expression während der Präsporulationsstadien erwartet worden wäre.

Um die Auswirkung einer Deletion von *hda1* auf die Regulation von *ssp1* während der pathogenen Entwicklung genauer zu untersuchen, wurden die Stämme SH5-E und SH6-B erstellt (M&M). Diese *hda1*-defizienten Stämme tragen das *eGFP*-Reporter gen an Stelle von *ssp1* unter der Kontrolle des natürlichen *ssp1*-Promotors. Des Weiteren wurde der Stamm SH8-22, ein SH11-Derivat, in dem *hda1* deletiert ist, in die Analyse mit einbezogen. Diese

Reporterstämme ermöglichen die Untersuchung der *ssp1*-Expression während der biotrophen Phase des Pilzes über die Detektion der eGFP-Expression.

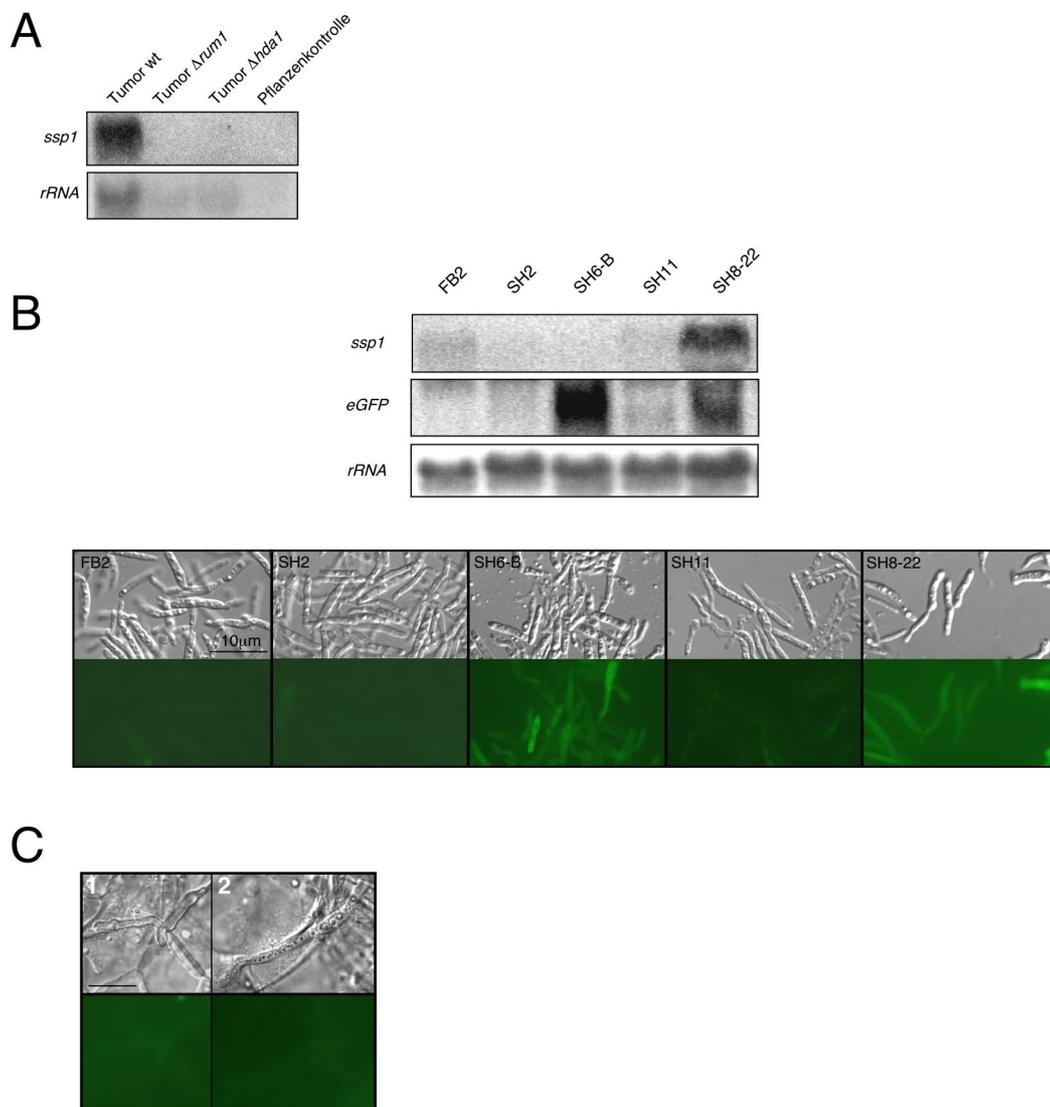


Abb. 18: A. Der Einfluss von Hda1 auf die Expression von *ssp1* während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Aus reifen Tumoren (16 dpi) der Infektionen FB1 x FB2, FB1 $\Delta hda1$ x FB2 $\Delta hda1$ und FB1 $\Delta rum1$ x FB2 $\Delta rum1$ wurde Gesamt-RNA isoliert. Für die Northern Analyse wurde ungefähr 20 μ g RNA aufgetrennt (Spur 1, Tumor FB1 x FB2; Spur 2, Tumor $\Delta rum1$; Spur 3, Tumor $\Delta hda1$, Spur 4, Pflanzenkontrolle). Eine gleiche Menge Gesamt-RNA uninfizierter Maispflanzen diente als Kontrolle für mögliche Kreuzhybridisierungen der verwendeten Sonden. Als *ssp1*-spezifische Sonde wurde ein 1059 bp *HpaI-BamHI* Fragment aus dem offenen Leserahmen verwendet. Die Hybridisierung mit einem für *U. maydis* 18S rRNA spezifischen Oligonukleotid diente als interne RNA-Mengenkontrolle. **B.** Die genannten Stämme wurden in CM-glc Flüssigmedium bis $OD_{600} \sim 0.6$ inkubiert, in einer Dichte von 0.1 OD_{600}/cm^2 auf aktivkohlehaltigem CM-glc Festmedium ausgestrichen, für 48 h bei 28°C kultiviert und die Zellen anschließend für RNA-Präparationen geerntet. Für die Northern Analysen wurde jeweils ungefähr 15 μ g Gesamt-RNA aufgetrennt (Spur 1, FB2; Spur 2, SH2, Spur 3, SH6-B, Spur 4, SH11, Spur 5, SH8-22). Die Membran wurde im Anschluss mit einer für eGFP spezifischen Sonde inkubiert. Als *ssp1*-spezifische Sonde wurde ein 1091 bp großes *HpaI-BamHI* Fragment aus dem *ssp1*-ORF gewählt (M&M). Zur Detektion der Reportergentranskription wurde eine

eGFP-spezifische Sonde verwendet (M&M). Die Hybridisierung mit einem für *U. maydis* 18S rRNA spezifischen Oligonukleotid diente als interne RNA-Mengenkontrolle. Zur mikroskopischen Analyse wurden die genannten Stämme in CM-glc Flüssigmedium bis $OD_{600} \sim 0.6$ inkubiert, auf aktivkohlehaltiges CM-Festmedium getropft und nach 48 h Inkubation bei 28°C lichtmikroskopisch (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch (eGFP) untersucht (M&M). C. Kreuzungen der Stämme SH5-E x SH6-B (Bild 1) und FB1 Δ *hda1* x SH8-22 (Bild 2) wurden in 14 Tage alte Maispflanzen der Varietät „G. Flint“ inokuliert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurden Schnittpräparate von Blättern und Tumoren angefertigt und lichtmikroskopisch (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch (eGFP) untersucht (M&M).

Nach Hybridisierung mit einer für das *eGFP*-Reporter-gen spezifischen Sonde zeigte der *hda1*-defiziente Stamm SH6-B eine stark erhöhte *eGFP* Transkription (Abb. 18 B, Spur 3) im Vergleich zum Kontrollstamm SH2 (Abb. 18 B, Spur 2). Der Vergleich der *eGFP*-Signalstärke des *hda1*-defizienten Stamm SH8-22 (Abb. 18 B, Spur 5) mit SH11 (Abb. 18 B, Spur 4) deutet darauf hin, dass der 2589 bp umfassende Bereich stromaufwärts des *ssp1*-Translationsstarts zur Vermittlung der Hda1-abhängigen Repression ausreicht. Die Hybridisierung mit einer *ssp1*-spezifischen Sonde als interne Kontrolle zeigte Expression des endogenen *ssp1*-Gens in FB2 (Abb. 18 B, Spur 1) und SH11 (Abb. 18 B, Spur 4) sowie die Induktion der Transkription im Stamm SH8-22 (Abb. 18 B, Spur 5). Die mikroskopische Analyse der Reporter- und Kontrollstämmen bestätigte die durch die Northern Analyse erhaltenen Daten. Nur in den *hda1*-Deletionsstämmen SH6-B (Abb. 18 B, Bild 3) und SH8-22 (Abb. 18 B, Bild 5) konnte eine grüne Fluoreszenz in den Sporidien detektiert werden. In der mikroskopischen Analyse von Tumormaterial der Infektionen SH5-E x SH6-B (Abb. 18 C, Bild 1) und FB1 x SH8-22 (Abb. 18 C, Bild 2) konnte weder in Infektionshyphen noch in sich verzweigenden Präsporulationshyphen eine Aktivität des eGFP-Reporters detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der nicht zu detektierenden *ssp1*-Transkription in Tumoren *hda1*-defizienter Stämme überein (siehe Abb. 18 A). Zusammengefasst konnte durch die *hda1*-defizienten eGFP-Reporterstämmen gezeigt werden, dass Hda1 nicht für die Repression des Reportergens *eGFP* (stellvertretend für *ssp1*) während der pathogenen Entwicklung verantwortlich ist.

2.6.4 Untersuchung möglicher Einflüsse des *b*-Kreuzungstyplocus auf die *ssp1*-Expression

Die Präsenz des aktiven b-Heterodimers ist Voraussetzungen für Pathogenität und den Wechsel von vegetativem Wachstum hin zum biotrophen Wachstum des Pilzes, die in der Sporenbildung endet. Da pathogene und sexuelle Entwicklung untrennbar miteinander verbunden sind, wurde der Einfluss der b-Proteine auf die *ssp1*-Expression mit Hilfe der haploiden Stämme AB31 (*a2 P_{crg1}:bE1,bW2*) und AB32 (*a2 P_{crg1}:bE2,bW2*) (Romeis et al., 2000; Brachmann, 2001b) untersucht. Beide Stämme exprimieren verschiedene Kombinationen der *bE/bW* Gene unter der regulatorischen Kontrolle des glukosereprimierten

und arabinoseinduzierbaren *crg1*-Promotors (Bottin et al., 1996). AB31 exprimiert die aktive b-Proteinkombination bE1/bW2 und AB32 die nicht zur Dimerisierung befähigten Proteine bE2 und bW2. Als Kontrolle diente der in *b* deletierte Stamm AB2 (*a2 b0*) (Romeis et al., 2000; Brachmann, 2001b). Die Verwendung der haploiden Stämme AB31 und AB32 ermöglichte es, im Gegensatz zu einer kompatiblen Kreuzung, die eine Mischung aus dikaryotischen Zellen und Spordien darstellt, die Effekte der b-Proteine auf die *ssp1*-Transkription unabhängig von Einflüssen durch die pheromonabhängigen Signalwege zu untersuchen.

Für Northern Analysen wurde von den genannten Stämmen nach Kultivierung auf aktivkohlehaltigem CM-Festmedium unter induzierenden wie auch reprimierenden Bedingungen Gesamt-RNA isoliert. Die Hybridisierung mit einer für *ssp1*-spezifischen Sonde zeigte eine basale Transkription in AB2 (Abb. 19, Spur 1), AB31 (Abb. 19, Spur 2) und AB32 (Abb. 19, Spur 3) unter reprimierenden Bedingungen. Die Induktion der *b*-Transkription bewirkte keine Veränderung der *ssp1*-Transkription (Abb. 19, Spur 2, 4 und 6). Um die erfolgreiche Induktion der *b*-Gen Transkription nachzuweisen, wurde zusätzlich mit einer spezifischen Sonde für das direkt durch b-Heterodimer regulierte Gen *dik6* (Weinzierl, 2001) hybridisiert. Wie erwartet konnte ein *dik6*-Signal nur bei der Anwesenheit des aktiven Heterodimers bE1/bW2 nachgewiesen werden (Abb. 19, Spur 4).

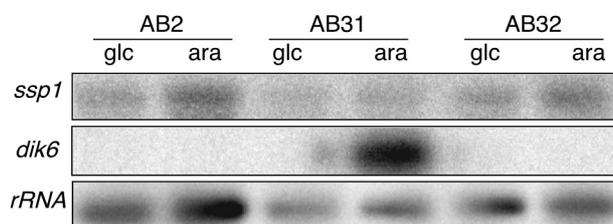
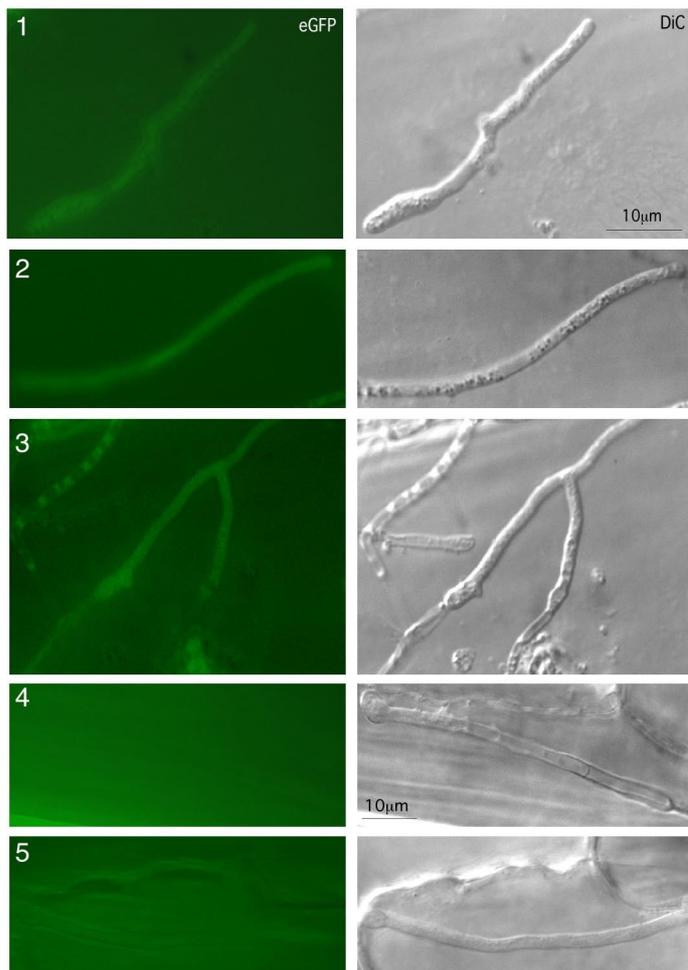


Abb. 19. Regulation durch das aktive b-Heterodimer. Die Stämme AB2 (*a2 Δb*), AB31 (*a2 P_{crg1}:bE1,bW2*) und AB32 (*a2 P_{crg1}:bE2,bW2*) wurden in CM-glc Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 inkubiert, in einer Dichte von 0.1 OD₆₀₀/cm² auf aktivkohlehaltigem CM-glc oder CM-ara Festmedium ausgestrichen, für 24 h bei 28°C kultiviert und die Zellen anschließend für RNA-Präparationen geerntet. Für die Northern Analysen wurde jeweils ungefähr 10 µg Gesamt-RNA aufgetrennt (Spur 1, AB2 in glucosehaltigem Medium; Spur 2, AB2 in arabinosehaltigem Medium; Spur 3, AB31 in glucosehaltigem Medium; Spur 4, AB31 in arabinosehaltigem Medium; Spur 5, AB32 in glucosehaltigem Medium; Spur 6, AB32 in arabinosehaltigem Medium). Als *ssp1*-spezifische Sonde wurde ein 1091 bp großes *HpaI*-*BamHI* Fragment aus dem *ssp1*-ORF gewählt (M&M). Zur Detektion des *dik6*-Transkripts wurde ein 420 bp *HindIII*-*BamHI* *dik6*-cDNA Fragment verwendet (Bohlmann, 1996). Zum Vergleich der geladenen RNA Mengen wurde mit einer Sonde gegen *U. maydis* 18S rRNA hybridisiert (M&M).

2.6.5 Untersuchung möglicher Einflüsse des *a*-Kreuzungstyplocus auf die *ssp1*-Expression

Nach Inokulation einer Mischung der kompatiblen *eGFP*-Reporterstämme SH1 und SH2 (siehe 2.5.2) in Maispflanzen der Varietät „Early Golden Bantam“ konnte während der Phase der Zell/Zell-Erkennung auf der Blattoberfläche, gekennzeichnet durch die Ausbildung von Konjugationshyphen, Reporteraktivität in Form von grüner Fluoreszenz detektiert werden (12 h nach Inokulation) (Abb. 20 A, Bild 1 und 2). In diesem Stadium reagiert die haploide Zelle auf das Pheromon eines potentiellen Kreuzungspartners mit der Ausbildung von Konjugationshyphen (siehe Einleitung). Auch nach der Fusion zweier kompatibler Zellen (Abb. 20 A, Bild 3) konnte eine Aktivität des Reporters detektiert werden. Nach dem Eindringen in das Pflanzengewebe (ca. 36 h nach Infektion) konnte keine grüne Fluoreszenz mehr beobachten werden (Abb. 20 A, Bild 4 und 5). Dies war ein Hinweis darauf, dass die Genprodukte des *a*-Kreuzungstyplocus eine Rolle bei der *ssp1*-Expression während der Zell/Zell-Erkennung spielen könnten.

A



B

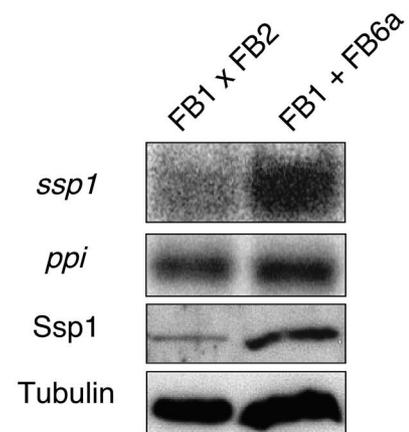


Abb. 20: Einfluss der Genprodukte des *a*-Kreuzungstyplocus auf die *ssp1*-Expression. **A.** Maispflanzen der Varietät „Early Golden Bantam“ wurden mit einer Kreuzung der Stämme SH1 x SH2 infiziert und 12h (Bild 1, 2 und 3) und 36 h (Bild 4 und 5) nach Inokulation mikroskopisch analysiert. **B.** Die Stämme FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*) und FB6a (*a2 b1*) wurden in CM-glc Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 inkubiert. Gleiche Mischungen von FB1 mit FB2 und FB1 mit FB6a wurden in einer Dichte von 0.1 OD₆₀₀/cm² auf aktivkohlehaltigem NM-glc oder NM-ara Festmedium ausgestrichen, für 24 h bei 28°C kultiviert und die Zellen anschließend für Protein- und RNA-Präparationen geerntet. Für die Northern Analysen wurde jeweils ungefähr 10 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Als *ssp1*-spezifische Sonde wurde ein 1091 bp großes *HpaI*-*BamHI* Fragment aus dem *ssp1*-ORF gewählt (M&M). Die Hybridisierung mit einer für das konstitutiv exprimierte Gen *ppi* (Peptidyl Prolyl *cis,trans* Isomerase (Bohlmann, 1996) spezifischen Sonde wurde zur Mengenabschätzung der *U. maydis* RNA verwendet. Für die Western Analyse wurden jeweils ungefähr 100 µg SDS-lösliche Proteinpräparationen der Pelletfraktion einer kompatibler Kreuzung der Stämme FB1 und FB2 (Spur 1) sowie der Pheromonstimulation FB1 + FB6a (Spur 2) aufgetrennt. Zur Detektion von Ssp1 wurde das polyklonale Anti-Ssp1-Serum in einer Verdünnung 1:10.000 verwendet. Um die aufgetragenen Proteinmengen vergleichen zu können, wurde die Membran mit einem heterologen Antikörper gegen *U. maydis* Tubulin inkubiert.

Zur genaueren Untersuchung der Rolle des *a*-Locus bei der *ssp1*-Expression wurde für Northern und Western Analysen Gesamt-RNA bzw. Protein einer Mischung aus Zellen der Stämme FB1 und FB6a (*a2 b1*) nach Kultivierung auf aktivkohlehaltigem NM-Medium isoliert. Die Zellen in einer FB1 + FB6a Mischung können sich auf Grund der unterschiedlichen *a*-Paarungstyploci über die Pheromon-Rezeptor vermittelte Zellerkennung gegenseitig stimulieren, aber im Gegensatz zu einer FB1 x FB2 Kreuzung verhindern die identischen *b1*-Allele die Entstehung des filamentösen Dikaryons. Als Kontrolle diente eine Kreuzung der kompatiblen haploiden Stämme FB1 und FB2, die nach der Zellfusion ein aktives b-Heterodimer bilden können. Nach Hybridisierung mit einer *ssp1*-spezifischen Sonde konnte eine Induktion der Transkription während der Pheromonstimulation (Abb. 20 B, Spur 1) im Vergleich zur Kreuzung (Abb. 20 B, Spur 2) nachgewiesen werden. Dies konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Proteinextrakte pheromonstimulierter Zellen einer FB1 + FB6a Mischung (Abb. 20 B, Spur 2) beinhalten etwa 5 bis 10 mal mehr Ssp1-Protein verglichen mit einer FB1 x FB2 Kreuzung (Abb. 20 B, Spur 1).

Zusammenfassend geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass es im Verlauf von Pheromonstimulation und Zellfusion zu einer Induktion der Ssp1-Expression kommt.

2.6.6 Das Pheromon-MAP-Kinase Modul hat keinen Einfluss auf die *ssp1*-Expression

Es war anzunehmen, dass die Wirkung der Pheromonstimulation auf die *ssp1*-Expression über die bekannten nachgeschalteten Signaltransduktionswege vermittelt wird (siehe Einleitung). Aus diesem Grund wurde ein möglicher regulatorischer Einfluss der Komponenten des MAP-Kinase Moduls und des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors Prf1 (Hartmann et al., 1996) auf die *ssp1*-Transkription untersucht. In die Expressionsanalysen wurden neben den Stämmen FB1Δ*kpp4* (P. Müller, pers. Mitteilung), FB1Δ*fuz7* (Banuett und Herskowitz, 1994a; G. Weinzierl, pers. Mitteilung), FB1Δ*kpp2* (Müller et al., 1999),

FB1 Δ *prf1* (Hartmann et al., 1996) auch die Stämme FB1*kpp4-2* und FB1*fuz7dd* (P. Müller, pers. Mitteilung) mit einbezogen. Letztere exprimieren Allele der Gene *kpp4* bzw. *fuz7*, welche für konstitutiv aktive Varianten der entsprechenden Kinasen kodieren, unter der Kontrolle des regulierbaren *crg1*-Promotors (Bottin et al., 1996). Durch einen Wechsel der Zuckerquelle von Glucose zu Arabinose wird in diesen Stämmen eine Aktivierung der Pheromon-Signalkaskade auf Stufe der MAPKKK Kpp4 bzw. der MAPKK Fuz7 induziert. Als Wildtyp-Kontrolle wurde der Stamm FB1 miteinbezogen.

Nach Hybridisierung mit einer *ssp1*-spezifischen Sonde konnte keine Veränderung der *ssp1*-mRNA Menge in den verschiedenen Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 21). Auch die Expression der konstitutiv aktiven Formen der MAPKKK Kpp4-2 sowie der MAP-Kinase Fuz7dd hatte keine Auswirkung auf die *ssp1*-Transkription.

Auf Grund dieser Ergebnisse schien es ausgeschlossen, dass *ssp1* über Komponenten des MAP-Kinase Moduls reguliert wird.

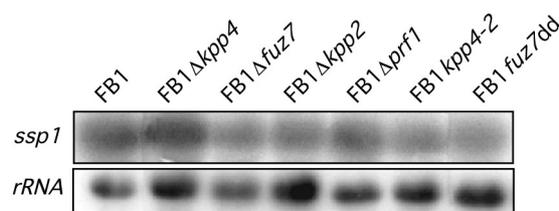


Abb. 21: Die Pheromon-MAP-Kinasekaskade hat keinen Einfluss auf die *ssp1*-Expression. Die Stämme FB1 (*a1 b1*), FB1 Δ *kpp4* (*a1 b1* Δ *kpp4*), FB1 Δ *fuz7* (*a1 b1* Δ *fuz7*), FB1 Δ *kpp2* (*a1 b1* Δ *kpp2*), FB1 Δ *prf1* (*a1 b1* Δ *prf1*), FB1*kpp4-2* (*a1 b1* P_{crg}:*kpp4-2*) und FB1*fuz7dd* (*a1 b1* P_{crg}:*fuz7dd*) wurden in CM-glc Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 inkubiert, in einer Dichte von 0.1 OD₆₀₀/cm² auf aktivkohlehaltigem NM-glc Festmedium oder im Fall von FB1*kpp4-2* und FB1*fuz7DD* auf NM-ara Festmedium ausgestrichen, für 24 h bei 28°C kultiviert und die Zellen anschließend für RNA-Präparationen geerntet. Für die Northern Analysen wurde jeweils ungefähr 10 µg Gesamt-RNA aufgetrennt (Spur1, FB1; Spur 2, FB1 Δ *kpp4*; Spur 3, FB1 Δ *fuz7*; Spur 4, FB1 Δ *kpp2*; Spur5, FB1 Δ *prf1*; Spur6, FB1*kpp4-2*; Spur7, FB1*fuz7dd*). Als *ssp1*-spezifische Sonde wurde ein 1091 bp großes *HpaI*-*BamHI* Fragment aus dem *ssp1*-RF gewählt (M&M). Zum Vergleich der geladenen RNA Mengen wurde mit einer Sonde spezifisch *U. maydis* 18S-rRNA Sonde hybridisiert (M&M).

2.6.7 Die Proteinkinase A beeinflusst die *ssp1*-Expression

Nachdem die MAP-Kinase Kaskade keinen offensichtlichen Einfluss auf die *ssp1*-Expression ausübt, sollte untersucht werden, ob die induzierte Ssp1-Expression während der Pheromon-Stimulation möglicherweise über den cAMP-Weg erfolgt (siehe Einleitung).

Dazu wurde die *ssp1*-Expression in den haploiden Stämmen FB1 Δ *uac1* (Krüger et al., 1998) und FB1 Δ *ubc1* (Gold et al., 1994; Hartmann et al., 1999) analysiert, die Deletionen des Gens für die Adenylatzyklase Uac1 bzw. für die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A, Ubc1, tragen (siehe Einleitung). *uac1*-defiziente Stämme sollten einen niedrigen

intrazellulären cAMP-Siegel besitzen, während dessen eine Deletion von *ubc1* in einem konstitutiv aktiven cAMP-Signalweg resultiert. In die Northern Analyse wurde der Stamm FB1 als interne Kontrolle mit einbezogen (Abb. 22). Eine *ubc1* Deletionsmutante (Abb. 22, Spur 3) zeigte im Vergleich zum Ausgangsstamm FB1 (Abb. 22, Spur 1) und zur *uac1* Deletionsmutante (Abb. 22, Spur 2) eine deutliche Induktion der *ssp1*-Transkription. Dieses Ergebnis wurde mittels Western Analysen bestätigt. Die *ubc1*-Deletionsmutante (Abb. 22, Spur 3) besitzt eine ca. 5 bis 10 mal erhöhte Menge an Ssp1-Protein im Vergleich zu FB1 (Abb. 22, Spur 1) und FB1 Δ *uac1* (Abb. 22, Spur 2).

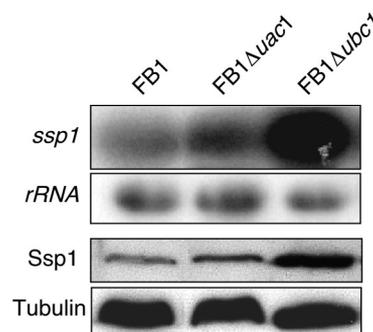


Abb. 22: Einfluss des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die *ssp1*-Expression. Die Stämme FB1, FB1 Δ *uac1* und FB1 Δ *ubc1* wurden in CM-glc Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 inkubiert. Bei dem Stamm FB1 Δ *uac1* wurde der Vorkultur 6 mM cAMP zugegeben. Die Kulturen wurden in einer Dichte von 0.1 OD₆₀₀/cm² auf aktivkohlehaltigen NM-glc Platten ausgestrichen, für 24 h bei 28°C inkubiert und anschließend die Zellen für RNA- und Proteinpräparationen geerntet. Für die Northern Analysen wurden ungefähr 10 µg Gesamt-RNA aufgetrennt (Spur 1, FB1, Spur 2, Δ *uac1*; Spur 3, Δ *ubc1*). Zum Nachweis der *ssp1*-mRNA wurde ein 1091 bp *HpaI*-*Bam*HI Fragment aus dem offenen Leserahmen von *ssp1* radioaktiv markiert und zur Hybridisierung eingesetzt. Zur Mengenkontrolle wurde die Membran mit einem für *U. maydis* 18S rRNA spezifischen Oligonukleotid hybridisiert. Für die Western Analyse wurden die SDS-löslichen Proteine der nach dem Zellaufschluss erhaltenen Pelletfraktion verwendet. Es wurden jeweils ca. 100 µg Proteinextrakt aufgetrennt (Spur 1, FB1, Spur 2, Δ *uac1*; Spur 3, Δ *ubc1*). Das polyklonale Anti-Ssp1-Serum wurde in einer Verdünnung von 1:1 0.000 zur Detektion von Ssp1 eingesetzt. Um die aufgetragenen Proteinmengen vergleichen zu können, wurde die Membran mit einem heterologen Antikörper gegen *U. maydis* Tubulin inkubiert.

Zusammenfassend konnte aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass eine Deletion der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A, was die Situation einer hohen cAMP-Konzentration in der Zelle widerspiegelt zur Induktion der Ssp1-Expression in haploiden Sporidien führt. Im Gegensatz dazu hat die Deletion der Adenylatzyklase *Uac1* keine Auswirkung auf die *ssp1*-Expression.

2.7 Subzelluläre Lokalisierung eines Ssp1-eGFP Fusionsproteins in *Ustilago maydis*

2.7.1 Ssp1-eGFP lokalisiert auf globulären Organellstrukturen in Teliosporen

Um einen Hinweis auf die Funktion von Ssp1 zu erhalten, wurde zur Lokalisierung des Proteins *in vivo* der Stamm SH26 hergestellt, welcher eine translationale Ssp1-eGFP Fusion unter der transkriptionellen Kontrolle des natürlichen *ssp1*-Promotors im endogenen *ssp1*-Locus exprimiert (M&M; ABB. 23 A).

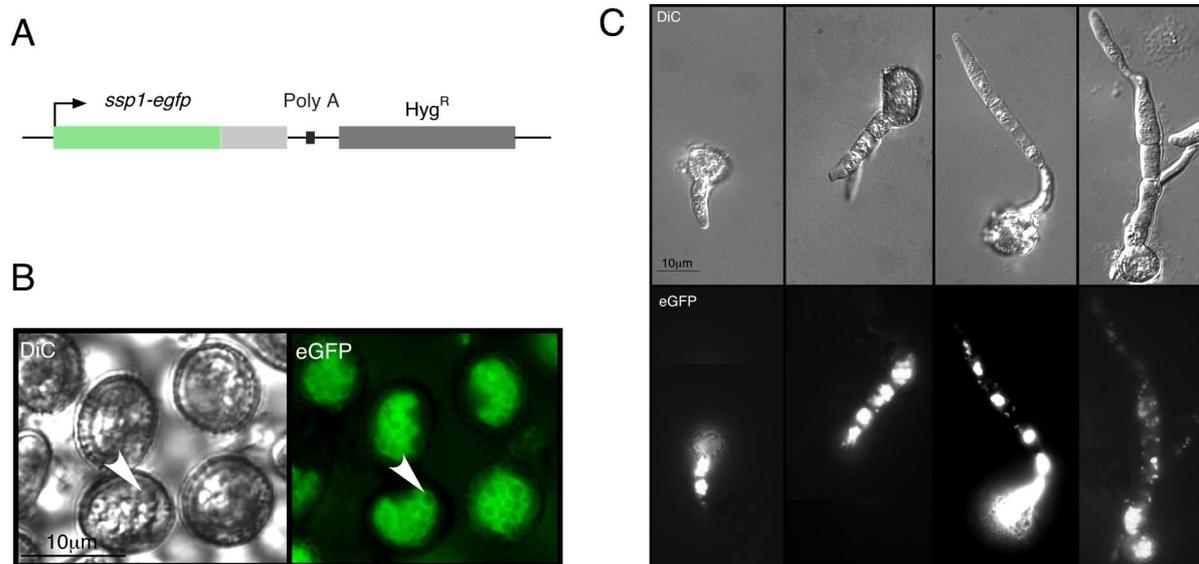


Abb. 23: Lokalisierung des Ssp1-eGFP Fusionsproteins. **A.** Schematische Darstellung des modifizierten *ssp1*-Locus im Stamm SH26 (*a2 b2 ssp1::ssp1-eGFP*). *ssp1-eGFP* symbolisiert das Ssp1-eGFP Fusionskonstrukt, PolyA die *ssp1*-Polyadenylierungsstelle und *Hyg^R* die Hygromycin-B Resistenzkassette. **B.** Aus reifen Tumoren einer FB1 x SH26 Infektion (16 dpi) wurden Schnittpräparate angefertigt und lichtmikroskopisch (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch (eGFP) untersucht. Das Ssp1-eGFP Fusionsprotein lokalisiert auf sphärischen Strukturen innerhalb der Teliospore, exemplarisch mit einer Pfeilspitze markiert. **C.** Zur Lokalisierung des Ssp1-eGFP Fusionsproteins während der Keimung in der Probasidie wurden Teliosporen der Infektion FB1 x SH26 auf mit PD-Festmedium beschichteten Objektträgern in einer feuchten Kammer bei 28°C inkubiert. Ungefähr 16 h bis 24 h nach Inkubationsbeginn wurde die Teliosporenkeimung lichtmikroskopisch (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch (eGFP) untersucht. Der Größenbalken bezieht sich auf die jeweiligen Bilder.

Wie erwartet zeigten in Infektionen mit den Stämmen FB1 und SH26 nur reife Teliosporen in der mikroskopischen Analyse eine intensive grüne Fluoreszenz (ABB. 23 B), während in den morphologisch unterschiedlichen Präsporulationsstadien des Pilzes keine eGFP-Aktivität detektierbar war (nicht gezeigt). Das Ssp1-eGFP Fusionsprotein lokalisierte auf der Oberfläche globulärer Strukturen unterschiedlicher Größe im Inneren der Teliosporen. Um die Lokalisierung in physiologisch aktiven Zellen während des Keimungsprozesses verfolgen zu können, wurden Teliosporen einer FB1 x SH26 Infektion für ca. 16 h bei 28°C auf mit PD-

Medium beschichteten Objektträgern in einer feuchten Kammer inkubiert (M&M). In den Probasidien konnten Fluoreszenzsignale in Form von Punkten und verschiedenen großen globulären Strukturen, die teilweise in Aggregaten zusammengeschlossen waren, detektiert werden (ABB. 23 C).

2.7.2 Ssp1-eGFP co-lokalisiert mit Nile Red anfärbbaren lipidhaltigen Strukturen in keimenden *Ustilago maydis* Teliosporen

Auf der Suche nach Proteinen mit Homologie zu Ssp1 wurden die Enzyme Linoleat-Diol-Synthase aus *G. graminis* (Hornsten et al., 1999) und Prostaglandin-G/H-Synthasen (Cyclooxygenasen) aus Säugern (Feng et al., 1993) identifiziert (siehe 2.3). Diese Enzyme katalysieren die Oxygenierung ungesättigter Fettsäuren (Smith et al., 1996, Su et al., 1998). Das Zytoplasma der Teliosporen ist reich an Lipidtropfen (Ramberg und McLaughlin, 1980), und Linolsäure (18:2) macht rund 30% des Gesamtfettsäureanteils der Sporen aus (Weete et al., 1969, Gunasekaran et al., 1972). Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass Ssp1 möglicherweise in die Modifizierung von Fettsäuren während der Sporenkeimung involviert sein könnte, und dass es sich bei den globulären Organellen, mit denen das Ssp1-eGFP Fusionsprotein assoziiert ist, möglicherweise um Lipidtropfen handelt.

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob Unterschiede in Gehalt und Struktur der lipidhaltigen Organellen zwischen Wildtyp und Mutante vorhanden waren. Zur Detektion zytoplasmatischer Lipidkörper wurde der Farbstoff Nile Red (Nile Blue A Oxazon) verwendet (Greenspan et al., 1985, Weber, 1999). Eine Färbung intakter Teliosporen war auf Grund der für den Farbstoff undurchlässigen Sporenwand nicht möglich, weswegen schließlich frühe Keimungsstadien verwendet wurden. Teliosporen einer Wildtypinfektion mit FB1 und FB2 und *ssp1*-defiziente Teliosporen, die aus der Kreuzung SH1 Δ *ssp1-4* x SH2 Δ *ssp1-I* hervorgegangen waren, wurden nach 15 minütiger CuSO₄ Behandlung in H₂O_{bidest} gewaschen und in YEPS_{light}-Flüssigmedium bei 28°C kultiviert (M&M). Erste Probasidien keimender Sporen zeigen sich ca. 15 h nach Inkubationsbeginn. In diesem Stadium wurden die mit Nile Red angefärbten probasidialen Strukturen mikroskopisch untersucht. Als Kontrolle dienten ungefärbte Sporen der jeweiligen Infektion. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der mit Nile Red gefärbten Probasidien ergab sowohl für Wildtyp- (Abb. 24, Bild 1 und 3) als auch für *ssp1*-defiziente Sporen (Abb. 24, Bild 2, 4 und 5) das gleiche Bild, nämlich Signale in Form von Punkten, globulären Strukturen und Aggregaten verschiedener Größe. Viele dieser Signale entsprechen im Lichtmikroskop sichtbaren Organellstrukturen. Dies läßt darauf schließen, dass *U. maydis* Teliosporen und die frühen Keimungsstrukturen große Mengen an lipidhaltigen Organellen besitzen. Der mikroskopische Vergleich von Größe, Form und Menge der angefärbten Strukturen in Wildtyp- und Ssp1-defizienten Sporen zeigte keine signifikanten Unterschiede.

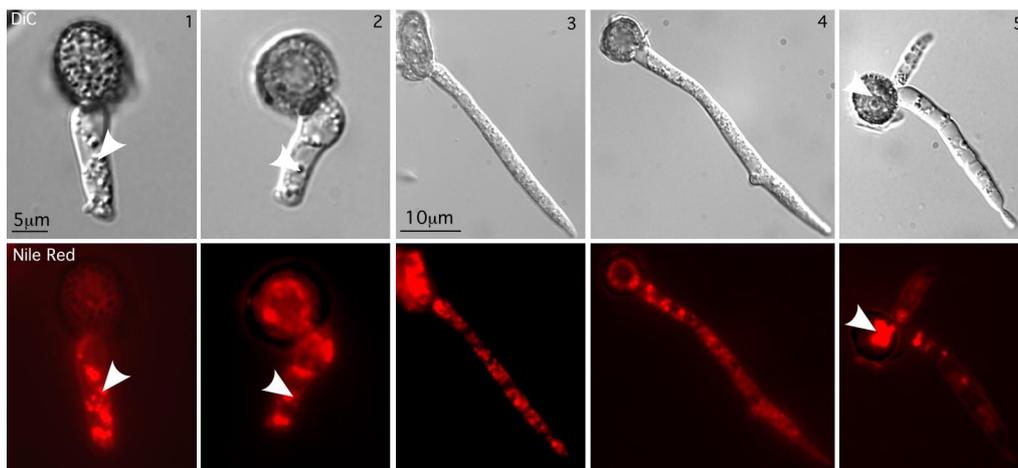


Abb. 24: Mikroskopische Analyse der Lipidkörper während der Probasidienbildung. Reife Wildtyp- und *ssp1*-defiziente Teliosporen wurden in $\text{YEPS}_{\text{light}}$ -Flüssigmedium bei 28°C inkubiert (200 r.p.m.). Nach ungefähr 15 h bis 24 h Inkubation wurden mit Beginn der Keimung die probasidiale Strukturen mit dem Lipidbodymarker Nile Red gefärbt (M&M) und die licht- (DiC) und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (M&M). Einige der gefärbten lipidhaltigen Organellen sind zur Verdeutlichung mit Pfeilen markiert. Der Größenbalken bezieht sich auf alle Bilder. Bild 1 und 3 zeigen Keimungsstrukturen des Wildtyps; Bild 2, 4 und 5 die der Δssp1 -Mutante.

Um zu zeigen, dass es sich bei den mit Ssp1-eGFP assoziierten Strukturen um lipidhaltige Organellen handelt, wurden keimende Sporen, die aus einer FB1 x SH26 Infektion hervorgegangen waren, mit Nile Red gefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte die Co-Lokalisierung des Ssp1-eGFP Fusionsproteins mit durch Nile Red anfärbbaren, lipidhaltigen Zellkompartimenten (Abb. 25). Als Kontrolle dienten ungefärbte Sporen derselben Infektion.

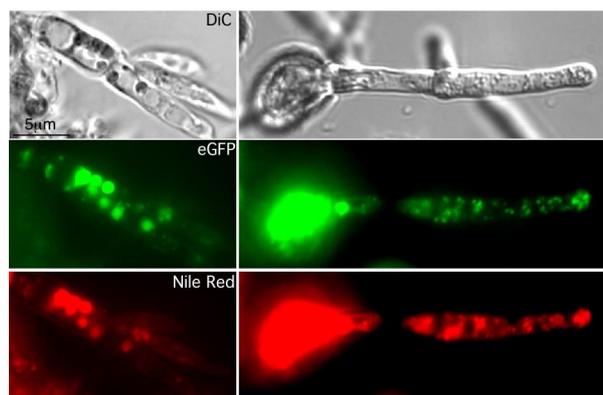


Abb. 25: Co-Lokalisierung des Ssp1-eGFP Fusionsproteins mit durch den Farbstoff Nile Red anfärbbaren lipidhaltigen Strukturen. Teliosporen der Infektion FB1 x SH26 wurden in $\text{YEPS}_{\text{light}}$ -Flüssigmedium bei 28°C inkubiert (200 r.p.m.). Nach ungefähr 15 h bis 24 h Inkubation wurden mit Beginn der Keimung die probasidiale Strukturen mit dem lipidkörperspezifischen Farbstoff Nile Red gefärbt (M&M) und die licht- und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Größenbalken ist auf alle Bilder bezogen.

Um zu testen, ob haploide Sporidien *ssp1*-defizienter Stämme einen Defekt in der Fettsäureverwertung besitzen, wurde das Wachstum von *ssp1*-Deletionsmutanten auf Medien mit Linolsäure (*cis*-9, *cis*-12-Octadecadiensäure), dem Substrat der Linoleat-Diol-Synthase, bzw. Ölsäure (*cis*-9 Octadecensäure) als einzige Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Die *ssp1*-Deletionsstämme SH1 Δ *ssp1*-4 und SH2 Δ *ssp1*-I sowie deren Ausgangsstämme FB1 und FB2 wurden in NM-0.5% glc Flüssigmedium bis OD₆₀₀ ~ 0.6 angezogen, in H₂O_{bidest} gewaschen, auf NM-Festmedium mit 0.1 % Linolsäure bzw. 0.1 % Ölsäure (gelöst in 0.5% Tween 20) plattiert und inkubiert. Es zeigte sich, dass *U. maydis* bereits auf den Kontrollplatten, welche nur 0.5% Tween 20 enthielten, wachsen konnte (nicht gezeigt).

Da aus diesem Grund keine Aussage über die Verwertung von Öl- bzw. Linolsäure in *ssp1*-defizienten Stämmen getroffen werden konnte, sollte als Nächstes untersucht werden, ob die *ssp1*-Expression in haploiden Zellen durch Kultivierung auf fettsäurehaltigem Medium induzierbar ist. Zu diesem Zweck wurde der Stamm SH26 auf NM-Festmedium mit 0.1 % Linolsäure bzw. 0.1 % Ölsäure gelöst in 0.5% Tween 20 kultiviert. Als Kontrolle wurde SH26 auf NM-Festmedium mit 0.5% Tween 20 inkubiert. Des Weiteren diente der Ausgangsstamm FB2 als Kontrolle. Im Vergleich zu SH26 nach Kultivierung auf dem Kontrollmedium (NM-Festmedium mit 0.5% Tween 20) konnte in SH26 nach Inkubation auf den fettsäurehaltigen Medium keine Induktion der Ssp1-eGFP Expression detektiert werden (nicht gezeigt).

2.8 Analyse der UV-Mutante MR25-1

2.8.1 Die UV-Mutante MR25-1 zeigt eine Derepression der *ssp1*-Genexpression

Die bereits unter Punkt 2.6.2 eingeführten Gene *hda1* und *rum1* wurden beide in einem Ansatz zur Isolierung von Komponenten der b-abhängigen Regulationskaskade als Repressoren eines bestimmten Sets an Genen identifiziert (M. Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung; Quadbeck-Seeger et al., 2000). In diesem experimentellen Ansatz wurden nach UV-Mutagenese des haploiden Stammes FB1 (*a1 b1*) Mutanten isoliert, welche die Endoglucanase (EGI) Egl1 (Schauwecker et al., 1995), deren transkriptionelle Expression normalerweise die Anwesenheit eines aktiven bE/bW Heterodimers erfordert, sekretieren konnten. Diese EGI-Aktivität kann in einem einfachen Test nachgewiesen werden (M&M; Schauwecker et al., 1995). Werden EGI-sekretierende Zellen auf carboxymethylcellulosehaltigem Festmedium kultiviert, so bewirkt das sezernierte Enzym den Abbau der Carboxymethylcellulose (CMC). Die anschließende Inkubation mit einer Kongo-Rot Lösung färbt nur CMC-haltige Bereiche des Agars und hinterlässt weiße Höfe um die EGI-aktiven Kolonien.

In diesem Ansatz konnten noch weitere Mutanten isoliert werden, die neben EGI-Aktivität auch die Deregulation b-abhängig exprimierter Gene zeigten (M.Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung). Da die Möglichkeit bestand, dass unter diesen Mutanten weitere Gene für die negative Regulation von *ssp1* betroffen sein könnten, wurde die *ssp1*-Expression in den Mutanten MR1-1, MR2-1, MR7-1, MR8-1, MR11-1, MR12-1, MR15-1, MR23-1, MR25-1 und MR28-1 untersucht.

Die folgenden Northern Analysen zeigten neben der erwarteten Induktion der *ssp1*-Transkription in FB1 Δ *hda1* eine Deregulation der *ssp1*-Expression in den Mutanten MR7-1 und MR25-1 (Abb. 26). Da der Stamm MR7-1 sich im Vergleich zu MR25-1 nach der Protoplastierung nicht mehr regenerieren ließ (M.Reichmann, pers. Mitteilung), schied er für eine weitere Bearbeitung aus. Um zu zeigen, dass die EGI-Aktivität der UV-Mutante MR25-1 nicht durch *hda1* komplementierbar ist, wurde die Mutante mit dem frei-replizierenden Plasmid p9-1-14 (M.Reichmann, pers. Mitteilung, M&M), welches das *hda1*-Gen unter der Kontrolle des natürlichen Promoters trägt, transformiert. Es konnte gezeigt werden, dass die EGI-Aktivität der Mutante MR25-1 nicht mit der Histondeacetylase Hda1 komplementierbar ist (nicht gezeigt).

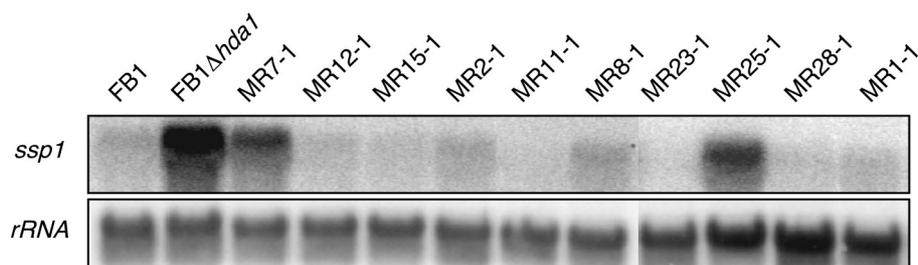


Abb. 26: *ssp1*-Expressionsanalyse. Der Stamm FB1 Δ *hda1* sowie die haploiden UV-Mutanten MR1-1, MR2-1, MR7-1, MR8-1, MR11-1, MR12-1, MR15-1, MR23-1, MR25-1 und MR28-1 sowie deren Ausgangsstamm FB1 (*a1 b1*) wurden in CM-glc Flüssigmedium bis $OD_{600} \sim 0.6$ inkubiert, in einer Dichte von $0.1 OD_{600}/cm^2$ auf aktivkohlehaltigem CM-glc Festmedium ausgestrichen, für 48 h bei $28^\circ C$ kultiviert und die Zellen anschließend für RNA-Präparationen geerntet. Für die Northern Analysen wurde jeweils ungefähr 20 μg Gesamt-RNA aufgetrennt. Als *ssp1*-spezifische Sonde wurde ein 1091 bp großes *HpaI-BamHI* Fragment aus dem offenen Leserahmen von *ssp1* gewählt (M&M). Die Hybridisierung mit einem für *U. maydis* 18S rRNA spezifischen Oligonukleotid diente als interne RNA-Mengenkontrolle.

2.8.2 Die Mutante MR25-1 besitzt einen Zellteilungsdefekt

Zur mikroskopischen Analyse wurde MR25-1 in PD-Flüssigmedium inkubiert. Eine photometrische Bestimmung der Zelldichte war bei MR25-1 nicht möglich, da die Zellen im Flüssigmedium sichtbare Aggregate bildeten. Die mikroskopische Analyse zeigte einen signifikanten morphologischen Unterschied zu den zigarrenförmigen haploiden Sporidien des Kontrollstammes (Abb. 27). Die Zellen des Stammes MR25-1 besaßen einen Defekt bei der

Abschnürung der Tochterzellen, welche verlängerte und filamentartige Strukturen bildeten, die aber nicht einer klassischen "Bäumchenstruktur" entsprachen.



Abb. 27: Mikroskopische Analyse der UV-Mutante MR25-1. Die UV-Mutante MR25-1 wurden nach Inkubation in PD-Flüssigmedium (28°C, 200 r.p.m.) lichtmikroskopisch (DiC) untersucht (M&M).

2.8.3 Ansätze zur Komplementation des Phänotyps „Endoglukanase-Sekretion“ der UV-Mutante MR25-1

Um zu untersuchen, ob der EGI-Phänotyp der Mutante MR25-1 auf dem Effekt einer einzelnen Mutation beruht, wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt. Wenn eine einzige Mutation für den EG-Phänotyp verantwortlich ist, sollte nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen die Hälfte der haploiden Meioseprodukte EGI-Aktivität besitzen. Teliosporen einer MR25-1 x FB2 Infektion wurden auf PD-Festmedium (150μg Ampicillin/ml) plattiert. Nach 36 h Inkubation bei 28°C wurden die Meioseprodukte einer gekeimten Teliospore auf PD-Festmedium vereinzelt. Anschließend wurden 22 Einzelkolonien, die aus den Meioseprodukten einer einzelnen gekeimten Spore abstammten, in PD-Flüssigmedium überführt, Ü/N bei 28°C kultiviert und die einzelnen Kulturen auf CMC-Festmedium getropft. Von den insgesamt 22 Klonen zeigten 9 EGI-Aktivität (nicht gezeigt). Als Kontrolle wurde die Segregation des *a*- und *b*-Locus in diesen Klonen untersucht, wobei eine Aufspaltung im Verhältnis 1:1:1:1 erwartet wird. Der Kreuzungstest ergab die Aufspaltung (3) x *alb1*; (10) x *a2b2*, (5) x *alb2*, (4) x *a2b1*, was unter Einbezug der möglichen experimentellen Varianz den erwarteten Werten entspricht (nicht gezeigt).

In einem Ansatz zur Komplementation des EGI-Phänotyps der Mutante MR25-1 wurden verschiedene *U. maydis* Genbanken verwendet. Die *U. maydis* pCM54-Plasmidbank beinhaltet ca. 8 kb große genomische DNA-Fragmente auf frei replizierenden Vektoren (M&M; Bauchwitz und Holloman, 1990). Da nicht auszuschließen ist, dass ein 8 kb großer Bereich für die Komplementation nicht ausreichend sein könnte, wurden zusätzlich eine integrative und eine frei replizierende *U. maydis* Cosmidbank verwendet (M&M) (Bölker et al., 1995a; G. Weinzierl, 2001). Nach Transformation der entsprechenden Plasmide bzw.

Cosmide in MR25-1 Protoplasten wurden die erhaltenen Transformanten auf den entsprechenden PD-Selektionsmedien ausgestrichen und anschließend auf EGI-Aktivität getestet (M&M). Insgesamt wurden unter Verwendung der frei replizierenden Cosmidbank ca. 4000 Transformanten, der integrativen Cosmidbank ca. 2500 und mittels der pCM54 Bank ca. 12500 Transformanten erhalten und analysiert. Leider zeigte keine der getesteten Klone eine eindeutige Komplementation des EGI-Phänotyps.

3. Diskussion

In dieser Arbeit wird die Identifizierung des Proteins Ssp1 beschrieben, dessen Bildung spezifisch mit der Reifung sexueller Teliosporen zum Ende des pathogenen Entwicklungsprozesses in *Ustilago maydis* korreliert. Ssp1 wird im Verlauf der vegetativen Lebensphase des Pilzes nur schwach exprimiert, wogegen es im Tumorgewebe zu einer starken Induktion der *ssp1*-Transkription kommt. Das Gen *ssp1* unterliegt einer komplexen entwicklungsabhängigen Regulation, die neben stadienspezifischer, chromatinvermittelter Repression sowie möglichen stadienspezifischen Aktivatoren auch Einflüsse des cAMP-Signalwegs mit einbezieht.

Ssp1 besitzt Ähnlichkeiten zu hämhaltigen eukaryotischen Dioxygenasen. Diese Enzyme katalysieren die Oxygenierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren. In frühen probasidialen Strukturen lokalisiert Ssp1 auf der Oberfläche lipidhaltiger Organellen.

3.1. Isolierung des stadienspezifisch exprimierten Proteins Ssp1

Zur Isolierung eines sporenspezifisch exprimierten Proteins wurden die Proteinexpressionsprofile haploider Sporidien und diploider Teliosporen verglichen. Auf diesem Weg konnte Ssp1 als Hauptproteinbande in reifen Sporen identifiziert werden. In haploiden Sporidien war kein entsprechend prominentes Protein eines ähnlichen Molekulargewichts zu detektieren. Über einen revers-genetischen Ansatz wurden nach der Bestimmung der Aminosäuresequenz unterschiedlicher Ssp1-Peptide (Dr. F. Lottspeich; MPI für Biochemie in Martinsried) und der Erstellung entsprechender degenerierter Oligonukleotide Teile des Ssp1-kodierenden Gens aus dem *U. maydis* Genom isoliert. Das Molekulargewicht des von *ssp1* abgeleiteten Proteins entspricht mit 114 kDa der Größe des ursprünglich isolierten Proteins. Da diese 114 kDa große Bande in *ssp1*-defizienten Sporen nicht mehr zu detektieren ist, gilt es als gesichert, dass das isolierte Gen für Ssp1 kodiert. Durch den Austausch des endogenen *ssp1*-Gens gegen das Gen für das grün fluoreszierende Protein (*eGFP*) als *in vivo* Reportersystem konnte eine Induktion der Reporteraktivität ausschließlich in reifen Sporen detektiert werden. Auch ein Hybridprotein bestehend aus einer translationalen Ssp1-eGFP Fusion konnte nur in reifen Sporen detektiert werden. So wurde mit Ssp1 zum ersten Mal ein Protein aus *U. maydis* identifiziert, dessen Expression spezifisch bei der Reifung der sexuellen Sporen induziert wird.

3.2 Multifaktorielle Regulation von *Ssp1*

3.2.1 Die positive Regulation der *ssp1*-Expression während der biotrophen Phase

Die Charakterisierung des regulatorischen 5'-Bereichs von *ssp1* eröffnet interessante Einblicke in die transkriptionelle Kontrolle des *ssp1*-Gens während der vegetativen und pathogenen Entwicklung des Pilzes (Abb 28). Für eine zur Wildtypsituation vergleichbare, stadienspezifische Proteinexpression ist ein 2589 bp großes *ssp1*-Promotorfragment ausreichend. Die transkriptionelle Funktionalität dieses 2589 bp großen *ssp1*-Promotorfragments besteht auch außerhalb des natürlichen chromosomalen Kontexts.

Die Identifizierung zweier positiv-regulatorischer Bereiche im *ssp1*-Promotor unterstützt die Hypothese eines möglichen (oder auch mehrerer) stadienspezifischer Aktivatoren der *ssp1*-Expression. In Eukaryoten wird die zeitlich- und genspezifische Transkriptionsregulation meist über ein komplexes Netzwerk *cis*-aktiver Kontrollelemente vermittelt (Merika und Thanos, 2001; Struhl, 2001; Struhl, 1999). Diese Enhancer sind relativ kurze DNA-Regionen, die multiple Proteinbindestellen für Transkriptionsaktivatoren besitzen. Nach der Bindung stimulieren diese Aktivatoren die Gentranskription, indem sie den RNA-PolymeraseII-Komplex und chromatinmodifizierende Proteine zum Basalpromotor rekrutieren (Struhl, 1999; Struhl, 1999). Die Deletion des Bereichs von Position -2589 bis -2143 stromaufwärts von *ssp1* zeigt keinen Effekt auf die Genexpression während der saprophytischen Phase, korreliert aber mit einem dramatischen Verlust der Proteinexpression in den reifen Teliosporen. Da die verbleibende Promotoraktivität noch immer stadienspezifisch reguliert wird, und erst ein Promotorfragment, welches den Bereich von -630 bis +1 umfasst, *in planta* inaktiv ist, könnte das im Bereich -2589 bis -2143 positionierte Element eine „enhancer“-ähnliche Funktion besitzen, wobei ein synergistischer Effekt mit dem Sequenzelement zwischen den Positionen -1062 und -630 nicht ausgeschlossen werden kann. Die Fusion der 455 bp Sequenz, welche die Positionen -2589 bis -2143 des *ssp1*-Promotors beinhaltet, an das Fragment -1869 bis bp +1, das selbst nur eine sehr schwache Genexpression in Sporen vermitteln kann, erhöht die transkriptionelle Aktivität dieses Fusionspromotors um ein Vielfaches. Dennoch entspricht die Expressionsstärke nicht derjenigen, welche durch das 2589 bp große Ausgangsfragment erhalten wird. Dies könnte bedeuten, dass die räumliche Positionierung der positiven regulatorischen Elemente innerhalb des *ssp1*-Promotors eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Fusion des DNA-Bereichs -2589 bp bis -2143 bp stromaufwärts von *ssp1* an den *U. maydis mfa1*-Basalpromotor führt *in vivo* zu keinem sporenspezifischen Expressionsmuster. Möglicherweise wirken zusätzliche regulatorische Sequenzen im *ssp1*-Promotor synergistisch mit dem Bereich -2589 bp bis -2143 bp. Eine derartige Rolle könnte das Promotorelement zwischen den Positionen -1062 und -630 übernehmen. Auch im Promotorbereich des Gens *mig1* (maize induced gene) konnten

Sequenzbereiche identifiziert werden, die in die positive Regulation des Gens *in planta* involviert sind (Basse et al., 2000). Die Expression von *mig1* erfolgt nach der Penetration der Wirtspflanze und endet mit der Ausbildung sporogener Hyphen. Über die Natur der positiven Regulationsmechanismen, die auf den *mig1*-Promotor wirken, ist bislang noch nichts bekannt.

3.2.2 Die negative Regulation der *ssp1*-Expression wird von der saprophytischen Phase bis zur Sporenreifung aufrecht erhalten

Die Analyse des *ssp1*-Promotors führte zur Identifizierung eines negativ-regulatorischen Elements zwischen den Positionen –1655 und –1062 (Abb. 28). Desweiteren resultiert die Deletion der Histondeacetylase Hda1 in einer Derepression der *ssp1*-Expression. Interessanterweise konnte ein Effekt des negativ-regulatorischen Elements, analog zur Situation in *hda1*-defizienten Stämmen, nur während der saprophytischen Phase beobachtet werden.

Eine potenzielle Verbindung zwischen der Hda1-vermittelten Repression und dem kartierten negativ-regulatorischen Element im *ssp1*-Promotor erscheint möglich. Diese Hypothese wird durch eine auf das 2589 bp große *ssp1*-Promotorfragment wirkende Derepression in *hda1*-Mutanten gestützt. Einen genauen Aufschluss über diese Frage würde eine Analyse entsprechender Promotordeletionen in *hda1*-defizienten Stämmen erbringen.

Im Verlauf der biotrophen Entwicklung führt weder der Verlust von Hda1 noch die Deletion des *cis*-aktiven, negativ-regulatorischen Elements zu einer mit Sporen vergleichbaren *ssp1*-Expression während der Präsporulationsstadien im Tumor. Hieraus könnte geschlossen werden, dass andere negative Regulatoren für die Aufrechterhaltung der Repression während der Präsporulationsstadien verantwortlich sind. Folglich müsste dann aber ein anderer negativ-regulatorische Bereich im *ssp1*-Promotor für die spezifische Repression *in planta* verantwortlich sein. Eine Erklärung bietet folgendes Modell (Abb. 28): In der saprophytischen Lebensphase erfolgt die Repression von *ssp1* über die Aktivität der potentiellen Histondeacetylase Hda1, da sich gleichzeitig transkriptionsaktivierende Komponenten in der Zelle befinden, die auch die *ssp1*-Expression beeinflussen können. Diese müssen jedoch nicht mit den postulierten stadienspezifischen Aktivatoren übereinstimmen. In *hda1*-defizienten Stämmen wird es diesen Faktoren ermöglicht, die *ssp1*-Expression zu induzieren. Während der biotrophen Phase bis zur Sporenreifung sind diese postulierten positiven Regulatoren inaktiv oder nicht mehr vorhanden. In diesem Stadium spielt auch die durch Hda1 vermittelte Repression im *ssp1*-Promotor keine Rolle mehr. Möglicherweise verhindert stattdessen ein hypothetischer stadienspezifischer Repressor an unbekannter Stelle im Promotorbereich von Position –630 bis +1 die Expression des Gens. Zu Beginn der Sporenreifung wird diese hypothetische Repression aufgehoben und gleichzeitig die *ssp1*-Expression durch postulierte (stadienspezifische) Aktivatoren, die vielleicht synergistisch auf die identifizierten Promotorelemente der Positionen –2589 bis –2143 und –1062 bis –630

wirken, induziert. Für einen im Bereich zwischen –630 bp bis +1 wirkenden negativen Regulationsmechanismus spricht, dass in allen zur Promotorcharakterisierung verwendeten *eGFP*-Reporterstämmen, ausgenommen derjenigen, die das Promotorfragment –630 bis +1 tragen, ausnahmslos eine stadienspezifische *eGFP*-Expression in reifen Sporen detektiert wird. Durch die Deletion der kartierten positiv-regulatorischen Sequenzen im *ssp1*-Promotor geht die stadienspezifische Expression verloren, weswegen das Fragment –630 bis +1 keine Transkription des Reportergens mehr vermitteln kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die postulierten Aktivatoren während der Präsporulationsstadien *in planta* zwar präsent sind, aber auf Grund der Repression nicht agieren können.

Hda1 aus *U. maydis* weist Homologie zur Histondeacetylase (HDAC) Rpd3 aus *S. cerevisiae* sowie zu Rpd3-ähnlichen HDACs aus Säugern auf (M. Reichmann, A. Jamnischek, J. Kämper, pers. Mitteilung). Das Gen *hda1* wurde in einem Ansatz zur Isolierung von Komponenten der b-abhängigen Regulationskaskade als Repressor eines definierten Sets an Genen identifiziert (M. Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung). HDACs modifizieren Histonproteine in entsprechenden Zielpromotoren an deren flexiblen N-Termini durch die Deacetylierung frei liegender, konservierter Lysinreste (Rundlett et al., 1998; Struhl, 1999). Durch diese Hypoacetylierung werden lokale Abschnitte „reprimierten“ Chromatins gebildet. Vermutlich wird die Mobilität der Nukleosomen im Promotor behindert, was zu einer Stabilisierung des einzelnen Nukleosoms in der übergeordneten Chromatinstrukturen führen könnte. Die resultierende Repression ist vermutlich eine Folge des Verdrängens oder des Ausschlusses der basalen Transkriptionsmaschinerie von der DNA (Jones et al., 1998; Kass et al., 1997).

HDACs agieren als Co-Repressoren in multifaktoriellen Proteinkomplexen. Ein bekanntes Beispiel ist der Sin3-Repressorkomplex aus Säugern und der Bäckerhefe (zusammengefasst in Ahringer, 2000; Knoepfler und Eisenman, 1999). Dieser Komplex, der die zu Rpd3 aus Hefe homologen Histondeacetylase HDAC1 und HDAC2 enthält, wird durch spezifische DNA-bindende Komponenten an regulatorische Sequenzen der entsprechenden Promotoren geführt (Kadosh und Struhl, 1998; Rundlett et al., 1996; Bird und Wolffe, 1999; Knoepfler und Eisenman, 1999). Es ist gezeigt, dass der Rpd3-Komplex in *S. cerevisiae* durch den Co-Repressor Ume6 an die DNA rekrutiert werden kann (Kadosh und Struhl, 1998; Rundlett et al., 1998). Ferner benötigt die Assoziation der Histondeacetylase HDAC2 aus Säugern mit mSin3 (mammalian Sin3) eine konservierte Region im mSIN3-Protein, damit die transkriptionelle Repression vermittelt werden kann (Laherty et al., 1997). Es wird vermutet, dass Sin3 selbst eine Funktion als Gerüstprotein des multifaktoriellen Repressorkomplexes zukommt. Des weiteren besteht die Hypothese, dass der Mad-Max Komplex in Säugern den mSin3-HDAC Co-Repressorkomplex rekrutiert, da bekannt ist, dass Mad1p einen Komplex mit mSin3 und HDAC2 eingehen kann (Laherty et al., 1997). Eine weitere Komponente des Sin3-Repressorkomplexes ist SAP30, das wahrscheinlich in die Kopplung des Sin3-

Komplexes an weitere Repressoren wie z.B. N-CoR vermittelt (Laherty et al., 1998), sowie histonbindende Faktoren (zusammengefasst in Ahringer, 2000).

Die Lösung zur Frage nach weiteren Komponenten des in die *ssp1*-Repression involvierten Histondeacetylasekomplexes könnte in der UV-Mutante MR25-1 liegen. Diese Mutante konnte im gleichen Ansatz wie die durch *hda1* komplementierbare UV-Mutante isoliert werden (M. Reichmann und J. Kämper, pers. Mitteilung), und trägt keine Mutation in *hda1*, da der Phänotyp „Endoglukanase-Sekretion“ in MR25-1 nicht mit Hda1 komplementierbar ist (nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass in MR25-1 eine weitere Komponente des Hda1-Repressorkomplexes betroffen ist. Dabei könnte es sich sowohl um Faktoren handeln, die den hypothetischen Hda1-Repressorkomplex an die jeweiligen Zielpromotoren rekrutiert oder die Stabilität des Komplexes beeinflussen. In MR25-1 ist im Gegensatz zu *hda1*-defizienten Stämmen eine Induktion des Gens *pig3* (plant induced gene 3; Aichinger, 2000) zu beobachten, das ebenfalls während der biotrophen Lebensphase des Pilzes exprimiert wird (nicht gezeigt). Dieser Befund läßt vermuten, dass die in MR25-1 betroffene Komponente zusätzliche Funktionen erfüllen könnte.

3.2.3 Die aktive cAMP-Signalkaskade beeinflusst die *ssp1*-Expression

Nach Pheromonstimulation haploider Zellen kann eine Induktion der *Ssp1*-Expression nachgewiesen werden. Schon in früheren Arbeiten wurde eine Verbindung zwischen dem Pheromonsignal und dem cAMP-Signalweg in *U. maydis* diskutiert (Krüger et al., 1998). Letzterer spielt für die pathogene und sexuelle Entwicklung des Pilzes eine wichtige Rolle (Krüger et al., 1998; Regenfelder et al., 1997; Gold et al., 1997b; Gold et al., 1994). In haploiden *ubc1*-defizienten Stämmen kann eine starke Induktion der *ssp1*-Transkription beobachtet werden. Der Verlust der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A ermöglicht es der katalytischen Untereinheit *Adr1* potenzielle Zielproteine zu phosphorylieren, was mit dem Zustand einer konstitutiv aktiven Signalkaskade vergleichbar ist.

Eine Erklärung für die *ssp1*-Expression in haploiden *ubc1*-Mutanten könnte die Aktivierung möglicher positiver Regulatoren der *ssp1*-Transkription durch die aktive katalytische Untereinheit der PKA, *Adr1*, sein. Dies setzt allerdings die Aufhebung der *Hda1*-vermittelten Repression des *ssp1*-Promotors, z. B. durch die Phosphorylierung hypothetischer Komponenten des *Hda1*-Repressorkomplexes durch *Adr1*, was dessen Inaktivierung zur Folge hat, voraus. Eine Hypothese wäre, dass es sich bei dem postulierten Aktivator der *ssp1*-Transkription in $\Delta ubc1$ -Stämmen um den für die stadienspezifische Expression von *ssp1* verantwortlichen Faktor handeln könnte. Möglicherweise wird dieser hypothetische stadienspezifische Aktivator auch in der natürlichen Situation während der biotrophen Phase in Abhängigkeit vom cAMP-Signalweg exprimiert (Abbildung 28).

3.2.4 Modell der Regulation von *ssp1*

Auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wurde das in Abbildung 28 gezeigte Modell zur Regulation von *ssp1* erstellt. Während der saprophytischen Lebensphase (Abb. 28 A) wird die *ssp1*-Expression durch die Aktivität der potenziellen Histondeacetylase *Hda1* am *ssp1*-Promotor reprimiert. Möglicherweise wirkt die *Hda1*-vermittelte Repression auf das negativ-regulatorische Element zwischen Position –1655 und 1062. Die in der UV-Mutante MR25-1 getroffene, hypothetische Komponente MR25-1p könnte einen Faktor des postulierten multifaktoriellen *Hda1*-Repressionskomplexes darstellen. Im Verlauf der biotrophen Lebensphase vor der Reifung der Teliosporen ist *Hda1* nicht mehr für die Repression von *ssp1* verantwortlich, sondern ein weiterer hypothetischer Repressor, der möglicherweise auf ein Element im *ssp1*-Promotorbereich zwischen Position –630 und +1 wirkt (Abb 28 B). In die sporenspezifische Expression von *Ssp1* (Abb 28 C) ist neben der Derepression des *ssp1*-Promotors aller Wahrscheinlichkeit nach eine (oder mehrere) hypothetische aktivierende Komponente involviert, die vermutlich synergistisch auf

Promotorelemente im Bereich -2589 bis -2143 und -1062 und -630 wirkten. Diese postulierten Aktivatoren werden vielleicht stadienspezifisch, möglicherweise in Abhängigkeit der cAMP-Signalkaskade, exprimiert und/oder liegen während der Präsporulationsstadien in einem inaktiven Zustand vor.

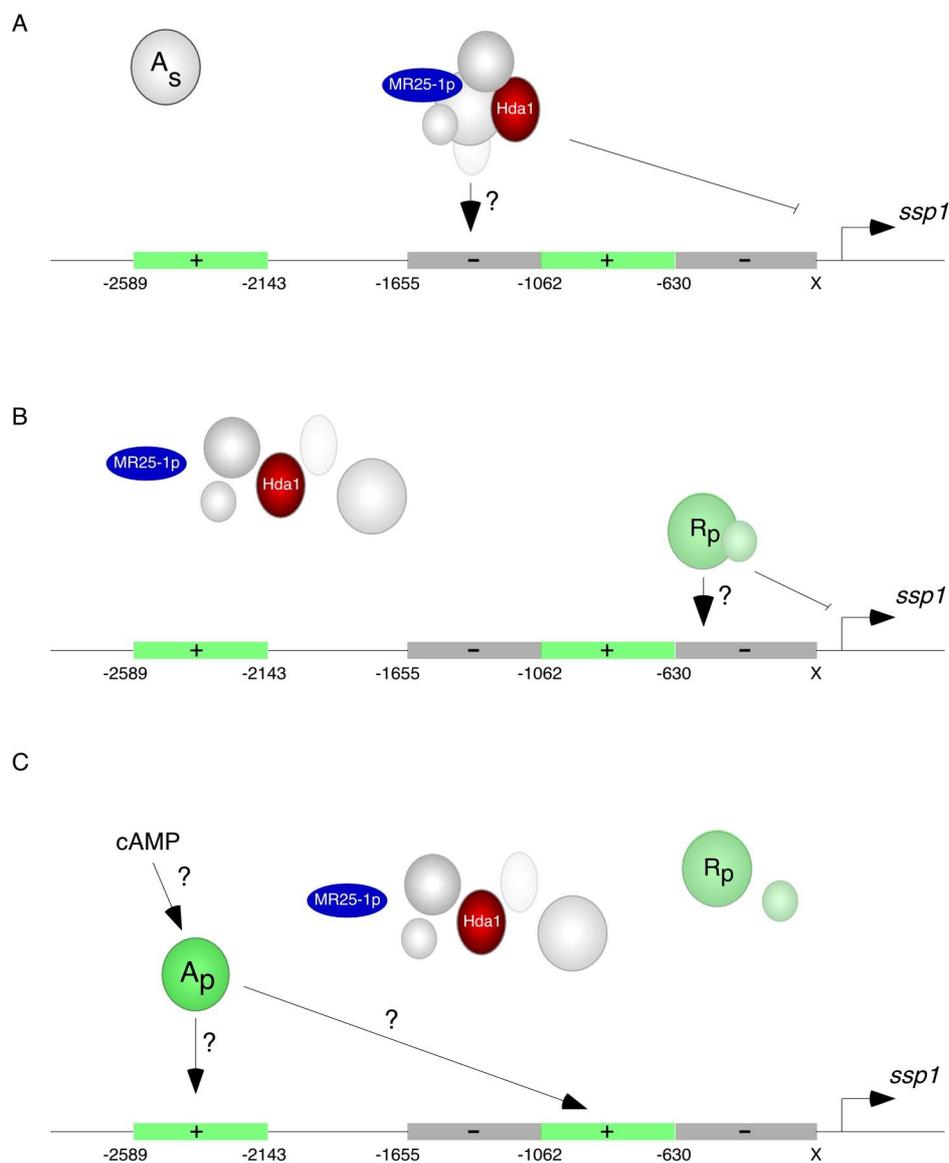


Abb. 28: Modell zu Regulation von *ssp1*. Die beiden grünen Balken symbolisieren die in die positive Regulation involvierten Sequenzbereiche des *ssp1*-Promotors, die grauen Balken die negativ-regulatorischen Elemente. Die Nukleotidpositionen sind eingezeichnet. Hda1 steht für die Histondeacetylase Hda1; MR25-1p für einen postulierten zusätzlichen Faktor; R_p für einen hypothetischen, während der Präsporulationsstadien agierenden Repressor; A_s für einen postulierten Aktivator während der saprophytischen Phase, A_p für einen hypothetischen Aktivator zur stadienspezifischen Induktion von *ssp1*. cAMP symbolisiert den Einfluss der cAMP-Signalkaskade. Unter (A) ist die hypothetische Situation in haploiden Sporidien, unter (B) die in Präsporulationsstadien und unter (C) in den reifen Sporen dargestellt.

3.2.5 Ansätze zur Untersuchung der Teliosporenbildung in *Ustilago maydis*

Bis heute kann noch keine genaue Aussage über die genetische Regulation während der sexuellen Entwicklung von *U. maydis in planta* getroffen werden. Da bei *U. maydis* die Schwierigkeit besteht, dass der sexuelle Zyklus *in vitro* nicht vollzogen werden kann, stellen in Teliosporen differenziell exprimierte Gene ideale molekulare Marker zur Aufklärung des Sporulationsprogramms dar, da unter Verwendung derartiger stadienspezifischer Reporter in genetischen „Screens“ entsprechende Entwicklungsregulatoren unter Umgehung der biotrophen Phase isoliert werden könnten. In *S. cerevisiae* wurden über einen Mutageneseansatz, in dem Fusionskonstrukte aus sporulationsspezifischen Promotoren und dem *lacZ*-Reportersystem verwendet wurden, verschiedenen Klassen von Sporulationsmutanten charakterisiert (Gurvitz et al., 1993).

Vermutlich liegt dem Sporulationsprogramm in *U. maydis* analog zur Konidienbildung in *A. nidulans* oder zur Sporulation in *S. cerevisiae* ein zentraler Regulationsweg zu Grunde, der für die zeitlich richtige Abfolge der Expression entwicklungspezifischer Gene verantwortlich ist (Boylan et al., 1987; Mirabito et al., 1989; Adams et al., 1998, Chu et al., 1998; Chu und Herskowitz, 1998). Mit *spl* konnte in *U. maydis* zum ersten Mal ein Gen identifiziert werden, das man in Analogie zur Klassifizierung der Genexpression im Verlauf der Sporulation von *S. cerevisiae* zu den „späten“ („late“) Genen rechnen würde. Interessanterweise konnten in der Bäckerhefe nur fünf Gene dieser Klasse identifiziert werden (Chu et al., 1998). Eines dieser Gene, *SPS100*, wurde bereits in einem differenziellen Hybridisierungsansatz isoliert (Law und Segall, 1988). Für die Aktivierung der späten Gene ist der Faktor Ume6, der auch eine Komponente des Rpd3-Sin3 Repressorkomplexes darstellt (siehe 3.3.4), und der meiosespezifische Transkriptionsfaktor Ndt80 (siehe 1.5) nötig. Da keine der bekannten Bindestellen dieser Faktoren in den regulatorischen Sequenzen der späten Gene vorhanden sind, werden diese wahrscheinlich nicht direkt von diesen Faktoren reguliert. (Chu et al., 1998; Chu und Herskowitz, 1998; Vershon und Pierce, 2000). Auch Komponenten der meiosespezifischen MAP-Kinase Kaskade verändern die Expression der späten Gene (Krisak et al., 1994; Vershon und Pierce, 2000). Ob ähnliche Faktoren auch in die Regulation „später“ Sporulationsgene in *U. maydis* eingreifen, müssten zukünftige Experimente klären.

3.3 Funktion von Ssp1

3.3.1 Ssp1 besitzt Homologie zu eukaryotischen Fettsäuredioxygenasen

Ssp1 besitzt signifikante Ähnlichkeit zu Linoleat-Diol-Synthase (LDS), einer hämhaltigen Linoleat-8-Dioxygenase des phytopathogenen Pilzes *Gaeumannomyces graminis* (Hornsten et al., 1999). LDS katalysiert die Bildung von 8*R*-Hydroperoxy-Linoleat (8*R*-HPODE) aus Linolsäure und Sauerstoff sowie die anschließende Isomerisierung zu 7*S*,8*S*-Dihydroxy-Linoleat (7*S*,8*S*-DiHODE) (Abb. 29) (Brodowsky et al., 1992; Su et al., 1998; Su und Oliw, 1996).

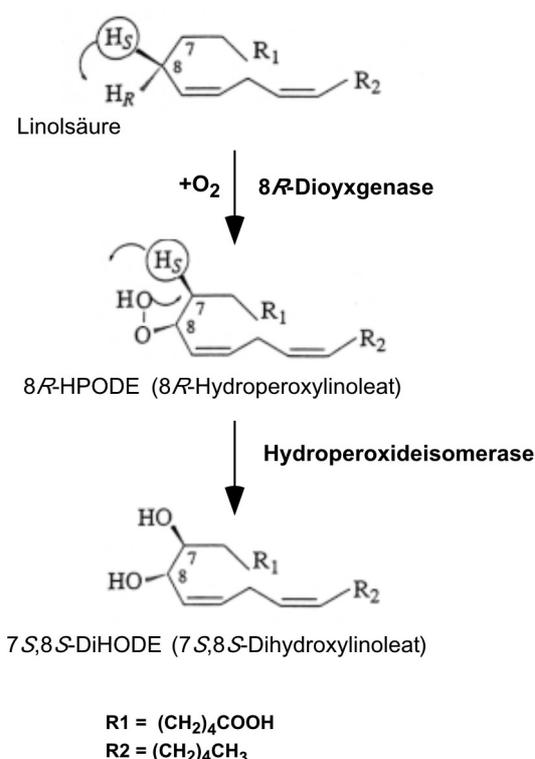


Abb. 29: Modell zur sequenziellen Oxygenierung von Linolsäure durch das Enzym Linoleat-Diol-Synthase (entnommen aus Su *et al.*, 1998). LDS vereint zwei enzymatische Aktivitäten, zum einen die einer Linolsäure-8-Dioxygenase und zum anderen eine Hydroperoxidisomerase. LDS abstrahiert das 8-pro-*S* Wasserstoffatom der Linolsäure, dem eine Insertion von molekularem Sauerstoff am C-8 zur Bildung von 8*R*-HPODE folgt. Im Anschluss wird 8*R*-HPODE zu 7*S*,8*S*-DiHODE isomerisiert.

Definierte Abschnitte von Ssp1 zeigen des Weiteren Ähnlichkeiten zu Prostaglandin-H₂-Synthasen (PGH-Synthasen) aus Säugern, die auch unter dem Begriff Cyclooxygenasen bekannt sind (Smith und DeWitt, 1995; Smith et al., 1996; Smith und Marnett, 1991). Die membranständigen PGH-Synthasen katalysieren den ersten Schritt der Prostaglandinbiosynthese, wobei aus Arachidonsäure durch eine initiale Oxygenierungs- und

eine nachfolgende Peroxidasereaktion Prostaglandin-H₂ gebildet wird (Smith et al., 1996). LDS besitzt trotz sehr ähnlicher katalytischer Eigenschaften auf Aminosäureebene nur 23 - 24 % Ähnlichkeit zu PGH-Synthasen (Hornsten et al., 1999). Hornsten *et al.* stellten die Hypothese auf, dass möglicherweise die Tertiärstruktur des Proteins und nicht die Aminosäuresequenz im Verlauf der Evolution konserviert wurde. Auch definierte Bereiche von *Ssp1* zeigen eine ca. 23%ige Homologie auf Aminosäureebene zu PGH-Synthasen (Abb. 7).

Sowohl bei LDS wie auch bei PGH-Synthasen handelt es sich um bifunktionelle Proteine, die sich zwar in ihrer zweiten katalytischen Funktion unterscheiden, aber eine sehr ähnliche initiale Oxygenierungsreaktion katalysieren (Elliott et al., 1986; Hamberg et al., 1994; Oliw et al., 1997; Oliw et al., 1993). Die Gemeinsamkeiten zwischen LDS und PGH-Synthase beschränken sich nicht nur auf ihre ähnlichen enzymatischen Reaktionsmechanismen. Beiden Enzymen ist Häm als prosthetische Gruppe wie auch die Bildung eines Tyrosylradikals im Verlauf der Katalyse gemeinsam. Hornsten *et al.* (Hornsten et al., 1999) postulierten auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit beider Proteine die in die Häm-Bindung involvierten Aminosäuren Histidin 207 und Histidin 388 der PGH-Synthase 1 (Schaf) (Picot et al., 1994) entsprechend in der Sequenz von LDS als Histidin 203 und Histidin 379 (Abb. 7). Die vermutliche Position des Tyrosinrests, der für die beobachtete Radikalbildung während der enzymatischen Aktivität von LDS verantwortlich ist (Su et al., 1998), wurde an Position 376 der Aminosäuresequenz postuliert (Hornsten et al., 1999). Im Sequenzvergleich zwischen LDS, *Ssp1* und den beiden abgeleiteten Proteinsequenzen aus *N. crassa* sind sowohl die genannten Histidin-Reste wie auch das Tyrosin an ihren Positionen konserviert (Abb. 7). Bis heute sind jedoch noch keine Berichte über Punktmutanten in den genannten konservierten Aminosäurepositionen der LDS bekannt.

Auf Grund der Homologie und unterstützt durch die Co-Lokalisierung von *Ssp1* mit lipidhaltigen Organellstrukturen liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei *Ssp1* um ein Protein mit potenzieller Fettsäuredioxygenase-Aktivität handeln könnte. Durch die Zugabe von Öl- und Linolsäure ins Nährmedium kann jedoch keine Induktion der *Ssp1*-Expression erreicht werden. Ein Beispiel, in dem Hydroxy-Derivate von Fettsäuren die Genexpression beeinflussen, konnte in dem phytopathogenen Pilz *Colletotrichum gloeosporioides* gezeigt werden (Kolattukudy et al., 1995). Sporen virulenter *Colletotrichum* Stämme beinhalten eine Cutinase. Nach Kontakt der Spore mit der Wirtspflanze wird Cutin, eine Hauptkomponente der pflanzlichen Kutikula, bestehend aus untereinander veresterten Hydroxy- und Epoxy-Derivaten von C16- und C18-Fettsäuren (Kolattukudy et al., 1987), in seine Monomere gespalten. Diese besonderen Fettsäurederivate bewirken die Expression des Cutinasesgens während des Keimungsprozesses (Podila et al., 1989).

Unter Berücksichtigung der Expressionsstärke von Ssp1 in reifen Sporen war es überraschend, dass *ssp1*-defiziente Stämme weder in der Ausbildung, Morphologie oder auch Keimungsfähigkeit der Teliosporen gestört waren. Auch die Überexpression des Ssp1-Proteins ließ keine Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion zu. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die zur Überexpression verwendeten Promotoren nicht annähernd die Expressionsstärke des *ssp1*-Promotors in Sporen vermittelt. Da bis heute weder in *G. graminis* noch in *N. crassa* Mutanten der zu Ssp1 ähnlichen Proteine bekannt sind, bleibt die Frage der biologischen Funktion unbeantwortet. Dass *ssp1*-Mutanten keinen detektierbaren Phänotyp besitzen, kann durch die Existenz von Proteinen mit redundanter Funktion erklärt werden. Möglicherweise könnten phänotypische Effekte *ssp1*-defizienter Stämme erst unter natürlichen Feldbedingungen zum Tragen kommen. Bis zum heutigen Tag ist ca. 93 % der genomischen Sequenz von *U. maydis* entschlüsselt. Dennoch finden sich keine zu Ssp1 ähnlichen Proteine in dieser Datenbank (J. Kämper, pers. Mitteilung).

Zur Klärung der Funktion von Ssp1 müsste die postulierte enzymatische Funktion sowie eine Substratspezifität untersucht werden. Da zur Ausbildung einer funktionellen PGH-Synthase eine Dimerisierung des Proteins nötig ist (Picot et al., 1994), und auch die Linoleat-Diol-Synthase als Homotetramer zu agieren scheint (Su et al., 1998; Su und Oliw, 1996), wäre es interessant zu untersuchen, ob auch Ssp1 derartige Dimerisierungseigenschaften besitzt und analog zu LDS und PGH-Synthasen eine Assoziation mit Häm als prosthetischer Gruppe besteht.

3.3.2 Funktion von pilzlichen Oxylipinen

Auf Grund der Homologie zu Linoleat-Diol- und PGH-Synthase sowie der Assoziation mit lipidhaltigen Organellen ist es wahrscheinlich, dass Ssp1 eine Rolle bei der Bildung von Oxylipinen, wie oxygenierte Derivate von gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren genannt werden, spielt. In Sporen und Keimungsstrukturen sind große Mengen an Lipidkörpern vorhanden (Ramberg und McLaughlin, 1980). Da Linolsäure, die das Substrat der Linoleat-Diol-Synthase darstellt, in Tumormaterial und in reifen Teliosporen fast 40% des Gesamtfettsäuregehalts ausmacht (Valverde et al., 1995; Gunasekaran et al., 1972), könnte Linolsäure in Analogie zu LDS ein mögliches Substrat für eine postulierte Dioxygenaseaktivität von Ssp1 darstellen.

Den bekannten pilzlichen Oxylipinen können nur in wenigen Fällen genaue Funktionen zugeschrieben werden (Herman, 1998). *U. maydis* sekretiert die glykosylierten C-16 Fettsäurederivate Ustilaginsäure A und B, die eine antibiotische Wirkung besitzen (Lemieux, 1953). *ssp1*-defiziente Stämme zeigen keinen Defekt in der Ustilaginsäurebildung (K. Josephs und M. Bölker, pers. Mitteilung), d. h. Ssp1 hat höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf

diesen Biosyntheseweg. In *G. graminis* entsteht durch die Dioxygenaseaktivität der Linoleat-Diol-Synthase das Zwischenprodukt 8*R*-HPODE, ein Hydroperoxid-Derivat der Linolsäure, welches im Anschluss über einem Nebenweg zu 8*R*-Hydroxy-Linolsäure (8*R*-HODE) reduziert werden kann (Brodowsky et al., 1992). Die Funktion dieser Fettsäurederivate in *G. graminis* ist noch unbekannt. Interessanterweise konnte 8*R*-HODE sowohl in *Laetisaria arvalis* wie auch in *A. nidulans* eine eindeutige, wenn auch vollkommen unterschiedliche Funktion zugeschrieben werden. In dem Basidiomyceten *L. arvalis* wurde 8*R*-HODE als „laetisaric acid“, ein Molekül mit antifungizider Wirkung, identifiziert. Durch die Sekretion von „laetisaric acid“ kommt es zu einer raschen Lyse der Hyphen anderer Pilze, wie z.B. dem Oomyceten *Phytophthora ultimum* (Bowers et al., 1986). In *A. nidulans* ist 8*R*-HODE identisch zu dem Sporulationshormon $\psi B\alpha$ aus der Klasse der ψ -Faktoren (precocious sexual inducers), einer Gruppe hydroxylierter Linolsäure- und Ölsäurederivate, welche die Entwicklung von Kleistothecien und Konidiophoren beeinflussen (Champe et al., 1987; Champe und el-Zayat, 1989; Mazur et al., 1990). Der Expressionszeitpunkt von *Ssp1* in reifen Sporen sowie dessen Lokalisierung könnte auf eine mögliche Funktion in der Biosynthese hypothetischer Sporulationshormone schließen lassen. Jedoch bleibt die Frage bestehen, warum in einem derartigen Fall postulierte Komponenten der Signalmolekülsynthese in einer so großen Menge exprimiert würden, wie es bei *Ssp1* der Fall wäre.

Dass die Deletion von *ssp1* keinen gravierenden Effekt auf die Keimungsfähigkeit der Sporen ausübt, könnte dadurch erklärt werden, dass alternative Biosynthesewege oder eine Verschiebung der Zusammensetzung möglicher Sporulationshormone mögliche Effekte überspielen können, ähnlich wie in *A. nidulans*, wo die Deletion der Oleat Δ -12 Desaturase *odeA*, welche die Umsetzung von Ölsäure (18:1) zu Linolsäure (18:2) katalysiert, in einer Änderung des Fettsäureprofils und damit auch der ψ -Faktoren resultiert (Calvo et al., 2001). *OdeA*-defiziente Stämme synthetisieren $\psi B1\alpha$ (8*R*-HODE) nur noch in sehr geringen Mengen, besitzen aber keine gravierenden Sporulationsdefekte.

Auch für Gattung *Tilletia*, einem nahen Verwandten der *Ustilago spec.*, konnte die Funktion von Lipiden als Bioregulatoren gezeigt werden (Tirone und Ching, 1971; Tirone et al., 1989; Tirone und Ross, 1988). Exogene Lipide auf der Oberfläche der Teliosporen von *Tilletia controversa*, deren Linolsäureanteil bei ca. 64% liegt, besitzen eine keimungshemmende Wirkung, die durch eine Behandlung mit Lipasen und der damit verbundenen Freisetzung der Fettsäuren noch erheblich gesteigert werden kann (Tirone und Ross, 1988). Der keimungsinhibierende Effekt von Fettsäurepräparationen aus *T. controversa* Teliosporen konnte nach Inkubation mit Lipoxygenasen und der dadurch resultierenden Bildung von Hydroperoxy-Fettsäurederivaten ebenfalls erhöht werden. In diesem System wird vermutet, dass unter natürlichen Bedingungen durch das langsame Entlassen von Fettsäuren oder deren oxygenierter Derivate, die flüchtige Signalstoffe darstellen könnten, aus der reifen Spore die

Keimungsrate verzögert und gleichzeitig die Infektionsperiode einer Sporenpopulation von *T. controversa* verlängert werden könnte (Tirone und Ross, 1988).

3.3.3 Mögliche Funktion von Ssp1 im Energiestoffwechsel

Die Vorstellung, dass Ssp1 eine mit lipidhaltigen Organellen assoziierte Dioxygenase darstellt, eröffnet auch die Möglichkeit, dass Ssp1 an der Mobilisierung von Speicherlipiden während der Sporenkeimung, analog zur Situation in pflanzlichen Ölsamen, beteiligt ist (Gerhardt, 1993; Feussner et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass mit Trilinoleat-13-Lipoxygenase (13-LOX) eine Fettsäuredioxygenase mit in den Ölsamen vorhandenen Lipidspeicherorganellen, den so genannten Lipidkörpern, assoziiert ist (Feussner et al., 2001; Feussner, 1996). Interessanterweise besitzt diese 13-LOX die Fähigkeit, veresterte Linolsäureketten ohne die vorherige Lipidhydrolyse am C-13 Atom zu oxygenieren, wodurch es zu einem starken Anstieg hydroperoxid-haltiger Triglyceridmoleküle innerhalb der Lipidkörper kommt (Feussner et al., 1997a; Feussner et al., 2001). Dem Modell nach werden diese oxygenierten Fettsäureanteile präferenziell von spezifischen Lipasen aus den Lipidkörpern freigesetzt (Stahl et al., 1995). Feussner *et al.* postulieren einen Abbauweg, in dem Hydroperoxy-Linolsäuren nach der Reduktion zu ihren entsprechenden 13-Hydroxy-Derivaten in die peroxisomale β -Oxidation eingeschleust werden (Feussner et al., 1997b). Die biologische Funktion der 13-LOX könnte in einer Kennzeichnung der zur Keimung benötigten Speichertriglyceride durch deren Oxygenierung liegen (Feussner et al., 2001). Analog zu diesem Szenario könnte Ssp1 eine ähnliche Rolle auf der Oberfläche der lipidhaltigen Organellen während der Sporenkeimung bekleiden. Falls in *U. maydis* neben dem klassischen lipolytischen Fettabbau ein untergeordneter, zum 13-LOX-Weg ähnlicher Mechanismus existiert, könnte dies erklären, warum die Deletion von Ssp1 keinen messbaren Effekt auf die Keimungsfähigkeit der Sporen ausübt. Interessanterweise konnte mit dem Programm „Propsearch“ (Hobohm und Sander, 1995) Ähnlichkeiten (mit einer Zuverlässigkeit von 99.6 %) zu verschiedenen, in pflanzlichen Samen vorkommenden Lipoxygenasen gefunden werden. Lipoxygenasen zählen wie das zu Ssp1 homologe Enzym Linoleat-Diol-Synthase zu den Fettsäuredioxygenasen, beinhalten aber kein Häm als prosthetische Gruppe, und unterscheiden sich in ihren enzymatischen Endprodukten (Su und Oliw, 1996, Su et al., 1998; Feussner und Kühn, 2000). Während Linoleat-Diol-Synthase zur Bildung von Hydroxy-Derivaten der Linolsäure führt, entstehen durch die Lipoxygenaseaktivität aus Linolsäure Hydroperoxy-Derivate mit einer konjugierten Doppelbindung, die erst zu Hydroxy-Linolsäure reduziert werden müssen. Die Enzymfamilie der Lipoxygenasen wurde in der Bäckerhefe, Pflanzen und Säugern intensiv untersucht. Mäuse mit Deletionen in Lipoxygenasen besitzen keine offensichtlichen Entwicklungs- oder Differenzierungsstörungen, und auch bei Pflanzen führt die Deletion einer oder mehrerer

Lipoxygenasen zu keinen gravierenden Veränderungen, was auf redundante Proteinfunktionen hindeuten könnte (Kuhn und Thiele, 1999, Feussner et al., 2001).

Die Mobilisierung von Speicherlipiden als Energiequelle spielt auch in der pilzlichen Sporenkeimung eine Rolle (Schadeck et al., 1998). In *Magnaporthe grisea* scheint die fortlaufende Generierung des Turgordrucks in den Appressorien durch die Akkumulation von Glycerol von dem Abbau gespeicherter Lipide und von der Induktion einer Lipaseaktivität abzuhängen (Thines et al., 2000). Interessanterweise unterliegt der Reservestoffabbau während der Appressorienbildung der Kontrolle einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (Thines et al., 2000).

3.4 Ausblick

Die sexuelle Sporenbildung in *U. maydis* stellt ein bislang nicht untersuchtes Entwicklungsstadium des Pilzes dar. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen es, in zukünftigen genetischen „Screens“ mit Hilfe des Gens *ssp1* als entwicklungsspezifischen Marker entsprechende regulatorische Mechanismen der Genregulation während der Sporogenese in *U. maydis* zu untersuchen. In solchen Ansätzen könnte z. B. nach dem Austausch des endogenen *ssp1*-Gens gegen das *eGFP*-Reportergen und der Transformation einer cDNA-Expressionsbank in einen haploiden Stamm, die aus Tumormaterial gewonnen wurde, entsprechende Regulatoren identifiziert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën und Roth bezogen:

Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37.5:1) (Roth)	Formaldehyd (37%) (Merck)
Agarose (SeaKem)	Formamid (Merck)
Aminosäuren (Calbiochem, Sigma, BIO101)	Galaktose (Serva)
Arabinose, L(-) (Sigma)	Glukose (Merck)
Ammoniumacetat (Merck)	Glycerin (87%) (Merck)
Ammoniumsulfat (Merck)	Guanidinium Hydrochlorid (Roth)
Ammoniumsulfat (Baker)	Heparin (Sigma)
Ampicillin (Sigma)	His-Bind Resins (Novagen)
Bacto Agar (Difco)	8-Hydroxychinolin (Merck)
Borsäure (Roth)	IPTG (Sigma)
β -Mercaptoethanol (Sigma)	Imidazole (Roth)
Bromphenolblau (Merck)	Isopropanol (Merck)
Calciumchlorid (Merck)	Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)
Calciumpantothenat (Sigma)	Lithiumacetat (Merck)
Casamino Acids (Difco)	Magnesiumchlorid (Merck)
Carboxymethylcellulose (Sigma)	Magnesiumsulfat (Merck)
Charcoal (Sigma)	Manganchlorid (Merck)
Chloramphenicol (Sigma)	β -Mercaptoethanol (Sigma)
Chloroform (Merck)	MOPS (Sigma)
Cholinchlorid (Sigma)	Natriumacetat (Merck)
Congo-Red (Sigma)	Natriumchlorid (Roth)
Complete EDTA-free (Roche)	tri-Natriumcitrat (Merck)
Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP,CTP, dGTP, dTTP) (Roth)	Natriumdihydrogenphosphat (Roth)
Dinatriumhydrogenphosphat (Merck)	Natrium-EDTA (Serva)
Dithiothreitol (Boehringer)	Natriumhydroxid (Riedel-de Haën)
Eisen[III]chlorid (Merck)	Natriummolybdat (Merck)
Essigsäure (Merck)	Natriumsulfat (Merck)
Ethanol (Merck)	Nikotinsäure (Sigma)
Ethidiumbromid (Sigma)	NiSO ₄ (Sigma)
Folsäure (Sigma)	Paraffin flüssig (Merck)
	Pepton (Difco)

Phenol (Roth)	Trizma-HCl (Sigma)
Polyethylenglycol (PEG 4000) (Fluka)	Triton X-100 (BioRad)
Polyethylenglycol (PEG 6000) (Fluka)	Trypton (Difco)
Potato Dextrose Broth (Difco)	Uracil (Calbiochem)
Raffinose (Fluka)	X-Gal (Sigma)
Saccharose (Merck)	Xylencyanol FF (BioRad)
Salzsäure (Merck)	Yeast Extract (Difco)
SDS (Roth)	Yeast Nitrogen Base (Difco)
Sorbitol (Sigma)	Zinkchlorid (Merck)
Thiamin (Sigma)	Zitronensäure (Merck)
Trichloracetat (Roth)	
Trizma-Base (Sigma)	

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen können unter den jeweiligen Methoden aufgeführt sein.

AE-Puffer: 50 mM Na-Acetat, pH 5.3 10 mM Na ₂ -EDTA, in H ₂ O _{bid.}	0,25% (w/v) Coomassie Blue R-250 10% (v/v) Essigsäure in H ₂ O _{bid.}
AE-PC: 50% AE-Phenol (s. u.) 50% Chloroform	Coomassie-Entfärber: 45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure in H ₂ O _{bid.}
Alkalische Phosphatase-Puffer (10×): 10 mM ZnCl ₂ 10 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-Cl, pH 8.3 in H ₂ O _{bid.}	Denaturierender RNA Auftragspuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF 10 mM Na ₂ -EDTA, pH 8.0 in Formamid
Ampicillin-Lösung: 10 mg/ml Ampicillin in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert	DENAT: 1,5 M NaCl 0,4 M NaOH in H ₂ O
Carboxin-Lösung: 5 mg/ml Carboxin in Methanol, sterilfiltriert	DNA-Auftragspuffer (6x): 50% (w/v) Sucrose 0,25% (w/v) Bromphenolblau in TE-Puffer (1x) (s. u.), sterilfiltriert
1% Congo-Red: 10 g Congo-Red in H ₂ O _{bid.}	Denhardt Lösung (100×): 2% (w/v) BSA
Coomassie-Färbelösung:	

2% (w/v) Ficoll
2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
in $H_2O_{bid.}$

Heparin-Lösung:
15 mg/ml Heparin
in $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert

Hygromycin B-Lösung:
50 mg/ml Hygromycin B
in $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert

Klenow-Puffer (10×):
100 mM $MgCl_2$
500 mM Tris-Cl, pH 7.5
in $H_2O_{bid.}$

Ligase-Puffer (10×):
50 mM $MgCl_2$
660 mM Tris-Cl, pH 7.5
10 mM DTT
10 mM ATP
in $H_2O_{bid.}$

Lysozym-Lösung:
10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8.0
in $H_2O_{bid.}$

Minilysat III-Lösung:
3 M Na-Acetat pH 4.8

MOPS-Puffer (10×):
200 mM MOPS, pH 7,0
80 mM Na-Acetat
10 mM Na_2 -EDTA
in $H_2O_{bid.}$

Natriumphosphatpuffer (1 M):
1 M Na_2HPO_4
1 M NaH_2PO_4
pH 7.0

Northern-Hybridisierungspuffer:
50 mM PIPES, pH 6.5
100 mM NaCl
50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0
1 mM EDTA
5% (w/v) SDS
in $H_2O_{bid.}$

Northern-Waschpuffer:
1× SSC (s. u.)
5% SDS
in $H_2O_{bid.}$

Novozym-Lösung:
2.5 bis 5 mg/ml Novozym
in $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert

PC:
50% TE-Phenol (s. u.)
50% Chloroform

PCR-Puffer (10×):
500 mM KCl
100 mM Tris-HCl, pH 8,3
in $H_2O_{bid.}$

20% PEG 6000-2M NaCl:
40 g PEG 6000
80 ml 5 M NaCl
80 ml in $H_2O_{bid.}$ bei 37°C lösen

Phenol, alkalisch (TE-Phenol):
dest. Phenol wird mit 0,18% (w/w)
8-Hydroxychinolin versetzt,
mit 0,5 M Tris-Cl, pH 8,0 äquilibriert

Phenol, sauer (AE-Phenol).
dest. Phenol wird mit 0,18% (w/w)
8-Hydroxychinolin versetzt,
mit AE-Puffer (s. o.) äquilibriert

PIPES-Puffer:
50 mM PIPES, pH 6.5
100 mM NaCl
50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0
1 mM Na_2 -EDTA, pH 7.0
5% (w/v) SDS
in $H_2O_{bid.}$

PBS:
7.9 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
14.5 mM KH_2PO_4
0,5 mM $MgCl_2$
2.7 mM KCl
137 mM NaCl
in $H_2O_{bid.}$

pET-System 1x Binding Puffer:

5 mM Imidazol
0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl
pH 7.9

pET-System 1x Binding Puffer (6 M GuHCl):

5 mM Imidazol
0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl
6 M GuHCl
pH 7.9

pET System 1x Wash-Puffer:

20 mM Imidazol
0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl
6 M GuHCl
pH 7.9

pET Elutionspuffer 200:

200 mM Imidazol
0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl
6 M GuHCl
pH 7.9

pET Elutionspuffer 300:

300 mM Imidazol
0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl
6 M GuHCl
pH 7.9

pET Elutionspuffer 1000:

1000 mM Imidazol
0.5 M NaCl
20 mM Tris-HCl
6 M GuHCl
pH 7.9

pET 1x Charge-Puffer:

50 mM NiSO₄

PonceauS Färbelösung:

2% (v/v) PonceauS
30% (v/v) Trichloressigsäure
30% (v/v) Schwefelsalicylsäure
in H₂O_{bid.}

Proteingel-Probenpuffer (5x):

60 mM Tris-Cl, pH 6.8
2% (w/v) SDS
14 mM β-Mercaptoethanol
25% (v/v) Glycerin
0.1% (w/v) Bromphenolblau
in H₂O_{bid.}

Proteingellaufpuffer:

25 mM Tris-Cl, pH 8.8
200 mM Glycin
0.1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

Phleomycin-Stammlösung:

20 mg/ml Phleomycin
in H₂O_{bid.}, sterifiltriert

RNase A-Lösung:

10 mg/ml RNase A
15 mM NaCl
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
in H₂O_{bid.}, 15 min. gekocht

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5.8
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterifiltriert

SM Puffer:

100 mM NaCl
8 mM MgSO₄ x 7H₂O
5% (v/v) 1 M Tris-HCl
pH 7.5 (f.c. 50 mM)

Southern-Hybridisierungspuffer:

500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0
7 % (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

Southern-Waschpuffer:

100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0
1 % (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

SSC (20x):

300 mM Na-Citrat, pH 7.0
3 M NaCl in H₂O_{bid.}

STC:

10 mM Tris-Cl, pH 7.5
 100 mM CaCl₂
 1 M Sorbitol
 in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC/PEG:

15 g STC (s. o.)
 10 g PEG 4000, sterilfiltriert

STET:

10 mM Tris-Cl, pH 8.0
 100 mM NaCl
 1 mM Na₂-EDTA
 5% (v/v) Triton X-100
 in H₂O_{bid.}

TAE (50×):

2 M Tris-Acetat
 100 mM Na₂-EDTA
 in H₂O_{bid.}

TBE (5×):

500 mM Tris-Borat, pH 7.9
 10 mM Na₂-EDTA
 in H₂O_{bid.}

TBS:

50 mM Tris-Cl, pH 7.5
 150 mM NaCl
 in H₂O_{bid.}

TBS-T:

50 mM Tris-Cl, pH 7.5
 150 mM NaCl
 0,1% (v/v) Tween 20
 in H₂O_{bid.}

TE (10×):

100 mM Tris-Cl, pH 7.9
 10 mM Na₂-EDTA
 in H₂O_{bid.}

X-Gal-Lösung:

10 mg/ml X-Gal in
 Dimethylformamid

***Ustilago*-Lysispuffer:**

2% Triton
 1% SDS
 100 mM NaCl
 10 mM Tris-Cl, pH 8.0
 1 mM Na₂-EDTA

Medien

Ustilago maydis Medien

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

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

1,5 g NH₄NO₃
 2,5 g Casamino Acids
 0,5 g DNA
 1 g Yeast Extract
 10 ml Vitamin-Lösung (s. u.)
 62,5 ml Salz-Lösung (s. u.)
 1 ml Spurenelement-Lösung (s. u.)
 mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt

CM-1% Glukose:

Zugabe einer 50% Glucose Stammlsg.
 bis 1% Endkonz.

CM-1% Arabinose

Zugabe einer 25% Arabinose Stammlsg.

bis 1% Endkonz.

CMC Medium:

0,5% Yeast Extract
 0,4% Pepton
 0,4% Saccharose
 2% Carboxymethylcellulose
 1,5% Bitec Agar
 in H₂O_{bid.}

CM-Charcoal-Festmedium

(Aktivkohleplatten für RNA-Präparation):

6 g NH₄NO₃
10 g Casamino Acids
1 g DNA degr. Free Acid (Sigma, D-3159)
2 g Yeast Extract
20 ml Vitamin-Lösung (nebenstehend)
250 ml Salz-Lösung (nebenstehend)
1 ml Spurenelement-Lösung (nebenstehend)
20 g Bacto Agar
10 g Charcoal (Sigma, C-9157)
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt
mit NaOH auf pH 7.0 einstellen, nach dem Autoklavieren, 40 ml 50% (w/v) Glucoselösung zufügen.

PD-Charcoal-Festmedium:

24 g Potato Dextrose Broth
10 g Charcoal
20 g Bacto Agar
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

NM-Charcoal-Festmedium (Holliday, 1974):

62,5 ml Salz-Lösung (nebenstehend)
3 g KNO₃
mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt
10 g Charcoal
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt und autoklaviert.
Nach dem Autoklavieren Glukose bzw. Arabinose zugeben (1% Endkonz.).

MM-Medium (Holliday, 1974):

62,5 ml Salz-Lösung (nebenstehend)
0,5 ml Spurenelementlösung (nebenstehend)

3 g KNO₃
mit NaOH auf pH 7.0 einstellen
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt und autoklaviert, danach Glukose bzw. Arabinose zugeben (1% Endkonz.)

NM-Medium (Holliday, 1974):

62,5 ml Salz-Lösung (s. u.)
3 g KNO₃
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt und autoklaviert, danach Glucose bzw. Arabinose zugeben (1% Endkonz.).

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

16 g KH₂PO₄
4 g Na₂SO₄
8 g KCl
4 g MgSO₄ × 7 H₂O
1,32 g CaCl₂ × 2 H₂O
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
400 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 Calciumpantothenat
500 mg p-Aminobenzoesäure
200 mg Nikotinsäure
200 mg Cholinchlorid
1000 mg myo-Inositol
Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

NSY-Glycerin (Einfriermedium):

8 g Nutrient Broth
1 g Yeast Extract
5 g Saccharose
800 ml 87% Glycerin
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth
20 g Bacto Agar (für Platten)
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

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

a) Top-Agar:
1,5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in YEPS-Medium (s. u.)
b) Bottom-Agar:
wie a), nur zusätzlich 400 µg/ml Hygromycin
oder 4 µg/ml Carboxin, 80 µg/ml Phleomycin

YEPS-Medium (Tsukada et al., 1988):
 10 g Yeast Extract
 20 g Pepton
 20 g Saccharose
 mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

YEPS_{light}-Medium:
 4 g Yeast Extract
 4 g Pepton
 10 g Saccharose

Für Medien mit Arabinose oder Glukose als einziger Kohlenstoffquelle wurde der jeweilige Zucker nach dem Autoklavieren in einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml) und Phleomycin (5 µg/ml).

***E.coli* Medien**

Für die Kultivierung von *E.coli* wurden folgende Medien verwendet:

LB-Medium (Sambrook et al., 1989):
 10 g Trypton
 5 g Yeast Extract
 10 g NaCl
 mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

YT-Medium (Sambrook et al., 1989):
 8 g Trypton
 5 g Yeast Extract
 5 g NaCl
 mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Medium (Sambrook et al., 1989):
 16 g Trypton
 10 g Yeast Extract
 5 g NaCl
 mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Glycerin (Sambrook et al., 1989):
 10 g Yeast Extract
 16 g Trypton
 5 g NaCl
 800 ml 87% Glycerin
 mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Medium für Pagenscreen:
 8 g Trypton
 4 g Yeast Extract
 8 g NaCl
 10.4 g Merck Agar
 mit H₂O auf 800 ml aufgefüllt
 nach dem autoklavieren:
 16 ml 20% Maltose
 8 ml 1M MgSO₄

Na-Soft/Top-Agar
 10 g Trypton (Bacto)
 5 g Yeast Extract (Bacto)
 10 g NaCl
 8 g Bacto-Agar
 mit H₂O ad 1000 ml

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden Medienzusätze, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicilin (100 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und X-Gal (40mg/ml).

Enzyme

Albumin (aus Rinderserum)

(Sigma)

Alkalische Phosphatase

(Boehringer)

AmpliTaQFS

(ABI)

Complete[®]-Proteinase Inhibitoren

(Boehringer)

***E.coli* DNA-PolymeraseI**

(Boehringer)

Lysozym

(Boehringer)

Novozym 234

(Novo Nordisc)

***PfuI* DNA-Polymerase**

(Stratagene)

Restriktionsenzyme

(NEB, Roche, Pharmacia)

Ribonuklease A

(Boehringer)

T4 DNA-Ligase

(Boehringer)

***Taq* DNA-Polymerase**

(Laborpräparation)

***Pfu* DNA-Polymerase**

(Stratagene)

T4 DNA-Polymerase

T4 Polynukleotidkinase

Verwendete Kits und sonstige Materialien

Kits

TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, JETSORB[®] (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETSTAR[®] (Genomed) zur Plasmid-Maxipräparation, JETQUICK (Genomed) für die Reinigung von Plasmiden zur Sequenzierung, NEBlot Kit (NEB) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BCA Protein Assay Reagent (Pierce) zur Messung der Proteinkonzentration, ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) zum Nachweis von Proteinen im Western Blot, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, S-300 Säulen (Amersham Pharmacia) zur Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden und Microspin G-25 Säulen zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden.

Material

Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 Microns (Sigma), MobiSpin[®] S-300 Säulen (MoBiTec), Nylonfilter[®] Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotec), Hybond XL Membran (Amersham Pharmacia Biotec), Papierfilter (S&S 595), Petrischalen (Greiner), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Sarstedt), JETSTAR[®]-Säulen (Genomed), Sigmacote[®] (Sigma), Sterilfilter 0,20µm (Sartorius), Thermalpapier (Hitachi), Röntgenfilm Kodak X-omat[®] (Kodak), PVDF-Membran Immobilon-P[®] (Millipore). Für die Proteinaufreinigung wurden 1 ml Mobicol-Säulen und Filterfritten mit 35 µm Porengröße verwendet (Mo Bi Tec).

DNA-Größenstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden λ -DNA *Pst*I- und *Bst*EII-Fragmente (Laborpräparate) verwendet:

λ -DNA *Bst*EII-Fragmente:

8454 bp, 7242 bp, 6369 bp, 5686 bp, 4822 bp, 4324 bp, 3675 bp, 2323 bp, 1929 bp, 1371 bp, 1264 bp, 702 bp, 224 bp, 117 bp.

λ -DNA *Pst*I-Fragmente:

11509 bp, 5077 bp, 4749 bp, 4507 bp, 2838 bp, 2560 bp, 2459 bp, 2443 bp, 2130 bp, 1936 bp, 1700 bp, 1159 bp, 1093 bp, 805 bp, 514 bp, 468 bp, 458 bp, 339 bp, 264 bp, 249 bp, 216 bp, 211 bp, 200 bp, 164 bp, 150 bp, 94 bp, 87 bp, bp, 15 bp

4.1.2 Oligonukleotide

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

REV 24

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid, liegt neben dem Poly-Linker von pBS(+)*SK*, pUC19, pSL11-80, pNEB193 und pCRT_{Topo}.

UNI 24

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid, liegt neben dem Poly-Linker von pBS(+)*SK*, pUC19, pSL11-80, pNEB193 und pCRT_{Topo}.

T7-24

GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid, liegt neben dem Poly-Linker von pSP72.

SP6-24

CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid, liegt neben dem Poly-Linker von pSP72.

Lambda 1231

AGC AAG TTC AGC CTG GTT AAG TC
Befindet sich in den „Phagenarmen“ der *U. maydis* cDNA λ -gt10 Phagenbank

Lambda 1232

CTT ATG AGT ATT TCT TCC AGG GTA
Befindet sich in den „Phagenarmen“ der *U. maydis* cDNA λ -gt10 Phagenbank

OAN7

CCG ATA TCA TAT GGT GAG CAA GGG CGA GG
Verwendet zur Erzeugung einer *Nde*I-Schnittstelle am Start-Codon von *GFP*.

SH 1-1

GAR TGG AAY CCN GAY CC
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-1, verwendet in der PCR zur Isolierung des *sspl*-Gens.

SH 1-2

GGR TCN GGR TTC CAY TC
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-1, verwendet in der PCR zur Isolierung des *sspl*-Gens.

SH 4-1

GAY CCN GAR MGN TTY AAY CC
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-4, verwendet in der PCR zur Isolierung des *sspl*-Gens.

SH 4-2

GGR TTR AAN CKY TCN GGR TC
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-4, verwendet in der PCR zur Isolierung des *sspl*-Gens.

SH 14-1

CCN GAY GTN GTN GCN AA
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-14, verwendet in der PCR zur Isolierung des *sspl*-Gens.

SH 14-2

TTN GCN ACN ACR TCN GG
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-14, verwendet in der PCR zur Isolierung des *ssp1*-Gens.

SH 7-1

GCN GGN CCN CCN CC
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-7, verwendet in der PCR zur Isolierung des *ssp1*-Gens.

SH 7-2

AAV GAY GCN GGN CCN AC
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-7, verwendet in der PCR zur Isolierung des *ssp1*-Gens.

SH 7-3

TGR TTN GGN GTN GGN CC
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-7, verwendet in der PCR zur Isolierung des *ssp1*-Gens.

SH 7-4

GCN CCN GCR TCR TTN AC
Degeneriertes Oligonukleotid aus der Peptidsequenz LysC-7, verwendet in der PCR zur Isolierung des *ssp1*-Gens.

SH1

TCC GAC GTC GAG ATC GGA TCG TCC
ssp1 5'-Bereich.

SH2

CTG TGG AAT GTG CTC ACA TCTT GC
ssp1 5'-Bereich.

SH3

ACT CAC GAC TCA CGA CTG ATG CGG
ssp1 5'-Bereich.

SH4

GGT AAA TCC GCC AGC TGG CCA CGC
ssp1 5'-Bereich.

SH5

GCT CAG TTG ACG GAG AAA GGA CGG
ssp1 5'-Bereich.

SH6

AGT GCT CGT TGT ACG CCG AAT GTG
ssp1-ORF.

SH7

AGA AGA CCA TCG AAA TGC TCA AGG
ssp1-ORF.

SH8

CCG ACA ATG TTT GAT ATG TTC TGC
ssp1-ORF.

SH9

AGC CAG TCG ATT CTC GAA ATT GCC
ssp1-ORF.

SH10

TGT CGT GAC GAT AGG ACA AGT GGG
ssp1 3'-Bereich.

SH11

AGC CCA ATC CTT GCG AGC
ssp1-ORF.

SH12

GAA CAG CAC TGC GAG TGC
ssp1-ORF.

SH13

GCA GAT GAA ATT GTT CGT C
ssp1-ORF, über das *ssp1*-ATG.

SH14

AAG CTC CTG CTC GAG CAG
ssp1-ORF.

SH15

TTC ATC GCC AAG CGC CTC
ssp1-ORF.

SH16

AAC GCG TTC GCC CTT CAG
ssp1 3'-Bereich, über das *ssp1* Stop-Codon.

SH17

GAG TGG AAT CCT GAT CCC
ssp1-ORF.

SH18

GTG ATG CTG TTG AGT CGG
ssp1-ORF.

SH19

GCA GAG ACC ACT TCC AGG

SH20

GCC GAA TTC **CAT ATG** AAA TTG TTC GTC
CAG GAC
über das *ssp1*-ATG, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle.

SH21-NcoI

TTC **CAT GGG** CAA AAA GAG CG
über das *ssp1*-ATG, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NcoI*-Schnittstelle.

SH22-NcoI

TTC **CAT GGG** GGC CTC GTA
über das *ssp1* Stop-Codon, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NcoI*-Schnittstelle.

SH-GFP-AscI

CAT **GGC GCG CCT** TTA CTT GTA CAG CTC
GTC CA

Wurde für die Konstruktion der *sspl-eGFP* Fusion verwendet, dient zur Amplifikation des *GFP*-Gens, zusammen mit OAN7 (A. Brachmann, 2001), generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *AscI*-Schnittstelle nach dem *GFP* Stop-Codon..

SH-22-NdeI

CCC GGG **CAT ATG** GCG GGC CTC GTA GAT
GAC GTG CAT A

über das *sspl*-Stop-Codon, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle an Stelle des *sspl* Stop-Codons.

SH-24-NotI

ATT **GCG GCC GCA CAT** CTG CAA AAA GAG
CGA AAA GCA AGA G

über das *sspl*-ATG, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NotI*-Schnittstelle direkt vor dem zweiten Amiosäurecodon in *sspl* (*CAT* = ATG).

SH24-NotI-NdeI

TGC GGC GCA CAT ATG CAA AAA GAG CGA
AAA GCA AGA G

über das *sspl*-ATG, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NotI*- und eine *NdeI*-Schnittstelle direkt vor dem zweiten Amiosäurecodon in *sspl* (AAA)

SH25-NotI

TTA **TGC GGC CGC** AAA TTG TTC GTC CAG
GAC AAG GTA TCT C

über das *sspl*-ATG, generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NotI*-Schnittstelle direkt vor dem zweiten Amiosäurecodon in *sspl* (AAA)

SH25-NotI-NdeI

TCA TAT GTG CGG CCG CAA ATT GTT CGT
CCA GGA CAA GGT ATC

generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese am *sspl*-ATG eine *NotI*- und eine *NdeI*-Schnittstelle direkt vor dem zweiten Amiosäurecodon in *sspl* (AAA)

SH26-NotI

ATT **GCG GCC GCA** GCG GGC CTC GTA GAT
GAC GTG CAT AGA G

generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NotI*-Schnittstelle am *sspl* Stop-Codon,

SH-27-NotI

TAA **TGC GGC CGC** TGA AGG GCG AAC GCG TTT
GAC TGA CCT G

generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NotI*-Schnittstelle direkt vor dem *sspl* Stop-Codon,

SH-30-NdeI

TCG CTC TTT TTG **CAT ATG** AAA TTG TTC
generiert durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle am *sspl*-ATG.

4.1.3 Stämme

E. coli-Stämme

Für sämtliche Klonierungen ohne nähere Angaben wurde der Stamm DH5 α (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: *F'*, *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ Δ M15*. Für PCR-Klonierungen unter Verwendung des TOPO TA Cloning[®] Kits von Invitrogen wurde der *E. coli*-Stamm TOP10 verwendet: *F'*, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ Δ M15*, Δ *lacX74*, *recA1*, *deoR*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^R), *endA1*, *nupG*. Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach Demerec, 1966. Der Stamm MN514 wurde als Wirtsstamm für die Sichtung der λ gt10 cDNA Bank (Schauwecker et al., 1995) verwendet. Der Stamm BL21-Codon+(DE3)-RIL (Genotyp *E. coli* B *F'* *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal λ* (DE3) *endA* Hte (*argU ileY leuW* Cam^R) wurde zur heterologen Proteinexpression verwendet (Stratagene, Weiner M.P. et al., 1994 Strategies 7(2):41-43).

U.maydis*-Stämme*Tabelle 5: Ausgangsstämme**

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett et al., 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett et al., 1989
FB6b	<i>a1 b2</i>	-	Banuett et al., 1989
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	Banuett et al., 1989
521	<i>a1 b1</i>	-	Kronstadt and Leong., 1989
FB1 Δ <i>rum1</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>rum1</i>	H	C. Quadbeck-Seeger et al., 2000
FB2 Δ <i>rum1</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>rum1</i>	H	C. Quadbeck-Seeger et al., 2000
FB2 Δ <i>hda1</i>	<i>a2 b2</i> , Δ <i>hda1</i>	H	M. Reichmann, pers. Mitteilung
FB1 Δ <i>hda1</i>	<i>a1 b1</i> , Δ <i>hda1</i>	H	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR11	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR1-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR2-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR7-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR8-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR11-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR12-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR15-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR23-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR25	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
MR28-1	<i>a1 b1</i>	-	M. Reichmann, pers. Mitteilung
uMA2	<i>a1 b1</i> Pmfal:eGFP	C	M. Feldbrügge, pers. Mitteilung
FB1 Δ <i>uac1</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>uac1</i>	H	Krüger et al., 1999
FB1 Δ <i>ubc1</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>ubc1</i>	N	Müller et al., 1999
FB1 Δ <i>kpp2</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>kpp2</i>	N	Müller et al., 1999
FB1 Δ <i>kpp4</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>kpp4</i>	H	P. Müller, pers. Mitteilung
FB1 <i>kpp4</i> -2	<i>a1 b1 ip'(P_{crg1}:kpp4-2)ip^s</i>	C	P: Müller, pers. Mitteilung
FB1 Δ <i>fuz7</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>fuz7 ip'(P_{crg1}:kpp4-2)ip^s</i>	N	G. Weinzierl, pers. Mitteilung
FB1 <i>fuz7dd</i>	<i>a1 b1 ip'(P_{crg1}:fuz7dd)ip^s</i>	C	P. Müller, pers. Mitteilung
FB1 Δ <i>prf1</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>prf1</i>	N	Müller et al., 1999
AB2	<i>a2</i> Δ <i>b</i>	P	Romeis et al., 2001
AB31	<i>a2 ip^R(P_{crg1}:bW2,bE1)ip^S</i>	P	Romeis et al., 2001

AB32	$a2 ip^R(P_{crg1}bW2,bE2)ip^S$	P	Romeis et al., 2001
------	--------------------------------	---	---------------------

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Vorläufer**, Plasmid**
SH1 $\Delta ssp1$ -4	$a1 b1 \Delta ssp1::Hyg^R$	H	FB1, pSH13 $\Delta ssp1$
SH1 $\Delta ssp1$ -9	$a1 b1 \Delta ssp1::Hyg^R$	H	FB1, pSH13 $\Delta ssp1$
SH2 $\Delta ssp1$ -i	$a2 b2 \Delta ssp1::Hyg^R$	H	FB2, pSH13 $\Delta ssp1$
SH2 $\Delta ssp1$ -III	$a2 b2 \Delta ssp1::Hyg^R$	H	FB2, pSH13 $\Delta ssp1$
SH1	$a1 b1 \Delta ssp1::eGFP$	H	FB1, pSH14
SH2	$a2 b2 \Delta ssp1::eGFP$	H	FB2, pSH14
SH26	$a2 b2 ssp1-eGFP$	H	FB2, pSH16
SH5-E	$a1 b1 \Delta ssp1::eGFP \Delta hda1$	H	FB1 $\Delta hda1$ x SH2
SH6-B	$a2 b2 \Delta ssp1::eGFP \Delta hda1$	H	FB1 $\Delta hda1$ x SH2
SH8-22	$a2 b2 \Delta hda1 ip^R(P_A:eGFP)ip^S$	P	SH11, pNEB $\Delta hda1$ -Ble+
SH10	$a1 b1 ip^R(P_A:eGFP)ip^S$	C	FB1, pSH-P-1
SH11	$a2 b2 ip^R(P_A:eGFP)ip^S$	C	FB2, pSH-P-1
SH12	$a1 b1 ip^R(P_D:eGFP)ip^S$	C	FB1, pSH-P-2
SH13	$a2 b2 ip^R(P_D:eGFP)ip^S$	C	FB2, pSH-P-2
SH14	$a1 b1 ip^R(P_E:eGFP)ip^S$	C	FB1, pSH-P-3
SH15	$a2 b2 ip^R(P_E:eGFP)ip^S$	C	FB2, pSH-P-3
SH16	$a1 b1 ip^R(P_F:eGFP)ip^S$	C	FB1, pSH-P-4
SH17	$a2 b2 ip^R(P_F:eGFP)ip^S$	C	FB2, pSH-P-4
SH19-11	$a1 b1 ip^R(P_B:eGFP)ip^S$	C	FB1, pSH-P-5
SH20-18	$a2 b2 ip^R(P_B:eGFP)ip^S$	C	FB2, pSH-P-5
SH21-45	$a1 b1 ip^R(P_C:eGFP)ip^S$	C	FB1, pSH-P-6
SH22-63	$a1 b1 ip^R(P_C:eGFP)ip^S$	C	FB2, pSH-P-6
SH23-69	$a1 b1 ip^R(P_G:eGFP)ip^S$	C	FB1, pSH-P-7
SH24-90	$a2 b2 ip^R(P_G:eGFP)ip^S$	C	FB2, pSH-P-7
SH30	$a1 b1 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S$	C	FB1, pssp1-cisI-mfa1#7
SH31	$a2 b2 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S$	C	FB2, pssp1-cisI-mfa1#7
SH32	$a1 b1 ip^R(P_{ssp1+mfa1}:eGFP)ip^S$	C	FB1, pssp1-cisI-mfa1#22
SH33	$a2 b2 ip^R(P_{ssp1+mfa1}:eGFP)ip^S$	C	FB2, pssp1-cisI-mfa1#22
SH34	$a1 b1 ip^R(P_{ssp1+mfa1}:eGFP)ip^S$	C	FB1, pssp1-cisII-mfa1#28
SH35	$a2 b2 ip^R(P_{ssp1+mfa1}:eGFP)ip^S$	C	FB2, pssp1-cisII-mfa1#28
SH36	$a1 b1 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S$	C	FB1, pssp1-cisII-mfa1#35
SH37	$a2 b2 ip^R(P_{ssp1-mfa1}:eGFP)ip^S$	C	FB2, pssp1-cisII-mfa1#35

SH48	<i>a1 b1 P_{o2tef}ssp1</i>	H	FB1, pSH- <i>o2tef</i> - <i>hyg-2</i>
SH49	<i>a2 b2 P_{o2tef}ssp1</i>	H	FB2, pSH- <i>o2tef</i> - <i>hyg-2</i>
SH50	<i>a1 b1 P_{crg1}ssp1</i>	H	FB1, pSH- <i>crg1</i> - <i>hyg-2</i>
SH51	<i>a2 b2 P_{crg1}ssp1</i>	H	FB2, pSH- <i>crg1</i> - <i>hyg-2</i>
SH26	<i>a2b2 ssp1-eGFP</i>	H	FB2, pSH15, pSH16

*Resistenz: Abkürzungen: C, Cbx_R; H, Hyg^R; N, Nat^R; P, Phleo^R. **Vorläufer bezeichnet den Ausgangsstamm. ***Plasmid bezeichnet das zur homologen Rekombination ins *U. maydis* Genom transformierte DNA-Plasmid.

Sämtliche Transformanden wurden durch Southern Analysen bestätigt. In fast allen Fällen wurden mindestens zwei unabhängige Transformanden hergestellt und für die weiteren Experimente verwendet.

4.1.4 Plasmide, Genbanken und Plasmidkonstruktionen

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

Ausgangsplasmide

pSP72 (Promega)

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

pBS(+)SK (Stratagene)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pUC19 (Yanisch-Perron, 1985)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pSL1180 (Pharmacia)

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

pNEB193 (NEB)

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

pCR-Topo (Invitrogen)

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

PET15b (Novagene)

Vektor zur heterologen Proteinexpression in *E. coli*.

PTZ18R (Pharmacia)

Klonierungsvektor.

PTZ19R (Pharmacia)

Klonierungsvektor.

pCM54 (Tsukuda et al., 1988)

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

pSL Ble(+) (A.Brachmann, 2001)

Enthält 2.4 kb *NotI* Fragment der Phleomycin-Resistenzkassette in pSL1180.

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

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

PSLHyg(-)Δ*EcoRI* (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

pSLHyg-, in dem die *EcoRI*-Schnittstelle in der Hygromycinkassette mutiert ist.

PSLHyg(+)*ΔEcoRI* (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

pSLHyg +, in dem die *EcoRI*-Schnittstelle in der Hygromycinkassette mutiert ist.

pSL-Cbx(+), pSL-Cbx(-) (A. Brachmann, 2001)

Enthält die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp *NotI*-Fragment aus pb^{c^{on}}, in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *ip'*-Gen wird von seinem eigenen Promotor und Terminator flankiert.

p9-1-14 (M. Reichmann, pers. Mitteilung)

Plasmid aus der genomischen *U. maydis* pCM54-Plasmidbank (siehe unten). Enthält dem kompletten *hda1* ORF.

PNEBUC (G. Weinzierl, 2001)

Enthält die Cbx^R-Kassette als *NotI*-Fragment und eine UARS („*Ustilago* autonomously replicating sequence“).

pUMA13 (S. Gilles, M. Feldbrügge, pers. Mitteilung)

Enthält den *mfal*-Basalpromotor fusioniert an *eGFP*.

pRU3 (A. Brachmann, 2001)

Entstanden durch Austausch des 425 bp *NheI/NdeI narI*-Promotorfragments in pRUpro(-)sgfp durch das entsprechende Fragment aus pRU2. Das *narI*-Promotorfragment ist damit 1.169 bp lang (bis zur *AgeI*-Schnittstelle).

pRU4 (A. Brachmann, 2001)

Entstanden aus pRU3 durch Deletion des 189 bp *EcoRV/Eco47III*-Fragments. Das *narI*-Promotorfragment ist damit 986 bp lang (bis zur *Eco47III*-Schnittstelle).

pRU12 (A. Brachmann, 2001)

Aus pBScrg1p-NdeI wurde der *crgl*-Promotor als 1.413 bp *XhoI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten und in den mit *EcoNI* und *NdeI* geöffneten Vektor pRU2 inseriert, wobei die überhängenden *XhoI*- und *EcoNI*-Schnittstellen aufgefüllt worden waren.

pCU4 (A. Brachmann, 2001)

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

Genbanken

Cosmidbank pUMcos^x (Bölker et al., 1995a)
Cosmidbank des *U. maydis*-Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*), erzeugt durch Ligation partiell restringierter *MboI*-Fragmente in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pUMcos. pUMcos ist ein Derivat des Vektors pScos1 (Stratagene), in dem ein *BglIII/HindIII*-Fragment, das die Neomycin-Resistenzkassette enthält, durch ein *EcoRV/SmaI*-Fragment aus dem Vektor pCBX122, das die Carboxin-Resistenzkassette enthält, ausgetauscht wurde.

λgt10 cDNA-Bank (Schauwecker et al., 1995)
cDNA-Bank des Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium. Erstellt mit dem cDNA Bank-Kit von Amersham.

Freireplizierende cDNA-Bank (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Freireplizierende cDNA-Bank einer Kreuzung der Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium (für 12, 24 und 48 Stunden). Erstellt in Anlehnung an den cDNA Library Kit von Clontech.

Genomische pCM54 Plasmidbank

(Bauchwitz und Holloman, 1990)
8kb Fragmente genomischer *U. maydis* DNA wurden in die *BamHI* Schnittstelle von pCM54 (s. o.) ligiert

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Isolierung von *ssp1*

pSH1

Ein mit den Primern SH7-4 und SH14-1 aus genomischer *U. maydis* DNA (FB1) amplifiziertes 261bp Fragment aus dem *ssp1*-ORF, kloniert in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO.

pSH2

Ein mit den Primern SH7-4 und SH1-1 aus genomischer *U. maydis* DNA (FB1) amplifiziertes 1567bp Fragment aus dem *ssp1*-ORF, kloniert in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO.

PSH3

Ein mit den Primern SH7-4 und SH4-1 aus genomischer *U. maydis* DNA (FB1) amplifiziertes 186bp Fragment aus dem *ssp1*-ORF, kloniert in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO.

pSH4

Aus dem Comidpool#19 (Bölker *et al.*, 1995) wurde aus dem Cosmidklon B10 ein 7602 bp *EcoRV*-Fragment isoliert, das 2588 bp aus dem *ssp1* 5'-Bereich, den *ssp1*-ORF (3192 bp) sowie 1826 bp des 3'-Bereichs beinhaltet, und in den Vektor pBS-SK (+) kloniert

Plasmide zur Kartierung und Sequenzierung von *ssp1*

Die Plasmide stellen Subklone des 7602 bp *EcoRV*-Fragments des Vektors pSH4 dar.

PSH5

Aus dem Vektor pSH4 wurde ein ca. 1.4 kb *EcoRI*-Fragment isoliert und in das Plasmid pTZ19R kloniert.

pSH6

Aus dem Vektor pSH4 wurde ein ca. 2.1 kb *EcoRI-BamHI*-Fragment isoliert und in pTZ18R kloniert.

pSH7

Aus dem Vektor pSH4 wurde ein ca. 0.5 kb *EcoRI-BamHI*-Fragment isoliert und in pTZ18R kloniert.

pSH8

Aus dem Vektor pSH4 wurde ein ca. 2.4 kb *EcoRI-BglII*-Fragment isoliert und in pSP72 kloniert.

pSH9

Der Vektor pSH4 wurde mit *BamHI* und *BglII* geschnitten und ein ca. 3.9 kb großes

Fragment, welches auch das Vektorbackbone von pBS-SKII(+) enthielt, isoliert und religiert.

pSH10

Aus dem Vektor pSH4 wurde ein ca. 1.9 kb *HindIII*-Fragment isoliert und in das Plasmid pTZ19R kloniert.

pSH11

Aus dem Vektor pSH4 wurde ein ca. 0.9 kb *PvuII*-Fragment isoliert und in pSP72 kloniert.

Plasmide mit *sspI*-cDNA Fragmenten**pTZ-*sspI* 1A#2**

In den Vektor pTZ18R wurde ein ca. 1.4 kb bp *EcoRI*-Fragment aus der Phagen-DNA des Phagenklones #1A des *sspI*-cDNA-Screens aus der λ gt10 cDNA-Bank (Schauwecker *et al.*, 1995) kloniert.

pTZ-*sspI* 3C#3

In den Vektor pTZ18R wurde ein ca. 0.85 kb bp *EcoRI*-Fragment aus der Phagen-DNA des Klones #3C des *sspI*-cDNA-Screens aus der λ gt10 cDNA-Bank (Schauwecker *et al.*, 1995) kloniert.

pTZ-*sspI* 4A#5

In den Vektor pTZ18R wurde ein ca. 2.2 kb bp *EcoRI*-Fragment Phagenklones #4A des *sspI*-cDNA-Screens aus der λ gt10 cDNA-Bank (Schauwecker *et al.*, 1995) kloniert.

pTZ-*sspI* 5C#9/pTZ-*sspI* 5C#10

In den Vektor pTZ18R wurde ein ca. 1.0 kb bp *EcoRI*-Fragment aus der Phagen-DNA des Phagenklones #5C des *sspI*-cDNA-Screens aus der λ gt10 cDNA-Bank (Schauwecker *et al.*, 1995) kloniert.

pTZ-*sspI* 6D#12

In den Vektor pTZ18R wurde ein ca. 1.0 kb bp *EcoRI*-Fragment aus der Phagen-DNA des Phagenklones #6D des *sspI*-cDNA-Screens

aus der λ gt10 cDNA-Bank (Schauwecker *et al.*, 1995) kloniert.

pTZ-*sspI*14A#19/pTZ-*sspI*14A#20

In den Vektor pTZ18R wurde ein ca. 2.0 kb *EcoRI*-Fragment aus der Phagen-DNA des Phagenklones #11A des *sspI*-cDNA-Screens aus der λ gt10 cDNA-Bank (Schauwecker *et al.*, 1995) kloniert.

pTZ-*sspI*11A#17/pTZ-*sspI*11A#18

In den Vektor pCR[®]2.1-TOPO wurde ein 2023 bp PCR Produkt (Primer Lamda 1231 und Lamda 1232, template Phagen-DNA Klon #4A), der ein *sspI* cDNA-Fragment beinhaltet, kloniert.

pSH12#2 (pTopo-*sspI*#4A#2)

In den Vektor pCR[®]2.1-TOPO wurde ein 2023 bp PCR Produkt (Primer Lamda 1231 und Lamda 1232, template Phagen-DNA Klon #4A), der ein *sspI* cDNA-Fragment beinhaltet, kloniert

pSH12#2 (pTopo-*sspI*#4A#3)

pTZ-*sspI*8A#15/pTZ-*sspI* 8A#16 In den Vektor pTZ18R wurde ein ca. 1.4 kb bp *EcoRI*-Fragment aus der Phagen-DNA des Phagenklones #8A des *sspI*-cDNA-Screens aus der λ gt10 cDNA-Bank (Schauwecker *et al.*, 1995) kloniert.

***ssp1*-Deletionskonstrukte**

pSH13Δ*ssp1*

Mit diesem Konstrukt kann der *ssp1*-ORF ab dem ATG bis Position +2582 gegen die Hyg^R ersetzt werden. In den Vektor pSP72 (*SphI*-*BglII*) wurden in einer 4-Fragmentligation ein 1089 bp *SphI*-*XmnI* Fragment aus pSH4, ein 3011 bp *HpaI*-*SacI* Fragment mit der Hygromycin-B Resistenzkassette aus pSLHyg(-) und ein 1.4 bp *SacI*-*BglII* Fragment aus pSH4 ligiert.

pSH14

Mit diesem Konstrukt kann der *ssp1*-ORF komplett gegen *eGFP* und die Hyg^R ersetzt werden. Aus dem Klon PM#67 (Phillip Müller, pers. Mitteilung) wurde ein 1113 bp *NcoI*-*EcoRI* Fragment isoliert, welches *eGFP* (

732 bp) mit dem *mfa2*-Terminator (411 bp) enthält. Aus dem Plasmid pSLHyg- (A. Brachmann, 2001) wurde die Hygromycin-B Resistenzkassette als 3078 bp *BamHI*-*MluI* Fragment isoliert. Mit pSH4 als Matrize wurde mit den Primern SH3 und SH21-*NcoI* ein ca. 1.0 kb Fragment mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert (5'-Bereich von *ssp1*), sequenziert und als ca. 1.0 kb *EcoRI*-*NcoI*-Fragment reisoliert. Aus pSH4 wurde ein 774 bp *MluI*-*BglII*-Fragment (3'-Bereich von *ssp1*) isoliert. Das Endkonstrukt pSH14 enthält ca. 1 kb *ssp1* 5'-Bereich, fusioniert an *eGFP* mit *mfa2*-Terminator, danach die Hygromycin-B Resistenzkassette und ca. 0.7 kb 3'-Bereich von *ssp1*.

C-terminale *Ssp1*-eGFP Fusion

pSH15

Mit den Primern SH22-*NdeI* und SH17 wurde mit pSH4 als Matrize ein 1659 bp großes Fragment amplifiziert, das des *ssp1*-ORF von Position +1523 bis zum Stop-Codon umfasst, das durch eine *NdeI*-Schnittstelle ersetzt wird. Das Fragment wurde zwischenkloniert, sequenziert und daraus schließlich ein 611 bp *SacI*-*NdeI* Fragment isoliert, das einen Teil des *Ssp1* C-Terminus beinhaltet. *eGFP* wurde aus pSH14 mittels der Primer SH-*eGFP*-*AscI* und OAN7 als 700 bp Fragment amplifiziert, und durch gerichtete PCR-Mutagenese wurde eine *NdeI*-Schnittstelle am ATG und eine *AscI*-Schnittstelle nach dem Stop-Codon eingesetzt. *eGFP* wurde als *NdeI*-*AscI*-Fragment isoliert.

Aus pSH4 wurde ein 243 bp *MluI*-*NsiI* Fragment aus dem *ssp1* 3'-Bereich isoliert. Alle Fragmente wurden in pSL1180 (*SacI*-*NsiI*) ligiert.

pSH16

Dieses Konstrukt beinhaltet einen den C-Terminus von *Ssp1* kodierenden Bereich als translationale *eGFP* Fusion, danach die *ssp1*-Polyadenylierungsstelle und danach die Hyg^R. pSH15 wurde mit *NsiI* und *BglII* restringiert und mit der Hyg^R-Kassette (2985 bp, *NsiI*-*PmlI*) aus pSLHyg(-) und einem 611 bp *SnaBI*-*BglIII* Fragment aus pSH4 (*ssp1* 3'-Bereich) ligiert.

Überproduktion von *ssp1*

pSH-*o2tef*-1#11

Aus pCU4 (A. Brachmann, 2001) wurde der *o2tef*-Promoter als 903 bp *NotI*-*NdeI*-Fragment isoliert. Mit den Primern SH12 und SH20 wurde ein 835 bp Fragment aus dem *ssp1*-ORF amplifiziert, wodurch durch gerichtete PCR Mutagenese eine *NdeI*-

Schnittstelle am *ssp1*-ATG eingeführt wurde. Nach Restriktion mit *NdeI* und *HpaI* wurde ein 187 bp *NdeI*-*HpaI* Fragment isoliert. Aus pSH4 wurde ein 1492 bp *HpaI*-*EcoRI* Fragment aus dem *ssp1*-ORF isoliert. Die Fragmente wurden in geschnittenen pBS-SKII+ (*NotI*-*EcoRI*) ligiert.

pSH-o2tef-hyg-2

Dieses Plasmid enthält einen Teil des *sspl* 5'-Bereichs, danach die Hyg^R, danach den *o2tef*-Promoter als Fusion an die N-terminalen Sequenzen von *sspl*. Aus pSH4 wurde ein 1247 bp *AscI-XmnI* Fragment aus dem 5' Bereich von *sspl* isoliert. pSLHyg+ (A. Brachmann, 2001) wurde mit *XhoI* verdaut, die Schnittstelle mit Klenow-Enzym aufgefüllt, mit *NotI* nachgeschnitten und die Hygromycin-B Resistenzkassette als 2974 bp *XhoI*-„blunt“-*NotI*-Fragment isoliert. Aus pSH-o2tef-1#11 ein 1688 bp *NotI-EcoRI*-Fragment isoliert (*o2tef*-Promoter mit N-terminalen Teil von *sspl*). Die Fragmente wurden in pNEB193 (*AscI-EcoRI*) ligiert.

pSH-crg1-1#2

Aus pRU12 (A. Brachmann, 2001) wurde der *crg1*-Promoter als 1468 bp *NotI-NdeI* Fragment isoliert. Mit den Primern SH12 und SH20 wurde ein 835 bp Fragment aus pSH4 amplifiziert, wodurch durch gerichtete PCR Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle am *sspl* ATG eingeführt wurde. Nach Restriktion mit *NdeI* und *XhoI* wurde ein 268 bp *NdeI-XhoI*

Fragment isoliert. Aus pSH6 wurde ein 1004 bp *XhoI-BamHI* Fragment aus dem ORF von *sspl* isoliert. Die Fragmente wurden in den mit *NotI* und *BamHI* restringierten Vektor pBS-SKII+ ligiert.

pSH-crg1-hyg-2

Diese Plasmid beinhaltet einen Teil des *sspl* 5'-Bereichs, danach die Hyg^R, danach den *crg1*-Promoter als Fusion an die N-terminalen Sequenzen von *sspl*. Aus pSH4 wurde ein 1247 bp *AscI-XmnI* Fragment aus dem 3' Bereich von *sspl* isoliert. pSLHyg+ (A. Brachmann, 2001) wurde mit *XhoI* verdaut, die Schnittstelle mit Klenow-Enzym aufgefüllt, mit *NotI* nachgeschnitten und die Hygromycin-B Resistenzkassette als 2974 bp *XhoI*-„blunt“-*NotI*-Fragment isoliert. Aus pSH-crg1-1#2 wurde ein 2740 bp *NotI-BamHI* Fragment isoliert (*crg1g*-Promoter und N-terminaler Teil des *sspl* Gens). Die Fragmente wurden in den mit *NotI* und *BamHI* restringierten Vektor pBS-SKII(+) ligiert.

sspl*-Promotoranalyse*pSH-P-1**

Beinhaltet den *sspl* 5'-Bereich von Position -2589 bis +1 fusioniert an *eGFP*. Der Vektor pRU3 (A. Brachmann, 2001) wurde mit *HpaI* und *NotI* verdaut und die 4.4 kb Vektorbande isoliert. Aus dem Plasmid pSH14 wurde ein 1802 bp *EcoRI-NotI*-Fragment isoliert, welches 1070bp *sspl* 5' Bereich fusioniert an *eGFP* enthält. Aus dem Vektor pSH4 wurde ein 1525 bp *EcoRV-EcoRI* Fragment aus dem *sspl* 5' Bereich isoliert. Die Fragmente wurden ligiert, so dass das neue Plasmid ca. 2.6 kb *sspl* 5' Bereich fusioniert an *eGFP* beinhaltet.

pSH-P-2

Beinhaltet den *sspl* 5'-Bereich von Position -1655 bis +1 fusioniert an *eGFP*. Der Vektor pRU4 (A. Brachmann, 2001) wurde *HpaI-NotI* verdaut und die 4.4 kb Vektorbande isoliert. Das Plasmid pSH-P-1 wurde mit *MluI*

linearisiert, die Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt, anschließend wurde mit *NotI* geschnitten und ein 2380 bp *MluI*-„blunt“-*NotI* Fragment (1655 bp *sspl* 5' Region und 725 bp *eGFP*) in pRU4 ligiert.

pSH-P-3

Beinhaltet den *sspl* 5'-Bereich von Position -1062 bis +1 fusioniert an *eGFP*. Der Vektor pRU4 (A. Brachmann, 2001) wurde *HpaI-NotI* verdaut und die 4.4 kb Vektorbande isoliert. Das Plasmid pSH-P-1 wurde mit *EcoRI* linearisiert, die Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt, anschließend wurde mit *NotI* restringiert und ein 1787 bp *EcoRI*-„aufgefüllt“-*NotI* Fragment (1062 bp *sspl* 5' Region und 725 bp *eGFP*) in pRU4 ligiert.

pSH-P-4

Beinhaltet den *sspl* 5'-Bereich von Position -1062 bis +1 fusioniert an *eGFP*. Der Vektor

pRU4 (A. Brachmann, 2001) wurde *HpaI-NotI* verdaut und die 4.4 kb Vektorbande isoliert. Das Plasmid pSH-P-1 wurde mit *Hind III* linearisiert, die Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt, anschließend wurde mit *NotI* geschnitten und ein 1355 bp *Hind III*-„aufgefüllt“-*NotI* Fragment (630 bp *ssp1* 5' Region und 725 bp *eGFP*) in pRU4 ligiert.

pSH-P-5

Beinhaltet den *ssp1* 5'-Bereich von Position -2143 bis +1 fusioniert an *eGFP*. Der Vektor pRU4 (A. Brachmann, 2001) wurde *HpaI-NotI* verdaut und die 4.4 kb Vektorbande isoliert. Das Plasmid pSH-P-1 wurde mit *NaeI* und *NotI* geschnitten und ein 2868 bp *NaeI-NotI* Fragment (2143 bp *ssp1* 5' Region und 725 bp *eGFP*) isoliert und in pRU4 ligiert.

pSH-P-6

Beinhaltet den *ssp1* 5'-Bereich von Position -1869 bis +1 fusioniert an *eGFP*. Der Vektor pRU4 (A. Brachmann, 2001) wurde *HpaI-NotI* verdaut und die 4.4 kb Vektorbande isoliert. Das Plasmid pSH-P-1 wurde mit *BsaAI* und *NotI* geschnitten und ein 2594 bp *NaeI-NotI* Fragment (1869 bp *ssp1* 5' Region und 725 bp *eGFP*) isoliert und in pRU4 ligiert.

pSH-P-7

Beinhaltet den *ssp1* 5'-Bereich von Position -2589 bis -2143 fusioniert an -1869 bis +1, der vor das *eGFP* Gen kloniert wurde. Der Vektor pRU4 (A. Brachmann, 2001) wurde *NaeI-NotI* verdaut eine 4865 bp Bande isoliert. pSH-P-1 wurde mit *NotI-BsaAI* verdaut und ein 2594 bp Fragment isoliert. Beide Fragmente wurden ligiert. Der Vektor beinhaltet den *ssp1*-5' Bereich mit einer 274 bp Deletion zwischen den früheren *NaeI*- und *BsaAI*-Schnittstellen fusioniert an *eGFP*.

pssp1-cisI-mfaI#22

Beinhaltet ein 455 bp Fragment aus dem *ssp1* 5'-Bereich (-2589 bis -2143) fusioniert an den *mfaI*-Basalpromoter und *eGFP*. Das Plasmid pUMA13 wurde mit *BamHI* geschnitten, die Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dephosphoryliert. Aus pSH4 wurde ein 443 bp *EcoRV-NaeI*-Fragment aus dem *ssp1*-5' Bereich isoliert und in obigen Vektor als in der wie im wt Locus vorliegenden 5'-3' Orientierung kloniert.

pssp1-cisI-mfaI#7

Beinhaltet ein 455 bp Fragment aus dem *ssp1* 5'-Bereich (-2143 bis -2589) fusioniert an den *mfaI*-Basalpromoter und *eGFP*. Das Plasmid pUMA13 wurde mit *BamHI* geschnitten, die Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dephosphoryliert. Aus pSH4 wurde ein 455 bp *EcoRV-NaeI*-Fragment aus dem *ssp1*-5' Bereich isoliert und in obigen Vektor ligiert.

pssp1-cisII-mfaI#28

Beinhaltet ein 720 bp Fragment aus dem *ssp1* 5'-Bereich (-2589 bis -1869) fusioniert an den *mfaI*-Basalpromoter und *eGFP*. Das Plasmid pUMA13 wurde mit *BamHI* geschnitten, die Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dephosphoryliert. Aus pSH4 wurde ein 720bp *EcoRV-BsaAI*-Fragment (*ssp1*-5' Bereich) isoliert und in obigen Vektor in 5'-3' Orientierung kloniert.

pssp1-cisII-mfaI#35

Beinhaltet ein 720 bp Fragment aus dem *ssp1* 5'-Bereich (-1869 bis -2589) fusioniert an den *mfaI*-Basalpromoter und *eGFP*. Das Plasmid pUMA13 wurde mit *BamHI* geschnitten, die Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dephosphoryliert. Aus pSH4 wurde ein 720bp *EcoRV-BsaAI*-Fragment (*ssp1*-5' Bereich) isoliert und in umgekehrter Orientierung (5'-3') kloniert.

pET-System: Ssp1-Expression in *E. coli*

pET-Ssp1#9

Dieses Plasmid beinhaltet das gesamte *ssp1* Gen mit einem N-terminalen His-Epitop. Mit den Primern SH30-*NdeI* und SH6 wurde ein 676 bp Fragment aus dem *ssp1* ORF amplifiziert, in den Vektor pCR2.1 kloniert und anschließend sequenziert. Aus diesem Vektor pTopo-*NdeI*-ATG#4 wurde ein 181 bp großes *NdeI*-*HpaI* Fragment isoliert und zusammen mit einem 1492 bp *HpaI*-*EcoRI* Fragment aus dem pSH4 in den Vektor pSL1180 ligiert, wodurch das Plasmid pSL-*EcoRI*-*NdeI*#4-1 entstand. Aus pSH4 wurde ein 1569 bp großes *EcoRI*-*SalI* Fragment isoliert, die *SalI*-Schnittstelle mit T4-DNA Polymerase aufgefüllt und das Fragment anschließend in den mit *EcoRI* und *SmaI* restringierten Vektor pSL1180 kloniert. Aus diesem Plasmid pSL-*ssp1*-*BamHI*-*EcoRI*#11 wurde ein 1585 bp *EcoRI*-*BamHI* Fragment isoliert und zusammen mit einem 1673 bp *NdeI*-*EcoRI* Fragment aus pSL-*EcoRI*-*NdeI*#4-1 in einer 3-Fragmentligation in pET15b kloniert, wodurch der Vektor pET-Ssp1#9 entstand.

4.1.5 Strategie zur Isolierung des *ssp1*-Gens

PCR-Ansatz

Mittels degenerierter Oligonukleotide, die auf Basis der Ssp1-Peptidfragmente LysC-1, LysC-4, LysC-7 und Lys-C14 erstellt wurden, sollte *ssp1* aus genomischer *U. maydis* DNA des Stammes FB1 amplifiziert werden. Die Oligonukleotide wurden unter Berücksichtigung des IUPAC Codes konstruiert. Von den unten aufgeführten Oligonukleotiden wurden die folgenden Kombinationen in verschiedenen PCR-Reaktionen mit genomischer *U. maydis* DNA eingesetzt:

SH7-1 + SH14-2; SH7-1 + SH4-2; SH7-1 + SH1-2; SH7-2 + SH14-2; SH7-1 + SH4-2; SH7-1 + SH1-2; SH7-3 + SH14-1; SH7-3 + SH4-1; SH7-3 + SH1-1; SH7-4 + SH14-1; SH7-4 + SH4-1; SH7-4 + SH1-1; SH14-1 + SH4-2; SH14-1 + SH1-2; SH14-2 + SH4-1; SH14-2 + SH1-1; SH4-1 + SH1-2; SH 42 + SH1-1.

PCR:

Denaturierung: 5' 94°C

Amplifikation: 35 Zyklen

1' 94°C; Temperaturgradient 53°C - 65°C; Polymerisation durch Taq 3' 72°C; 1 Zyklus 72°C, 8 Minuten.

Mit den Primerkombinationen SH7-4/SH14-1, SH7-4/SH4-1 und SH7-4/SH1-1 wurden 3 verschiedenen große DNA-Banden (261 bp, 186 bp und 1567 bp) erhalten, die in pCR[®]2.1-TOPO kloniert und mittels der Oligonukleotide UNI24 und REV24 sequenziert wurden.

Cosmidisolierung, Kartierung und Sequenzierungsstrategie

Um das für Ssp1 kodierende Gen aus einer Cosmidbank (Bölker et al., 1995) zu isolieren, wurde aus dem Plasmid pSH3 ein ca. 200 bp großes *EcoRI*-Fragment, welches einen Teil des offenen Leserahmens des *ssp1* Gens enthält, isoliert. Das Fragment wurde radioaktiv markiert und als Sonde zur Hybridisierung von Cosmidpool-Filtern eingesetzt. Hieraus ergab sich ein Signal in dem Cosmidpool#19 für die beiden Cosmide B18 und B10. Vom Cosmid B10 wurde DNA isoliert und diese zur Kartierung des Gens mit verschiedenen Restriktionsenzymen in Einzel- und Doppelrestriktionen geschnitten. Die restringierte DNA wurde auf 0.8% Agarosegelen aufgetrennt und die DNA für Southern Analysen auf Hybond N+ Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit obiger Sonde hybridisiert. Anhand eines Vergleichs von Bandenmustern im Gel und Hybridisierungssignalen der Membran wird eine Kartierung des gesuchten Gens möglich. Für die Subklonierung eines das *ssp1*-Gen enthaltenen Cosmidfragments wurde ein ca. 7.6 kb großes *EcoRV*-Fragment ausgewählt, da nach *EcoRV*-Verdau des Cosmides B10 nur diese eine Bande eine Hybridisierung mit der Sonde zeigte. Der so entstandene Vektor pSH4 wurde zur weiteren Kartierung wie bereits erläutert mit verschiedenen Enzymen restringiert, und die Southern Analysen mit obiger Sonde hybridisiert. Abgeleitet aus diesen Ergebnissen wurden die verschiedene Subklone pSH5, pSH6, pSH7, pSH8, pSH9, pSH10 und pSH11 erstellt und die inklonierten Fragmente sequenziert (Tab. 7), wodurch überlappende Sequenzbereiche identifiziert werden konnten (Abb. 30).

Tabelle 6: Für die Sequenzierung der Subklone verwendete Oligonukleotide

Plasmid	Oligonukleotide
pSH5	UNI24, REV24, SH1, SH2
pSH6	UNI24, REV24., SH5, SH6, SH12
pSH7	UNI24, REV24,
pSH8	SP6, T7, SH7, SH8, SH9, SH10
pSH9	UNI24, REV24,
pSH10	UNI24, REV24., SH9, SH10
pSH11	SP6, T7
pSH4	SH11

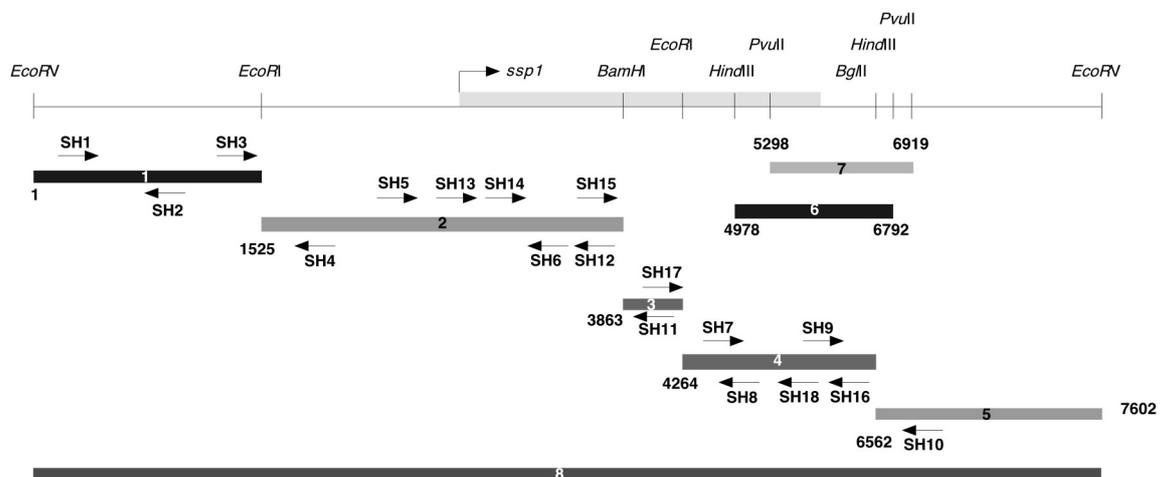


Abb. 30: Kartierung des 7.6 kb *EcoRV* Fragments aus dem Cosmid B10 im Vektor pSH4. Die verschiedenen subklonierten Fragmente sind schematisch als Balken dargestellt. Die bei der Kartierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Fragment #1: pSH5; #2: pSH6; #3: pSH7; #4: pSH8; #5: pSH9; #6: pSH10; #7: pSH11, #8: pSH4. Die Basenpositionen der verschiedenen Restriktionsfragmente sind angegeben, ebenso die Lage der zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide.

Isolierung der *ssp1*-cDNA

Durchmusterung der λ gt10 cDNA Bank

Aus einer 20 ml \ddot{U} K des *E. coli* Stammes NM514 in YT-Medium wurde eine 1:100 Verdünnung in LB-Medium mit 0.4% Maltose (50 ml) umgeimpft. Nach Erreichen einer OD_{600} von ca. 0.7 wurden die Zellen für 10 min auf Eis gestellt, abzentrifugiert (4°C, 3500 r.p.m., 15 min) und in 10 ml 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert. Die Zellen wurden bei 4°C aufbewahrt. Eine 1:1000 fache Verdünnung der Bank (Schauwecker et al., 1995) sollte etwa 50000 Phagenplaques entsprechen. 100 μ l Phagenverdünnung (1:1000) + 100 μ l kompetente MN415 werden für 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 11 ml Na-Soft Agar (45°C) gemischt und damit die viereckige Petrischalen mit Medium für Phagenscreen

überschichtet. Nach 6-12 stündiger Inkubation bei 37°C sind die Phagenplaques im Bakterienrasen gut zu sehen. Sind die Plaques zu dicht aneinander, muss eine größere Verdünnung gewählt werden. Eine in Form der Platten ausgeschnittene Hybond N+ Membran wird auf den Agar gelegt (2 Replikafilter pro Platte). Die Filter werden anschließend wieder abgenommen, umgedreht und für 5 min auf mit DENAT getränktes Whatman-Papier, dann für 5 min auf mit RENAT getränktes Whatman-Papier gelegt. Die Filter werden 20 min in 2xSSC gewaschen, auf Whatman-Papier getrocknet und mit UV quervernetzt (Stratagene, UV-Linker, 1200 µJ x100/cm²). Die Platten mit den Phagenplaques werden bei 4°C aufbewahrt.

Für die Hybridisierung der Filter wurden folgende radioaktiv markierten Sonden aus dem ORF von *ssp1* verwendet: ein 2206 bp *HpaI-HindIII* Fragment und die beiden PCR-Produkte SH11/SH13 (1465 bp) und SH10/SH17 (1670 bp). Die Filter werden bei 65°C hybridisiert. Wenn sich auf beiden Replikafiltern an der gleichen Stelle ein Signal befindet, wird der Phagenplaque an der entsprechende Stelle aus dem Agar ausgeschnitten und in 500 µl SM Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Isolierung der Phagen-DNA

Aus den in 500 µl SM-Lösung gelagerten und gelösten Phagenplaques wurden 200 µl entnommen und zusammen mit 200 µl kompetenten NM514 Zellen für 15 min bei 37°C inkubiert, in 15 ml LB-Medium mit 0.4% Maltose und 10 mM MgSO₄ überimpf und Ü/N bei 37°C auf dem Schüttler (120 r.p.m.) inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils 750 µl Chloroform zugegeben, die Kulturen für 20` bei 28°C unter schütteln inkubiert und 30 min zentrifugiert (3500 r.p.m., 18°C, Haereus). Das Zellpellet wurde in 15 ml 20% PEG6000 + 2 M NaCl gelöst, für 90 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (30 min, 10.000rpm, 4°C). Nach Abgießen des Überstandes soll die PEG6000 + 2 M NaCl Lösung möglichst gut entfernt werden. Das Zellpellet wird in 3 ml SM gelöst und nach Zugabe von 3 ml TE-Phenol (pH 7.8) 30` bei 28°C kräftig geschüttelt, 5 min gevortext und dann abzentrifugiert (30 min, 4°, 10000 r.p.m.). Im zweiten Schritt wird der Überstand erneut mit dem gleichen Volumen TE-Phenol (pH 7.8), im dritten Schritt mit einem Volumen TE-Phenol-Chloroform (1:1) versetzt. Inkubation bei 28°C und Zentrifugationsschritt wie oben. Der wässrige Überstand des dritten Phenolschrittes wird mit 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2 Volumen 100 % Ethanol gemischt, für 40 min bei -20°C gefällt, abzentrifugiert (30 min, 10000 rpm, 4°C) und DNA-Pellet mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Nach trocknen des DNA-Pellets wird es in ca. 200 µl 1 x TE Puffer mit RNaseA bei 37°C gelöst.

Im Falle der *ssp1* cDNA-Isolierung wurde aus den Phagenplaques #1A, 3C, 4A, 5C, 6D, 7A, 8A, 11A, 14A mit obigem Verfahren Phagen-DNA isoliert.

Klonierung der *ssp1*-cDNA Fragmente

Die λgt10 Bank (Schauwecker et al., 1995) beinhaltet *U. maydis* cDNA, die als *EcoRI*-Fragment in die mit *EcoRI*-Linkern versehenen Phagenarme ligiert wurde. Aus diesem Grund kann die cDNA nach *EcoRI* Verdau isoliert werden. Die Phagen-DNA der Klone #1A, 3C, 4A, 5C, 6D, 7A, 8A, 11A, 14A wurde mit *EcoRI* verdaut, die Fragmente aus dem Gel eluiert und in den Vektor pTZ18R ligiert. Die entstandenen Plasmide pTZ-ssp1-1A, -3C, -4A, -5C, -6D, -8A, -11A und -14A sind unter „Plasmidkonstruktionen“ aufgeführt. Der Phagenklon #4A beinhaltet das größte cDNA Fragment. Mit Hilfe der Oligonukleotide Lamda 1231 und Lamda 1232, die an Sequenzen der Phagenarme binden, wurde das Fragment #4A mit PCR amplifiziert, in den Vektor pCR@2.1-TOPO kloniert und sequenziert. Der entstandene Vektor pSH12#2 beinhaltet eine 2023 bp große, jedoch unvollständige cDNA des *ssp1*-Gens von Basenpaarposition +1169 im Gen bis zum Stop-Codon (Position 3192) und darüber hinaus die Polyadenylierungsstelle 183 bp nach dem Stop-Codon.

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

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

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

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

RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.* (1972). Zur Herstellung 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 r.p.m. inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 r.p.m. und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformations-Ansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁶ Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung:

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
30 mM K-Acetat
10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15% (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid.}
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und
sterilfiltrieren

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15% (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid.}
mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und
sterilfiltrieren

4.2.2 *Ustilago maydis*

Kultivierung von *Ustilago maydis*

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

Induktion von Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Glucose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu OD₆₀₀ 0,5 bei 29°C und 200 r.p.m. inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen H₂O_{bid.} resuspendiert. Nach nochmaliger Pelletierung (3.000 r.p.m., 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in Flüssigmedium resuspendiert, das induzierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle). Die Kulturen wurden bei 29°C und 200 r.p.m. für die gewünschte Zeit geschüttelt. Bei der Zellernte wurden die Kulturen schnell auf 0°C heruntergekühlt und die weiteren Schritte auf Eis bzw. die Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt. Bei Induktion auf Festmedien wurde die Vorkultur unter reprimierenden Bedingungen durchgeführt.

Bestimmung der Zelldichte bei *Ustilago maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

Transformation von *Ustilago maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS_{light}-Medium verdünnt und bei 29°C bis zu einer Zelldichte von 1,2 x 10⁷ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 r.p.m., 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 r.p.m. (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine

weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf antibiotikumhaltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden zum Teil mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern Analysen verifiziert. Die Stämme wurden vor weiteren Experimenten insgesamt dreimal vereinzelt.

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC:

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂

STC/PEG:

15 ml STC
10 g PEG4000

Kreuzungsversuche bzw. Test auf filamentöses Wachstum

U. maydis-Stämme wurden von Platte in YEPS-Flüssigmedium inokuliert. Bei 29°C wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 r.p.m. für 7 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H₂O_{bid.} so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD₆₀₀ = 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurde gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3 µl auf eine PD-CC-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 h bei 21°C unter Luftabschluss inkubiert. Anschließend wurde der Kreuzungsversuch anhand der Filamentbildung ausgewertet.

Test auf Endoglukanasesekretion (EG1-Aktivität) in *Ustilago maydis*: Nachweis von Cellulase-Aktivität auf Platten

Als Substrat zum Nachweis der Enzymaktivität von Endoglucanasen diente wasserlösliche Carboxymethylcellulose (CMC, low viscosity grade, SIGMA). Zum Nachweis der Cellulase Aktivität wurden CMC-Platten mit *U. maydis* beimpft. Dies geschah entweder durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen von Flüssigkulturen, durch Ausstriche von Platte oder durch Auftropfen von 5 – 20 µl Flüssigkultur auf die CMC-Platten. Die CMC-Platten wurden für 24 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgewaschen, die Platten 20 min mit 1% (w/v) Congo-Red (SIGMA) gefärbt und mit 1 M NaCl entfärbt. Cellulase-Aktivität wurde durch die Bildung heller Höfe angezeigt. Diese Höfe bilden sich, wenn die mit Congo-Red anfärbbare CMC von Endoglucanasen durch deren hydrolytische Aktivität gegenüber β-1,4 glykosidischen Bindungen abgebaut wurden.

CMC-Platten:

0.5 % Yeast Extract (Difco)
0.4 % Bacto peptone (Difco)
0.4 % Succrose
2% CMC
1.5% Agar (Bitek)

Test auf Pathogenität (Gillissen *et al.*, 1992)

Um *U. maydis*-Stämme auf Pathogenität zu testen, wurden mit in Flüssigkultur über Nacht angezogenen Zellen in 7-8 Tage alte Maispflanzen (Varietät Early Golden Bantam, Olds Seed Company, Madison, WI) bzw. 14-15 Tage alte Maispflanzen (Varietät Gaspar Flint, BEN BURR, Brookhaveb) inokuliert. Die Maispflanzen wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (14 h bei 28°C, 10 h bei 18°C) gezüchtet. Die Bonitur erfolgte nach 7 und 21 Tagen oder wie im Ergebnisteil angegeben.

Analyse der Teliosporenkeimung

Teliosporen aus getrockneten Tumoren werden für 15 min. in 1.5% CuSO₄ inkubiert, abzentrifugiert (13.000 r.p.m., 5 min., RT), zwei mal in H₂O_{bidest} gewaschen und anschließend auf PD-Medium plattiert, dem zusätzlich Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) oder weitere für eine Selektion nötige Antibiotika zugegeben sind. Nach ca. 17 - 24 h Inkubation bei 28°C beginnen die Teliosporen zu keimen. Zur mikroskopischen Analyse wurden Agarblöcke ausgeschnitten und auf einen Objektträger gegeben. Für die DiC-Mikroskopie wurde ein x100, 1,4 numerische Apertur Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) verwendet. Außerdem wurde die Keimung auf mit PD-Agar überzogenen Objektträgern in einer feuchten Kammer nach 15 bis 18 h Inkubation bei 28°C vollzogen. Desweiteren wurden Sporen in YEPS_{light}-Flüssigkultur (150mg Ampicillin/ml) bei 200 r.p.m. und 28°C nach 15 bis 18 h Inkubation beobachtet.

Test auf filamentöses Wachstum auf der Maispflanze

Zur Untersuchung des filamentöses Wachstums auf der Maispflanze und der Ausbildung von appressorienartigen Infektionsstrukturen wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Nach 24 h und 48 h wurde dann ein Stück von der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, ausgeschnitten und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten. Die Präparate wurden anschließend in einem Tropfen Wasser mittels DiC oder unter UV-Licht im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) untersucht.

Färbung von lipidhaltigen Zellkompartimenten in *U. maydis*

Lipidhaltige Organellen in keimenden Teliosporen wurden mit einer Nile Red Lösung (1% (w/v) Nile Red = Nile Blue Oxazone von SIGMA in Ethanol) sichtbar gemacht (modifiziert nach Greenspan *et al.*, 1985; Weber *et al.*, 1999). 25 µl der Färbelösung wurden zu ca. 300 µl Zellsuspension gegeben, und nach 5 min Inkubation bei RT in H₂O_{bidest} gewaschen. Die Zellen wurden zur mikroskopischen Analyse auf mit Polyvinylpyrrolidone beschichteten Deckgläsern fixiert und mit 1 x PBS (pH7.2) gewaschen. Danach wurde das Deckglas abgetropft und auf einen Objektträger gelegt. Das Präparat wurde mit VALAP versiegelt.

VALAP:

33% (w/w) Vaseline

33% (w/w) Lanolin

33% (w/w) Paraffin

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-

Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. 8 μ l der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft. Für die Betrachtung und photographische Dokumentation sind Zelldichten von etwa $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml ideal, die Kulturen sollten entsprechend verdünnt werden. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: SGFP und EGFP, 450-490 nm und 515-565 nm; Nile Red: Rhodaminfilter. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen PHOTOSHOP 5.5 (Adobe) und CANVAS 6.0/7.0 (Deneba) abgespeichert.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken sind ausführlich bei Sambrook *et al.*, 1989 beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD_{260} zu OD_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

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

STET:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0
50 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$
8% (w/v) Saccharose
5% (v/v) Triton X-100
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

DNA-Isolierung aus *Ustilago maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffmann und Winston, 1987. Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in $\text{YEPS}_{\text{light}}$ Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 r.p.m., 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 ml *Ustilago*-Lysispuffer und 400 ml TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 r.p.m., 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 ml des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 r.p.m., 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 ml TE mit 20 $\mu\text{g/ml}$ RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Ustilago-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
 50 mM Na₂-EDTA
 1% (w/v) SDS
 in H₂O_{bid.}

TE Phenol-Chloroform:

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

RNA-Isolierung aus *Ustilago maydis*-Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach Schmitt *et al.*, 1990. Zellen von einer frisch ausgestrichenen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis OD₆₀₀ 0,5 bei 29°C und 200 r.p.m. inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 r.p.m., 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600 ml AE-Puffer mit 1% (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 ml AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 r.p.m., 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600 ml AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 µl) wurde danach mit 40 ml 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 r.p.m., 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 ml H₂O_{bid.} oder RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 1 ml auf einem 1%igen TBE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260 nm gemessen.

AE-Puffer:

50 mM Na-Acetat, pH 5,3
 10 mM Na₂-EDTA
 in H₂O_{bid.}

RNA-Lagerpuffer:

1 mM Na-Citrat, pH 6,4
 in H₂O_{bid.}

AE-Phenol/Chloroform:

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

RNA-Isolierung aus *Ustilago maydis* (Isolierung nach der alkalischen Phenol-Methode nach Timberlake et al., 1986)

Diese Methode diente zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die für 48 h auf CM-Charcoal-Festmedien gewachsen waren. Dazu wurde das Pilzmaterial von 3 Platten abgekratzt, in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert (Retsch MM200 Zelmühle, Stickstoffgekühlt). Das gefrorene Pulver wurde mit 5 ml RNA-Lysepuffer durchmischt und durch Zugabe von flüssigem Stickstoff erneut eingefroren. Die Mischung wurde zu einem feinen Pulver gemörsert, in 10 ml TE-Phenol überführt, in diesem bei RT aufgetaut und anschließend mit 0,5 ml Glasperlen für 4 min in 50 ml PPN-Röhrchen heftig geschüttelt. Dem Ansatz wurden 10 ml Chloroform zugesetzt, nach Zentrifugation (15 min, 10.000 Upm, 4°C, Beckman Avanti[®]30 Zentrifuge) und Phasentrennung die wässrige Phase in neue Gefäße überführt, dreimal mit dem gleichen Volumen PC ausgeschüttelt, die RNA anschließend durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Li-Acetat für 2 h bei 0°C gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 10.000 rpm, 4°C, Beckman Avanti[®]30 Zentrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal in RNA-Waschpuffer gewaschen, nach Trocknung in H₂O_{bid.} aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur

Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1%-igen TAE-Agarosegel analysiert.

Lösung 1

250 mM EGTA
1,25 M NaCl
1 M Tris-Cl, pH 8,5
in H₂O_{bid.}

Lösung 2

12% (w/v) Na-*p*-Aminosalicylsäure
in H₂O_{bid.}, frisch ansetzen

Lösung 3

2% (w/v)
tri-*iso*-Propylnaphthalensulfonat
in H₂O_{bid.}, frisch ansetzen

Herstellung:

Unter ständigem Rühren 40 ml Lösung 2 langsam (!) in 40 ml Lösung 3 tropfen lassen, dann 20 ml Lösung 1 zugeben. Bei der Zugabe von Lösung 1 kann der Lysepuffer trüb oder flockig werden. Der pH wird mit NaOH auf 8,9 eingestellt. Ist der Lysepuffer trübe bzw. bildet sich ein Niederschlag, so muß er auf Eis so lange gerührt werden, bis er wieder klar wird. Vor Gebrauch kann der Lysepuffer filtriert werden; er ist auf Eis einen Tag haltbar.

Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (15.000 rpm, RT, Heraeus[®] Biofuge 15) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneutem kurzem Zentrifugieren wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen H₂O_{bid.} oder TE-Puffer gelöst.

Maxipräparation von Cosmid- bzw. Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Maxicosmid- bzw. Maxiplasmidpräparation wurde mit dem JETSTAR[®]-Kit von Genomed durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

4.3.2 *in vitro*-Modifikationen von DNA (Sambrook et al., 1989)

Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Ein analytischer Ansatz enthielt:

0,5 µg DNA
10 µg Albumin (falls empfohlen)
1-2 U Restriktionsenzym
in 20 µl Restriktionspuffer

Nach Inkubation für 1 h bei 37°C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 µl nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert.

Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg Plasmid-DNA
1 U Alkalische Phosphatase
in 100 µl Alkalische-Phosphatase-Puffer

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase und erneuter Inkubation (30 min bei 37°C) wurde zur Inaktivierung des Enzyms eine Extraktion mit 100 µl PC durchgeführt. Die wässrige Phase wurde direkt auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA mit JETSORB® (Genomed) isoliert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in fünffach molarem Überschuß gegenüber der dephosphorylierten, linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

100 ng linearisierten, dephosphorylierten Vektor
fünffach molarer Überschuß an linearem Fragment
1 U T4 DNA-Ligase
1 µl Ligase-Puffer
in 10 ml H₂O

Der Ansatz wurde entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14°C inkubiert. Für Ligationen von nicht-überhängenden Enden wurde generell über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

4.3.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook et al., 1989). In der Regel wurden Gele mit 1% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1×TAE- oder 0,5×TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1×TAE- bzw. 0,5×TBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 10:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (304 nm) mit einem Geldokumentationssystem (Stratagene) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der JETSORB[®]-Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen freizuwaschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen die DNA von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80-90 % isoliert werden.

Denaturierende Formamid/Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA

Da RNA-Fragmente, insbesondere solche mit hohem Molekulargewicht, partiell Sekundärstrukturen ausbilden, die das Laufverhalten im Agarosegel beeinflussen können, muß eine Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Die RNA-Probe (10 – 30 µg) wurde in 20 µl MOPS-Puffer mit 2,2 M Formaldehyd und 50% Formamid (deionisiert) für 15 min bei 65°C denaturiert, mit 2 µl denaturierendem Auftragspuffer und Ethidiumbromid (0,05 µg/ml Endkonzentration) versetzt und auf Eis gestellt. Für das Gel wurden 2 g Agarose in 145 ml H₂O_{bid.} aufgekocht und auf etwa 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 20 ml 10×MOPS-Puffer und 36 ml Formaldehyd (37%, filtriert) wurde die Agaroselösung gut gemischt und in Elektrophoreseschlitten gegossen. Die aufgetragenen Proben wurden bei 5-7 V/cm 2,5 h aufgetrennt.

Denaturierende Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese von RNA

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

MOPS-Puffer:

200 mM MOPS, pH 7,0
80 mM Na-Acetat
10 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

RNA-Auftragspuffer:

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

Transfer von Nukleinsäuren

Transfer von DNA (Southern-Blot)

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

wird. Anschliessend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 2 h.

DENAT-Lösung:

1,5 M NaCl

0,4 M NaOH

in H₂O_{bid.}**Transfer von RNA (Northern-Blot)**

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC über Nacht. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (302 nm, 120 mJ/cm²) kovalent mit der Membran verknüpft. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Metylenblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

20x SSC:

300 mM Na-Citrat, pH 7,0

3 M NaCl

in H₂O_{bid.}**Spezifischer Nachweis von an Membranen gebundener DNA**

Die Hybond N⁺ Membranen (Amersham Pharmacia) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 65°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte, radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 65°C mit Southern-Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphoimager Image Quant STORM840[®] (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphoimager eingelesen und mit dem dazugehörigen Computerprogramm Image Quant[®] bearbeitet.

Spezifischer Nachweis immobilisierter RNA im Northern Blot

Die Hybond-N⁺-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphoimager eingelesen und mit dem Computerprogramm ImageQuant (Molecular Dynamics) bearbeitet.

Hybridisierungspuffer:

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
50 mM PIPES
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

Waschpuffer:

1x SSC
0,1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern- und Southern Analysen

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von α -³²P-dCTP hergestellt. Das als Sonde vorgesehene denaturierte DNA-Fragment wird in einem Gemisch aus Hexanukleotiden zufälliger Sequenz (d(N)₆) durch den Einbau von α -³²P-dCTP vom Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I radioaktiv markiert. Dazu wurden 100-500 ng DNA-Fragment mit 5 μ l Primer (Amersham) in 34 μ l H₂O für 5 min bei 95°C denaturiert. Der Reaktionsansatz enthielt

34 μ l denaturierte Fragment/Primer-Lösung
10 μ l Reaction Buffer
5 μ l α -³²P-dCTP (10 mCi/ml)
1 μ l Klenow-Fragment (2 U/ μ l)

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die nicht eingebauten Nukleotide über QuickSpin[®] S-300 Säulen durch Zentrifugation abgetrennt. 2 μ l des Eluats wurden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Probe in einem LS 5000 TD Szintillationszähler (Beckman) nach Cherenkov gemessen. Die Gesamtaktivität der Proben lag zwischen 5 x 10⁶ und 2 x 10⁷ cpm. Zur Herstellung einer 18S-rRNA-spezifischen Sonde wurde das Oligonukleotid mit der Sequenz: ACG GGT TGA CAT TTT GTT GGC CCC T durch Phosphorylierung des 5'-Endes radioaktiv markiert. Dabei wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 50 μ Ci γ -³²P-ATP und 10 U T4-Polynukleotid Kinase (NEB Biolabs) für 45 min bei 37°C in PNK-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH7,5; 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂; 2 mM DTT) inkubiert. Überschüssige Nukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin G-25 Säulchen entfernt.

***ssp1*:**

200 bp *EcoRI* Fragment aus dem *ssp1*-ORF aus pSH3
2206 bp *HpaI-HindIII* 2206 bp aus dem *ssp1*-ORF aus pSH4
1465 bp PCR-Produkt (SH11/SH13) aus dem *ssp1*-ORF
1670 bp PCR-Produkt (SH16/SH17) aus dem *ssp1*-ORF

***U. maydis* 18S rRNA-Oligo:**

ACG GGT TGA CAT TTT GTT GGC
CCC T

***dik6*:**

420 bp *HindIII-BamHI* cDNA-Fragment aus pDik6 (R. Bohlmann, 1996)

***ppi1*:**

ein 165 bp *EcoRI* Fragment aus pCR-*ppi1*

***GFP*:**

ein 726 bp *NdeI-NotI* Fragment aus pRU4

4.3.4 Sequenz- und Strukturanalyse

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.*, (1977) In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na₂-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert werden.

Es wurden folgende Programme benutzt:

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

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

BLAST2 (Altschul *et al.*, 1990; 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

PROPSEARCH (Hobohm und Sander, 1995) zur Identifikation ähnlicher Proteine bzw. Proteinfamilien nach einem Algorithmus, der Proteinparameter wie z. B. Aminosäure-Zusammensetzung, molekulare Masse, Hydrophobizität und Ladung berücksichtigt.

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

PSORT2 (Nakai und Kanehisa, 1992; Nakai und Horton, 1999) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

SIGNALP (Nielsen *et al.*, 1997a; 1997b) zur Identifikation N-terminaler Signalpeptide.

CLUSTALW (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

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

4.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis *et al.*, 1990)

Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden. Man benötigt hierzu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Omni Gene-Gerät (Hybaid) oder einem Robocycler Gradient[®] (Stratagene) durchgeführt.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt:

100 ng DNA

5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)

5 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
1 µl dNTPs (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
1 µl Taq DNA-Polymerase (1 U/µl)
6 µl 25 mM MgCl₂
10 µl 10× PCR-Puffer
in 50 µl H₂O_{bid.}
(überschichtet mit 50 µl Paraffin, falls Reaktion ohne Heizdeckel).

Die Reaktion läßt sich in drei Abschnitte unterteilen:

1 Zyklus **Denaturierung** bei 94°C 4 Minuten. Er dient zur vollständigen Denaturierung der Template DNA. Erst nach diesem Schritt wurde die Taq DNA-Polymerase zu der Reaktion gegeben ("Hot Start").

30 Zyklen **Amplifikation**. Ist wiederum in drei Phasen unterteilt: 1' Denaturierung bei 94°C, 2' Binden der Primer bei 55-62°C, 1' Polymerisation durch Taq bei 72°C.

1 Zyklus **Verlängerung** bei 72°C 8 Minuten ist nötig um nicht vollständig synthetisierte Fragmente zu komplettieren

Die wichtigsten Parameter einer PCR-Reaktion sind die Temperatur, bei der die Primer binden, und die Konzentration von Mg²⁺-Ionen.

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

20 mM Tris-Cl, pH 8,8
10 mM KCl
10 mM (NH₄)₂SO₄
2 mM MgSO₄
1% (v/v) Triton X-100
1 mg/ml BSA
in H₂O_{bid.}

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

10 mM Tris-Cl, pH 8,3
50 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
in H₂O_{bid.}

Ganz-Zell-PCR aus *Ustilago maydis* Zellen

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

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

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Proteinisolation und immunologischer Nachweis

Gelsystem und Proteinstandard

Zur Auftrennung von Proteinen wurden SDS-haltige Polyacrylamid-Gele und ein diskontinuierliches Puffersystem (Lämmli, 1970) verwendet. Die Anfärbung der Proteine im Gel erfolgte mit Coomassie R250 brilliant blue (Sigma). Diese und andere Standardmethoden folgten den Protokollen von Sambrook *et al.* (1989). Als Proteinase-Inhibitor wurde in der Regel 1 mM Pefablock (Boehringer) oder 1x Complete EDTA-free (Roche) verwendet. Die Protein-Konzentration einer Lösung wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent (Pierce) bestimmt.

Proteingrößenstandard:

"Broad Range Marker" (NEB)

212 kDa, 156 kDa, 116 kDa, 97.2 kDa, 66.4 kDa, 55.6 kDa, 42.7 kDa, 36.5 kDa

„Prestained Proteinmarker, Broad Range“ (NEB)

175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47.5 kDa, 32.5 kDa, 25 kDa, 16.5 kDa

Isolierung von Gesamtprotein aus *Ustilago maydis*

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde entweder aus etwa 200 ml Flüssigkultur bei OD_{600} 0,5 oder von 2 rechteckigen (12 x 12 cm) Festmedienplatten, auf denen die Zellen mit $0,1 OD_{600}/cm^2$ ausgestrichen und dann 24 h bzw. 48 bei 29°C kultiviert wurden, durchgeführt. Im Fall der Flüssigkulturen wurden die Zellen pelletiert (3.000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), in 5 ml Proteinpuffer aufgenommen, erneut abzentrifugiert (3.000 rpm, 5 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) und schließlich in 1 ml Proteinpuffer mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Im Fall der Präparation von Festmedien wurden die Zellen von den Platten abgekratzt, direkt in die Becher gegeben und 1 ml 1x PBS (pH 7.2) mit Proteinase-Inhibitoren zupipettiert. Die Zellen wurden in der Zelmühle (Retsch MM200) zweimal für 5 min bei einer Frequenz von 30 pro Sekunde geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde gewartet, bis die Suspension aufgetaut aber noch kalt war, und in frische Eppendorf-Gefäße auf Eis pipettiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (22.000 rpm, 30 min, 4°C, Beckman Avanti30), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 6x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde mit 1x Probenpuffer inkubiert und ebenfalls 5 min. bei 95°C erhitzt. Zur Mengenbestimmung wurden vor der Zugabe von Probenpuffer Aliquots abgenommen und mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) die Proteinkonzentration bestimmt.

Probenpuffer (6x):

300 mM Tris-Cl, pH 8,0
 30% (v/v) Glycerin
 20% (w/v) SDS
 0,5 g/l Bromphenolblau
 15% (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)
 in H_2O_{bid} .

Proteinase-Inhibitoren:

234,4 μ g/ml Pefabloc (Roche)
 1 Tablette/50 ml Complete EDTA-free (Roche)

Isolierung von Gesamtprotein aus *Ustilago maydis* Teliosporen**1. Mörsern „by hand“**

Reife, trockene Teliosporen (ca. 3 g) wurden mit H_2O_{bid} gewaschen, abzentrifugiert (RT, 10.000 r.p.m., 30 min), in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Die lyophilisierten Teliosporen wurden mit 2 ml Extraktionspuffer (0.1 M Tris-HCl pH 8, 10 mM $MgSO_4$, 100 mM DTT, 1 mM PEFA-Block) ca. 120 Minuten auf Eis gemörsert, erneut in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Die Quarzsand-Teliosporenmischung wird danach für ca. 45 Minuten auf Eis gemörsert. Parallel wird das Aufbrechen der Teliosporen mikroskopisch mitverfolgt. Die aufgebrochenen Teliosporen werden mit 1x Lämmli-Puffer (+10 mM DTT, 1 % β -Mercaptoethanol) für 10 Minuten gekocht, abzentrifugiert und der Überstand auf ein SDS Polyacrylamidgel aufgetragen.

2. Retsch MM200 Zelmühle

Trockene Teliosporen (Volumen ca. 0.5 ml) wurden gewaschen (H_2O_{bid}), pelletiert (3.000 r.p.m., 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) und in 1 ml 1x PBS (pH 7.2) mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Die Zellen wurden in der Zelmühle (Retsch MM200) 10 bis 15 mal für 5 min bei einer Frequenz von 30 pro Sekunde geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde gewartet, bis die Suspension aufgetaut aber noch kalt war, und in frische Eppendorf-Gefäße auf Eis pipettiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (22.000 r.p.m., 30 min, 4°C, Beckman Avanti30), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 6x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Das Pellet wurde mit 1x Probenpuffer inkubiert und ebenfalls 5 min. bei 95°C erhitzt. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert.

SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Lämmli, 1970). Proteinextrakte werden dabei unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein 1 mm dickes Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der Grenze der Gele aufgrund des pH-Sprungs verdichtet und anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Es wurden in der Regel 100 μ g Proteinextrakt in einer Mini Protean II Apparatur (Biorad) bei 200V für 1 h aufgetrennt. Für die Auftrennung von Proteinextrakten zur Visualisierung von Ssp1 und Tubulin wurden 6 oder 10%ige Trenngele verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Proteingel-Laufpuffer:

25 mM Tris-Cl, pH 8,8
200 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

0,27% (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,1% (v/v) TEMED
in H₂O_{bid.}

Sammelgel:

125 mM Tris-Cl, pH 6,8
5% (w/v) Acrylamid
0,13% (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,1% (v/v) TEMED
in H₂O_{bid.}

Coomassie-Färbelösung:

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
45% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
in H₂O_{bid.}

Trenngel:

375 mM Tris-Cl, pH 8,8
10% bzw. 6% (w/v) Acrylamid

Entfärbelösung:

45% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
in H₂O_{bid.}

Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (PVDF, Immobilon-P von Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit H₂O_{bid.} gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 0.8 mA/cm²) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

Anodenpuffer 1:

300 mM Tris-Cl, pH 10,4
(15% (v/v) Methanol)
in H₂O_{bid.}

Kathodenpuffer:

25 mM Tris-Cl, pH 9,4
40 mM ε-Aminocapronsäure
(15% (v/v) Methanol)
in H₂O_{bid.}

Anodenpuffer 2:

30 mM Tris-Cl, pH 10,4
(15% (v/v) Methanol)
in H₂O_{bid.}

Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

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

Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h (oder ÜN, 4°C) mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST, inkubiert. Handelte es sich beim ersten AK um das polyklonale Ssp1-Anti-Serum, wurde dem TBST-Puffer noch 2% Milchpulver zugefügt. Nach viermaligem Waschen für 10 min. mit TBST wurde die Membran für 60 min. mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 0,5% Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 min. mit TBST und viermal für 10 min. mit 1xPBS gewaschen.

Es wurden folgende Antikörper verwendet: für Western Analysen zur Detektion von *Ustilago maydis* Tubulin ein monoklonaler Anti- α -Tubulin AK (Ab1) aus Maus gegen α -Tubulin aus Hühnerhirn (Oncogene) in einer Verdünnung 1:4.000; als sekundärer Antikörper wurde ein Anti-Maus IgG (H+L) HRP Konjugat aus Ziege (Promega) in einer Verdünnung 1:4.000. Das polyklonale Anti-Ssp1-Serum wurde in einer 1:10.000 Verdünnung eingesetzt, als sekundärer Antikörper ein polyklonaler Anti-Rabbit Antikörper von New England Biolabs in einer Verdünnung von 1:4.000.

Zur Detektion wurde der ECL+-Detektionskit (Boehringer) Die Membran wurde im Anschluss in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 1 h Exposition deutliche Banden zu erkennen.

TBST:

20 mM Tris-Cl, pH 7,6
136 mM NaCl
0,05% (v/v) Tween 20
in H₂O_{bid.}

1 x PBS:

20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
150 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

4.4.2 Expression eines His⁶-Ssp1 Fusionsproteins im pET Vektorsystem

Das Plasmid pET-Ssp1#9 wurde in den Stamm BL21-Codon+(DE3)-RIL (Stratagene) transformiert, auf yT Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 34 μ g/ml Chloramphenicol plattiert und Ü/N bei 37°C inkubiert. Aus einer Kolonie wurde eine Übernachtskultur angeimpft (30 ml dyT-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 34 μ g/ml Chloramphenicol). Von der ÜK wurde 1 ml in 100 ml LB Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin umgeimpft und die Kultur bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde als Nullwert 1 ml der Kultur entnommen, abzentrifugiert (3500 r.p.m., 5', RT) und das Zellpellet bei -20°C eingefroren. Die restliche Kultur wurde nach Zugabe von 1 ml 100 mM IPTG (Endkonzentration 1 mM) bei 28°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 3 h nach IPTG-Induktion wurden jeweils 1 ml der Kultur entnommen und wie oben zentrifugiert und eingefroren. Damit später gleiche Proteinmengen auf das SDS-Gel aufgetragen werden, wurde nach folgendem Schema vorgegangen: das Zellpellet von 1 ml Kultur mit OD₆₀₀ = 0.5 wurde in 25 μ l 1xLämmli Puffer aufgenommen, von 1 ml Kultur mit OD₆₀₀ = 0.6 in 30 μ l, von 1 ml Kultur mit OD₆₀₀ = 0.7 in 40 μ l usw. Die Proben wurde für 10' bei 95°C aufgeköcht, 2' zentrifugiert (22000 rpm, RT) und auf ein 10%iges SDS-PAGE aufgetragen. Zeigt sich die Expression des gewünschten Proteins, so wird die restliche Kultur abzentrifugiert und restliches Medium gründlich entfernt. Das Zellpellet kann weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren werden.

ribosomale Bindestelle, Thrombin für Trombinschnittstelle, His-TagTM für das 6xHis-Epitop, N und C symbolisieren N- und C-Terminus des Fusionsproteins. **B.** Expression von 6xHis-Ssp1 nach IPTG Induktion in *E. coli* Gesamtproteinextrakt. Die Proteinpräparation aus mit pET-Ssp1#9 transformierten Zellen zeigen 3 Stunden nach der IPTG Induktion bei 28°C eine deutliche Expression des 6xHis-Ssp1 Fusionsproteins (Spur 4, Pfeil) im Gegensatz zu den mit dem Kontrollplasmid pET15b transformierten Zellen (Spur 2) und zu den vor IPTG Zugabe entnommenen Kontrolleextrakten (0 h Werte in Spur 1 und 3). Molekulare Größenmarker sind eingezeichnet. **C:** Aufreinigungsschema des 6xHis-Ssp1 Fusionsproteins unter denaturierenden Bedingungen (6 M GuHCl) über Ni-NTA. Neben der Aufreinigung des Fusionsproteins wurde parallel eine gleiche Menge Proteinextrakt aus mit pET15b transformierter Zellen als interne Kontrolle analysiert. Die Guanidiniumhydrochlorid enthaltenden Fraktionen wurden vor dem Auftrag auf das SDS-Gel mit 10% TCA gefällt. Die Spur 1/2 beinhaltet die Fraktion der löslichen Proteine nach dem Zellaufschluss und Zentrifugation. Nach Inkubation der unlöslichen Zellbestandteile mit 6 M GuHCl und Zentrifugation zeigen die Spuren 3/4 Zellpellet nach GuHCl-Behandlung; 5+6: ÜS nach GuHCl-Behandlung; 7+8: Durchlauf der Ni-NTA Säule; 9+10, 11+12, 13+14: Waschschritte B-1,-2,-3 mit 5mM Imidazol; 15+16, 17+8, 19+20: Waschschritte I-1 bis -3 mit 20 mM Imidazol; 21+22, 23+24: Elution mit 200 mM Imidazol; 25+26: Elution mit 1M Imidazol. Molekulare Größenmarker sind eingezeichnet.

Herstellung des Antiserums gegen His⁶-Ssp1

Aus 4x 100 ml induzierter BL21-Codon+(DE3)-RIL Kultur wurde nach Affinitätsreinigung über Ni-NTA das Eluat mit 10% TCA gefällt, in 1x Lämmli Puffer für 10' auf 95°C gekocht und auf ein 6% SDS-PA Gel aufgetragen. Mit Hilfe des Proteinmarkers (NEB, Broad Range Marker) wurde die Proteinmenge abgeschätzt. Ca 400 µg His⁶-Ssp1 wurde aus dem Gel ausgeschnitten und für die Produktion eines polyklonalen Antikörper (Kaninchen) an die Firma Eurogentec geschickt.

4.5 Vergleich der Keimungsfähigkeit zwischen wt- und Δ *ssp1*-Teliosporen

4.5.1 Vergleich der Keimungsrate von wt- und Δ *ssp1*-Teliosporen

Teliosporen gleich alter Tumore der Infektionen FB1 x FB2 und SH1 Δ *ssp1*-4 x SH2 Δ *ssp1*-I wurden nach Vorschrift mit 1.5 % CuSO₄ behandelt und auf PD-Festmedium mit 100 μ g/ml Ampicillin plattiert. Nach 24 h Inkubation bei 28°C wurde die Keimungsrate der Sporen unter dem Mikroskop ausgezählt. Insgesamt wurden 6201 wt-Sporen und 6293 Δ *ssp1*-Sporen aus 4 unabhängigen Experimenten untersucht. Sowohl die Keimungsrate wie auch der Zeitpunkt des Keimungsbeginns zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante. Die mathematische Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms „Microsoft EXCEL“. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergaben sich keine signifikanten Änderungen in Bezug auf die Keimungsfähigkeit zwischen Wildtyp und Mutante (Abb. 32 A).

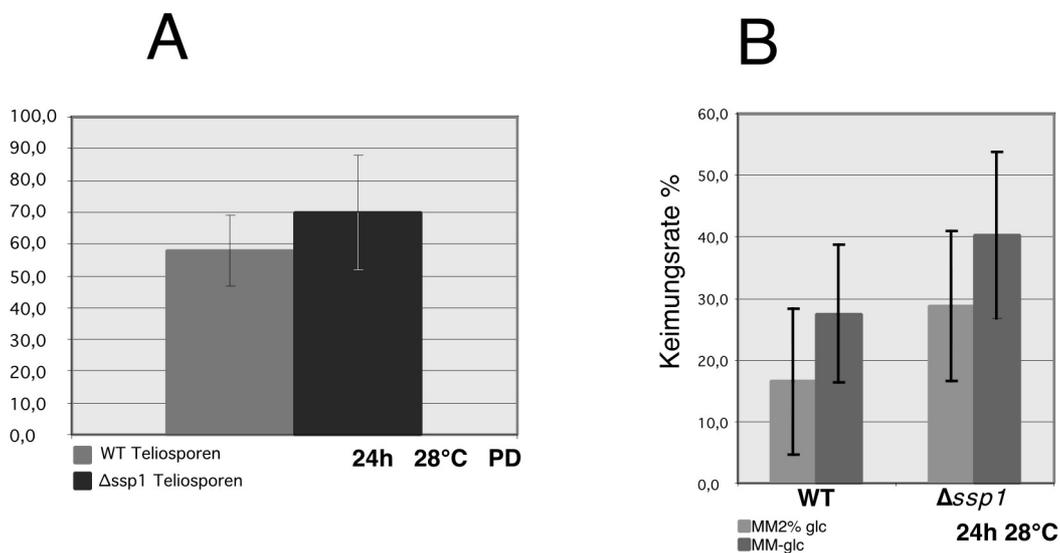


Abb. 32: Analyse der Keimungsrate von wt- und Δ *ssp1*-Teliosporen. **A.** Keimungsrate auf PD-Festmedium nach Inkubation für 24 h/28°C. Die Balken geben die Keimung in % an. **B.** Keimungsrate auf Minimalfestmedium mit oder ohne 2% Glukose nach 24 h/28°C. Die Balken geben die Keimungsrate an.

Untersuchung zum Einfluss von Glucose auf die Keimungsrate von *U. maydis* wt- und Δ *ssp1*-Teliosporen

Teliosporen gleich alter Tumore der Infektionen FB1 x FB2 und SH1 Δ *ssp1*-4 x SH2 Δ *ssp1*-I wurden nach Vorschrift mit 1.5 % CuSO₄ behandelt und auf Minimalmedium mit und ohne 1% Glukose (100 μ g/ml Ampicillin) plattiert. Die Keimungsrate der Sporen wurde nach 24 h Inkubation bei 28°C ausgezählt. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Insgesamt wurden ausgezählt:

Nach 24 h Kultivierung auf NM –glc: 1357 wt-Sporen, 1355 Δ *ssp1*-Sporen.

Nach 24 h Kultivierung auf NM +glc: 1303 wt-Sporen, 1355 Δ *ssp1*-Sporen.

Sowohl die Keimungsrate wie auch der Zeitpunkt des Keimungsbeginns zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen wt und Mutante. Die mathematische Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms „Microsoft EXCEL“. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergaben sich keine signifikanten Änderungen in Bezug auf die Keimungsfähigkeit zwischen wt und Mutante (Abb. 32).

Untersuchung des Einflusses von UV-Licht auf die Sporenkeimung

Teliosporen gleich alter Tumore der Infektionen FB1 x FB2 und SH1 Δ sspI-4 x SH2 Δ sspI-I wurden nach Vorschrift mit 1.5 % CuSO₄ behandelt und auf PD-Festmedium mit 100 μ g/ml Ampicillin plattiert. Nach UV-Bestrahlung im Bereich 200 bis 700 μ J x 100/cm² (Stratalinker, Stratagene) wurde die Sporenkeimung nach 24 h und nach 41 h Inkubation bei 28°C unter dem Mikroskop ausgezählt. Insgesamt wurden 6356 wt-Sporen und 5987 Δ sspI-Sporen aus 4 unabhängigen Experimenten untersucht. Sowohl die Keimungsrate wie auch der Zeitpunkt des Keimungsbeginns zeigte keine Unterschiede zwischen wt und Mutante in Bezug auf die verschiedenen Bestrahlungsstärken (nicht gezeigt). Die mathematische Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms „Microsoft EXCEL“.

Untersuchung des Einflusses von Methanol- und Chloroformbehandlung auf die Sporenkeimung

Teliosporen gleich alter Tumore der Infektionen FB1x FB2 und SH1 Δ sspI-4 x SH2 Δ sspI-I wurden für 1 min. in Methanol bzw. in Chloroform inkubiert und anschließen auf PD-Medium plattiert. Die Sporenkeimung wurde nach 24 h Inkubation bei 28°C unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Methanol-Behandlung:

wt Keimung: 0 % (222 ausgezählte Sporen)

Δ sspI Keimung: 0 % (265 ausgezählte Sporen)

Chloroformbehandlung:

wt Keimung: 0.4 % (265 ausgezählte Sporen)

Δ sspI Keimung: 6.3 % (270 ausgezählte Sporen)

Die mathematische Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms „Microsoft EXCEL“. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergaben sich keine signifikanten Änderungen in Bezug auf die Keimungsfähigkeit zwischen wt und Mutante.

Analyse der Meioseprodukte nach der Keimung von wt und Δ sspI Teliosporen

Teliosporen gleich alter Tumore der Infektionen FB1 x FB2 und SH1 Δ sspI-4 x SH2 Δ sspI-i wurden nach Vorschrift mit 1.5 % CuSO₄ behandelt und auf PD-Festmedium mit 100 μ g/ml Ampicillin plattiert. Für die Segregationsanalyse wurden die beiden Kreuzungstyploci *a* und *b* als phänotypische Marker ausgewählt. Zur Segregationsanalyse wurde eine Mikrokolonie, die aus einer gekeimten Spore

hervorgegangen war, isoliert und vereinzelt. 24 Einzelkolonien wurden gepickt, in PD-Flüssigmedium kultiviert und für eine Kreuzungsanalyse jeweils mit Kulturen der haploiden Stämme FB1, FB2, FB6a und FB6b gemischt und auf aktivkohlehaltige PD-Platten getropft und auf ihre Kreuzungsfähigkeit, die sich in der Ausbildung des weißlichen Luftmycels zeigt, getestet. Nach der Meiose sollte nach den mendelschen Gesetzmäßigkeiten eine Aufspaltung der Kreuzungstyploci im Verhältnis 1 (*a1 b1*) : 1 (*a2 b2*) : 1 (*a1 b2*) : 1 (*a2 b1*) erfolgen. Die Auswertung der Kreuzungen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen wt und Mutante (Tab. 8).

Tabelle 7: Analyse der Meioseprodukte

<i>Δssp1</i>					
Genotyp	<i>a1b1</i>	<i>a2b2</i>	<i>a2b1</i>	<i>a1b2</i>	Ausfall
	/	/	3	21	/
	4	2	4	14	/
	9	9	4	2	/
	/	/	21	3	/
	1	1	9	13	/
	6	5	4	9	/
	19	4	/	/	1
	6	18	/	/	/
	12	2	5	4	1
	6	18	/	/	/
	4	7	6	7	/
	/	/	24	/	/

WT					
	/	13	5	6	/
	4	/	15	9	/
	7	9	4	4	/

5. Literaturverzeichnis

- ADAMS, T. H., BOYLAN, M. T., und TIMBERLAKE, W. E.** (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**, 353-362.
- ADAMS, T. H., WIESER, J. K., und YU, J. H.** (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 35-54.
- AHRINGER, J.** (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* **16**, 351-356.
- AICHINGER, C.** (2000). Identifizierung pflanzenabhängig regulierter Gene in *Ustilago maydis* (München, Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU München).
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., und LIPMAN, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., und LIPMAN, D. J.** (1997). Gapped BLAST und PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- ANDEREGG, R. J., BETZ, R., CARR, S. A., CRABB, J. W., und DUNTZE, W.** (1988). Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mating hormone *a*-factor. Identification of S-farnesyl cysteine as a structural component. *J Biol Chem* **263**, 18236-18240.
- ANDRIANOPOULOS, A., und TIMBERLAKE, W. E.** (1994). The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**, 2503-2515.
- ANON** (1891). *Revista científica: El hongo del maiz, La Naturaleza*, Vol 1).
- AUSUBEL, F. M., BRENNER, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., und STRUHL, K.** (1987). *Current Protocols in Molecular Biology* (USA, John Wiley & Sons, Inc.).
- BANUETT, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**, 174-180.
- BANUETT, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1989). Different *a* alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1994a). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**, 1367-1378.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1994b). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycol* **18**, 247-266.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- BARRETT, K. J., GOLD, S. E., und KRONSTAD, J. W.** (1993). Identification and complementation of a mutation to constitutive filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol-Plant-Microbe-Interact* **6**, 274-283.
- BASSE, C. W., STUMPFERL, S., und KAHMANN, R.** (2000). Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol Cell Biol* **20**, 329-339.
- BIRD, A. P., und WOLFFE, A. P.** (1999). Methylation-induced repression belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451-454.
- BOHLMANN, R.** (1996) Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- BÖLKER, M., BÖHNERT, H. U., BRAUN, K. H., GÖRL, J., und KAHMANN, R.** (1995a). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- BÖLKER, M., GENIN, S., LEHMLER, C., und KAHMANN, R.** (1995b). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.

- BÖLKER, M., URBAN, M., und KAHMANN, R.** (1992). The *a* mating type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- BOTTIN, A., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- BOWERS, W. S., HOCH, H. C., EVANS, P. H., und KATAYAMA, M.** (1986). Thallophytic Allelopathy: Isolation and Identification of Laetisarinic acid. *Science* **269**, 105-106.
- BOYLAN, M. T., MIRABITO, P. M., WILLETT, C. E., ZIMMERMAN, C. R., und TIMBERLAKE, W. E.** (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**, 3113-3118.
- BRACHMANN, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE Heterodimer (München, Dissertation der Fakultät für Biologie).
- BREFELD** (1883). Botanische Untersuchungen über Hefepilze. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mycologie. In Die Brandpilze I (Leipzig).
- BRODOWSKY, I. D., HAMBERG, M., und OLIW, E. H.** (1992). A linoleic acid (8*R*)-dioxygenase and hydroperoxide isomerase of the fungus *Gaeumannomyces graminis*. Biosynthesis of (8*R*)-hydroxylinoleic acid and (7*S*,8*S*)-dihydroxylinoleic acid from (8*R*)-hydroperoxylinoleic acid. *J Biol Chem* **267**, 14738-14745.
- CALLOW, J. A., und LING, I. T.** (1973). Histology of neoplasms and chlorotic lesions in maize seedlings following the infection of sporidia of *Ustilago maydis* (DC) Corda. *Physiol Plant Pathol* **3**, 489-494.
- CALVO, A. M., GARDNER, H. W., und KELLER, N. P.** (2001). Genetic Connection between Fatty Acid Metabolism and Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **276**, 25766-25774.
- CHAMPE, S. P., und EL-ZAYAT, A. A.** (1989). Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **171**, 3982-3988.
- CHAMPE, S. P., RAO, P., und CHANG, A.** (1987). *J. Genet Microbiol* **133**, 1383-1388.
- CHANG, Y. C., und TIMBERLAKE, W. E.** (1993). Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics* **133**, 29-38.
- CHRISTENSEN, J. J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- CHU, S., DERISI, J., EISEN, M., MULHOLLAND, J., BOTSTEIN, D., BROWN, P. O., und HERSKOWITZ, I.** (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.
- CHU, S., und HERSKOWITZ, I.** (1998). Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Mol Cell* **1**, 685-696.
- CLANCY, M. J.** (1998). Meiosis: step-by-step through sporulation. *Curr Biol* **8**, R461-463.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C., und HSU, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- DAVEY, J.** (1992). Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone. *Embo J* **11**, 951-960.
- DAY, P. R., und ANAGNOSTAKIS, S. L.** (1971). Corn smut dicaryon in culture. *Nature New Biol* **231**, 19-20.
- DEML, G.** (1977). Feinstrukturelle Merkmalsanalysen an *Ustilaginales*-Arten. *Pilzkd* **43**, 291-303.
- DOUGLAS, S. E.** (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol* **3**, 37-45.
- ECKERSKORN, und LOTTSPREICH** (1989).
- EDDY, S. R.** (1995). Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 114-120.
- ELLIOTT, W. J., MORRISON, A. R., SPRECHER, H., und NEEDLEMAN, P.** (1986). Calcium-dependent oxidation of 5,8,11-icosatrienoic acid by the cyclooxygenase enzyme system. *J Biol Chem* **261**, 6719-6724.
- FENG, L., SUN, W., XIA, Y., TANG, W. W., CHANMUGAM, P., SOYOOLA, E., WILSON, C. B., und HWANG, D.** (1993). Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* **307**, 361-368.
- FEUSSNER, I.** (1996). Lipid-body lipooxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipooxygenase forms. *Planta* **198**, 288-293.

- FEUSSNER, I., BALKENHOHL, T. J., PORZEL, A., KUHN, H., und WASTERNAK, C.** (1997a). Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. *J Biol Chem* **272**, 21635-21641.
- FEUSSNER, I., und KÜHN, H.** (2000). Applications of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids, In "Enzymes in lipid modification", Wiley-VCH
- FEUSSNER, I., KUHN, H., und WASTERNAK, C.** (1997b). Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate beta-oxidation? *FEBS Lett* **406**, 1-5.
- FEUSSNER, I., KUHN, H., und WASTERNAK, C.** (2001). Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6**, 268-273.
- FISCHER, G. W., und HOLTON, C. S.** (1957). Biology and control of the smut fungi (New York, Ronald Press Co.).
- FOTHERINGHAM, S., und HOLLOMAN, W. K.** (1989). Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes. *Mol-Cell-Biol* **9**, 4052-4055.
- FUENTES-DAVILA, G., und DURAN, R.** (1986). *Tilletia indica*: cytology and teliospore formation *in vitro* and in immature kernels. *Ca J Bot* **64**, 1712-1719.
- GERHARDT, B.** (1993). Catabolism of fatty acids in lipid metabolism in plants, CRC Press).
- GILLISSEN, B., BERGEMANN, J., SANDMANN, C., SCHRÖER, B., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- GOLD, S., DUNCAN, G., BARRETT, K., und KRONSTAD, J.** (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes-Dev* **8**, 2805-2816.
- GOLD, S. E., BROGDON, S. M., MAYORGA, M. E., und KRONSTAD, J. W.** (1997a). 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., BROGDON, S. M., MAYORGA, M. E., und KRONSTAD, J. W.** (1997b). The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* **9**, 1585-1594.
- GREENSPAN, P., MAYER, E. P., und FOWLER, E. P.** (1985). Nile Red: a selective fluorescent stain for intercellular lipid droplets. *J Cell Biol* **100**, 965-973.
- GUNASEKARAN, J., BUSHNELL, J. L., und WEBER, D. J.** (1972). Comparative studies on Lipid components of *Ustilago bullata* and *Ustilago maydis* spores. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* **3**, 621-628.
- GURVITZ, A., COE, J. G., und DAWES, I. W.** (1993). Use of reporter genes for the isolation and characterisation of different classes of sporulation mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **24**, 451-454.
- HANAHAH, D.** (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. In DNA cloning, a practical approach, D. Rickwood, and B. D. Hames, eds. (IRL Press), pp. 109-135.
- HAMBERG, M., ZHANG, L. Y., BRODOWSKY, I. D., und OLIW, E. H.** (1994). Sequential oxygenation of linoleic acid in the fungus *Gaeumannomyces graminis*: stereochemistry of dioxygenase and hydroperoxide isomerase reactions. *Arch Biochem Biophys* **309**, 77-80.
- HARTMANN, H. A., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.
- HARTMANN, H. A., KRUGER, J., LOTTSPEICH, F., und KAHMANN, R.** (1999). Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator prf1. *Plant Cell* **11**, 1293-1306.
- HERINGA, J.** (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**, 341-364.
- HERMAN, R. P.** (1998). *Oxylipin production and action in fungi and related organisms in Eicosanoids and related compounds in plants and animals* (London, Portland Press).
- HERSKOWITZ, I.** (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 536-553.
- HOBOHM, U., und SANDER, C.** (1995). A sequence property approach to searching protein databases. *J Mol Biol* **251**, 390-399.
- HOLLIDAY, R.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**, 204-230.

- HORNSTEN, L., SU, C., OSBOURN, A. E., GAROSI, P., HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., und OLIW, E. H.** (1999). Cloning of linoleate diol synthase reveals homology with prostaglandin H synthases. *J Biol Chem* **274**, 28219-28224.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., und WHITE, T. J., eds.** (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* (San Diego, USA, Academic Press).
- JONES, P. L., VEENSTRA, G. J., WADE, P. A., VERMAAK, D., KASS, S. U., LANDSBERGER, N., STROUBOULIS, J., und WOLFFE, A. P.** (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**, 187-191.
- KADOSH, D., und STRUHL, K.** (1998). Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol Cell Biol* **18**, 5121-5127.
- KAHMANN, R., STEINBERG, G., BASSE, C., und KÄMPER, J., eds.** (2000). *Ustilago maydis, the causative agent of corn smut disease* (Dodrecht, Kluwer Academic Publishers).
- KÄMPER, J., REICHMANN, M., ROMEIS, T., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- KASS, S. U., PRUSS, D., und WOLFFE, A. P.** (1997). How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* **13**, 444-449.
- KEDVES, M., und A., T.** (1993). High temperature effect on the spores of *Ustilago maydis* (De Candolle) Corde. *Plant Cell Biol Develop (Szeged)* **5**, 34-48.
- KNOEPFLER, P. S., und EISENMAN, R. N.** (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* **99**, 447-450.
- KOLATTUKUDY, P. E., ETTINGER, W. F., und SEBASTIAN, J.** (1987). *The metabolism, structure and Function of Plant Lipids* (New York, Plenum).
- KOLATTUKUDY, P. E., ROGERS, L. M., LI, D., HWANG, C. S., und FLAISHMAN, M. A.** (1995). Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4080-4087.
- KOSAKA, T., MIYATA, A., IHARA, H., HARA, S., SUGIMOTO, T., TAKEDA, O., TAKAHASHI, E., und TANABE, T.** (1994). Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin- endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* **221**, 889-897.
- KRISAK, L., STRICH, R., WINTERS, R. S., HALL, J. P., MALLORY, M. J., KREITZER, D., TUAN, R. S., und WINTER, E.** (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **8**, 2151-2161.
- KRONSTAD, J. W.** (1997). Virulence and cAMP in smuts, blasts and blights. *Trends Plant Sci* **2**, 194-199.
- KRONSTAD, J. W., und LEONG, S. A.** (1989). Isolation of two alleles of the b locus of *Ustilago maydis*. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* **86**, 978-982.
- KUHN, H., und THIELE, B. J.** (1999). The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* **449**, 7-11.
- KUPIEC, M., BYERS, B., EPOSITO, R. E., und MITCHELL, A. P.** (1997). Meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: Cell cycle and cell biology*, J. R. Pringle, B. J. R., and J. E. W., eds. (Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press), pp. 889-1036.
- KUSCH, G., und SCHAUTZ, K.** (1989). Light and electron microscopic studies of clamydospore development in *Ustilago maydis*. *Crypt Bot* **1**, 230-235.
- LAEMMLI, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAHERTY, C. D., BILLIN, A. N., LAVINSKY, R. M., YOCHUM, G. S., BUSH, A. C., SUN, J. M., MULLEN, T. M., DAVIE, J. R., ROSE, D. W., GLASS, C. K., et al.** (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR- mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell* **2**, 33-42.
- LAHERTY, C. D., YANG, W. M., SUN, J. M., DAVIE, J. R., SETO, E., und EISENMAN, R. N.** (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* **89**, 349-356.
- LAW, D. T., und SEGALL, J.** (1988). The SPS100 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is activated late in the sporulation process and contributes to spore wall maturation. *Mol Cell Biol* **8**, 912-922.
- LEMIEUX, R. U.** (1953). *Can J Chem* **31**, 396-417.
- MARCK, C.** (1988). 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res* **16**, 1829-1836.

- MAYORGA, M. E., und GOLD, S. E. (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol* **34**, 485-497.
- MAYORGA, M. E., und GOLD, S. E. (2001). The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol Microbiol* **41**, 1365-1379.
- MAZUR, P., MEYERS, H. V., und NAKANISHI, K. (1990). *Tetrahedron Lett* **31**, 3837-3840.
- MERIKA, M., und THANOS, D. (2001). Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 205-208.
- MILLIS, L. J., und KOTZE, J. M. (1981). Scanning electron microscopy of the germination, growth and infection of *Ustilago maydis* on maize. *Phytoph* **102**, 21-27.
- MIRABITO, P. M., ADAMS, T. H., und TIMBERLAKE, W. E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**, 859-868.
- MITCHELL, A. P. (1994). Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **58**, 56-70.
- MÜLLER, P., AICHINGER, C., FELDBRÜGGE, M., und KAHMANN, R. (1999). The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-1017.
- NAKAI, K., und HORTON, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- NAKAI, K., und KANEHISA, M. (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., und VON HEIJNE, G. (1997a). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., und VON HEIJNE, G. (1997b). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**, 581-599.
- OLIW, E. H., HORNSTEN, L., und SPRECHER, H. (1997). Oxygenation of 5,8,11-eicosatrienoic acid by prostaglandin H synthase-2 of ovine placental cotyledons: isolation of 13-hydroxy-5,8,11- eicosatrienoic and 11-hydroxy-5,8,12-eicosatrienoic acids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **690**, 332-337.
- OLIW, E. H., HORNSTEN, L., SPRECHER, H., und HAMBERG, M. (1993). Oxygenation of 5,8,11-eicosatrienoic acid by prostaglandin endoperoxide synthase and by cytochrome P450 monooxygenase: structure and mechanism of formation of major metabolites. *Arch Biochem Biophys* **305**, 288-297.
- O'DONELL, K. L., und MCLAUGHLIN, D. J. (1984). Postmeiotic mitosis, basidiospore development, and septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia* **76**, 486-502.
- PICOT, D., LOLL, P. J., und GARAVITO, R. M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **367**, 243-249.
- PODILA, G. K., DICKMAN, M. B., ROGERS, L. M., und KOLATTUKUDY, P. E. (1989). *Proceedings of the EMBO-Alko Workshop on molecular biology in filamentous fungi*, Vol 6)
- QUADBECK-SEEGER, C., WANNER, G., HUBER, S., KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (2000). A protein with similarity to the human retinoblastoma binding protein 2 acts specifically as a repressor for genes regulated by the *b* mating type locus in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **38**, 154-166.
- RAMBERG, J. E., und MCLAUGHLIN, D. J. (1980). Ultrastructural study of promycelial development and basidiospore initiation in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **58**, 1548-1561.
- REGENFELDER, E., SPELLIG, T., HARTMANN, A., LAUENSTEIN, S., BOLKER, M., und KAHMANN, R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *Embo J*. **16**, 1934-1942.
- ROMEIS, T., BRACHMANN, A., KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (2000). Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- RUBIN-BEJERANO, I., MANDEL, S., ROBZYK, K., und KASSIR, Y. (1996). Induction of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on conversion of the transcriptional repressor Ume6 to a positive regulator by its regulated association with the transcriptional activator Ime1. *Mol Cell Biol* **16**, 2518-2526.
- RUIZ-HERRERA, J., LEON-RAMIREZ, C., CABRERA-PONCE, J. L., MARTINEZ-ESPINOZA, A. D., und HERRERA-ESTRELLA, L. (1999). Completion of the sexual cycle and demonstration of genetic recombination in *Ustilago maydis* in vitro. *Mol Gen Genet* **262**, 468-472.
- RUNDLETT, S. E., CARMEN, A. A., KOBAYASHI, R., BAVYKIN, S., TURNER, B. M., und GRUNSTEIN, M. (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* **93**, 14503-14508.

- RUNDLETT, S. E., CARMEN, A. A., SUKA, N., TURNER, B. M., und GRUNSTEIN, M. (1998). Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* **392**, 831-835.
- SANGER, F., NICKLEN, S., und COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., und MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- SCHADECK, R. J., LEITE, B., und DE FREITAS BUCHI, D. (1998). Lipid mobilization and acid phosphatase activity in lytic compartments during conidium dormancy and appressorium formation of *Colletotrichum graminicola*. *Cell Struct Funct* **23**, 333-340.
- SCHAUWECKER, F., WANNER, G., und KAHMANN, R. (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**, 617-625.
- SCHMITT, M. E., BROWN, T. A., und TRUMPOWER, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**, 3091-3092.
- SCHULTZ, J., COPLEY, R. R., DOERKS, T., PONTING, C. P., und BORK, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 231-234.
- SCHULTZ, J., MILPETZ, F., BORK, P., und PONTING, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.
- SCHULZ, B., BANUETT, F., DAHL, M., SCHLESINGER, R., SCHÄFER, W., MARTIN, T., HERSKOWITZ, I., und KAHMANN, R. (1990). The *b* alleles of *Ustilago maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- SMITH, W. L., und DEWITT, D. L. (1995). Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Nephrol* **15**, 179-194.
- SMITH, W. L., GARAVITO, R. M., und DEWITT, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**, 33157-33160.
- SMITH, W. L., und MARNETT, L. J. (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* **1083**, 1-17.
- SNETSELAAR, K. M., BÖLKER, M., und KAHMANN, R. (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 299-312.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W. (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W. (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W. (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**, 347-355.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- SPELLIG, T., BÖLKER, M., LOTTSPEICH, F., FRANK, R. W., und KAHMANN, R. (1994a). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- SPELLIG, T., BOTTIN, A., und KAHMANN, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- SPELLIG, T., REGENFELDER, E., REICHMANN, M., SCHAUWECKER, F., BOHLMANN, R., URBAN, M., BÖLKER, M., KÄMPER, J., und KAHMANN, R. (1994b). Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 191-197.
- STAHL, U., BANAS, A., und STYMNE, S. (1995). *Plant Physiol* **107**, 953-962.
- STRUHL, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**, 1-4.
- STRUHL, K. (2001). Gene regulation. A paradigm for precision. *Science* **293**, 1054-1055.
- SU, C., und OLIW, E. H. (1996). Purification and characterization of linoleate 8-dioxygenase from the fungus *Gaeumannomyces graminis* as a novel hemoprotein. *J Biol Chem* **271**, 14112-14118.
- SU, C., SAHLIN, M., und OLIW, E. H. (1998). A protein radical and ferryl intermediates are generated by linoleate diol synthase, a ferric hemoprotein with dioxygenase and hydroperoxide isomerase activities. *J Biol Chem* **273**, 20744-20751.

- TANAKA, K., DAVEY, J., IMAI, Y., and YAMAMOTO, M.** (1993). *Schizosaccharomyces pombe* map3+ encodes the putative M-factor receptor. *Mol Cell Biol* **13**, 80-88.
- THINES, E., WEBER, R. W., and TALBOT, N. J.** (2000). MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **12**, 1703-1718.
- TIMBERLAKE, W. E.** (1986). Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. In *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, J. Bailey, ed. (Berlin, Heidelberg, Springer Verlag), pp. 343-357.
- TIRONE, E. J., and CHING, T. M.** (1971). Fatty acids in Teliospores and mycelium of the dwarf bunt fungus, *Tilletia controversa*. *Phytochemistry* **10**, 227-228.
- TIRONE, E. J., HESS, W. M., and STOCKWELL, V. O.** (1989). Growth and sporulation of dicaryons of the dwarf bunt fungus in wheat plants and in culture. *can J Bot* **67**, 1671-1680.
- TIRONE, E. J., and ROSS, W. D.** (1988). Lipids as bioregulators of teliospore germination and sporidial formation in the wheat bunt fungi, *Tilletia* species. *Mycologia* **80**, pp 38-45.
- TSUKUDA, T., CARLETON, S., FOTHERINGHAM, S., and HOLLOMAN, W. K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- VALVERDE, M. E., PAREDES LOPEZ, O., PATAKY, J. K., and GUEVARA LARA, F.** (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source: biology, composition, and production. *Crit-Rev-Food-Sci-Nutr* **35**, 191-229.
- VERSHON, A. K., and PIERCE, M.** (2000). Transcriptional regulation of meiosis in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 334-339.
- WALTHER, J. M.** (1934). The Mode of entrance of *Ustilago zaeae* into corn. *Phytopathol* **24**, 1012-1220.
- WANG, J., HOLDEN, D. W., and LEONG, S. A.** (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 865-869.
- WEBER, R.W; WEAKLEY, G.E.; PITT, D.** (1999) Histochemical and ultrastructural characterization of vacuoles and spherosomes as components of the lytic system in hyphae of the fungus *Botrytis cinerea*. *Histochem J.* May; **31** (5), 293-301.
- WEETE, J. D., J.L., L., D.J., W., W.M., H., and D.L., S.** (1969). Hydrocarbon, fatty acids and ultrastructure of smut spores. *Phytopathology* **59**, 545-548.
- WEINZIERL, G.** (2001) Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.

Danksagung

Mein erster und innigster Dank gilt meiner Mutter und meinem Vater, der leider nur noch den Anfang meiner Doktorarbeit mit erleben konnte und, glaube ich, heute ganz schön stolz auf mich wäre. Ohne Eure Liebe und Untersützung, die Sicherheit, die Ihr mir immer gegeben habt, Euer Verständnis und Vorbild wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Mehr als nur ein Danke ! Mein zweiter Dank geht an meinen unglaublichen Zwilling Anne(ette Tamara Gabriele Franziska), die mir immer wieder die schillerndsten Facetten des Lebens vor Augen führt und ich komme wieder mal zu dem Schluss, dass es klasse ist, nicht alleine „im Bauch“ gewesen zu sein und schon seit ein paar Dekaden im Doppelback die Welt beglücken zu können. Und nicht zu vergessen, Tante Fanny, die „urbayrische“ Komponente in meinem Leben, die schon jetzt puren Kultstatus erreicht hat (Semmel- und Leberknödel, Auszogne`, Kiachin`, Strudl... und an Salod dazua !). Danke für alles !!! Als nächstes Monika, Alice, Sylvester und Sylvester jr., danke für das Leben „neben“ der Wissenschaft, die besten Familienfeste, Spargel, Schnitzel beim „Wirts-Schorsch“, Kesselgulasch, Paprika und Kolbas, wunderschöne Tage, dass Ihr immer für mich da seit und ein offenes Ohr für alles hattet. Christa danke ich für Ihren Humor, Ihre Stärke und niemals endende Motivation. Und Sebastian, der unvergessen für immer in meinen Gedanken bleiben wird. Trixi, danke für die beste Freundin, die ich jemals hatte (das wird sich auch die nächsten 80 Jahre nicht ändern, pure Seelenverwandtschaft) und die sogar meine kleinen Fehler mag, und mit der ich die größte oberbayrische Marmeladenfabrik eröffnen werde, wenn wir beide mal in Rente sind. Und Alois, der mich (ungefragt, aber günstigerweise schon mit Diplom) „adoptieren“ musste, seit dem auf mich aufpassen muß und mir auf diesem Weg mehr als nur ans Herz gewachsen ist.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Gerhard für ein halbes Jahrzehnt „nebeneinander“ an der Laborbank. Danke für Deine unendliche Hilfsbereitschaft, alle guten Ratschläge in diverser Problembewältigung (wenn das mit der Marmeladenfabrik (siehe oben) nix wird, dann bestimmt die „Lebensberatung Dr.Huber & Dr. Weinzierl“), den urigen bayrischen Humor und die „dachauer Dialektkunde für Altöttinger“, und dafür, dass Du mir ein wahrer Freund geworden bist. Danke für die schöne Zeit ! Andreas (der eigentlich Abram heißt) - wenn ich mir einen „großen Bruder“ hätte aussuchen dürfen, hättest Du mit meilenweitem Vorsprung gewonnen !!!!!!!! (Wenn schon nicht Bruder, may be mal Schwager). Ich konnte so viel von Deiner Art zu Arbeiten lernen, ein riesengroßes und inniges Dankeschön für eine richtig gute Zeit. Gerhard und Abram, eine schönere Zusammenarbeit kann man sich nicht vorstellen, jeder Tag war ein Gewinn. Tina Romeis gilt mehr als nur ein inniger Dank für eine lange Freundschaft, die am ersten Tag meiner „Laborzeit“ begann, echten Forschergeist, viele gute und überlegte Ratschläge, lange Telefonate über den „Channel“ und dafür, dass sie jetzt endlich wieder zu Hause ist und ich weder fliegen noch schwimmen muß, um sie besuchen zu können.

Mein herzlicher Dank gilt Regine Kahmann. Ihre Einstellung dem wissenschaftlichen Arbeiten gegenüber hat mich entscheidend geprägt und ich bin dankbar, dass ich meine Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen durfte. Ganz besonders möchte ich mich für ihre große Unterstützung und konstruktiven Vorschläge während des Zusammenschreibens bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt Jörg Kämper für die Betreuung der Arbeit, aber auch für die freundschaftliche und familiäre Atmosphäre, seinen eigentlich unvergleichlichen Humor und die schöne Zeit, die ich in seiner Arbeitsgruppe verbringen durfte.

In diesem Zusammenhang geht mein Dank auch an Renate Renkawitz-Pohl, Michael Bölker und Alfred Batschauer für die freundliche Übernahme der Gutachten und an alle weiteren Mitglieder der Promotionskommission für ihre Mühen. FriedrichLottspeich hat meine Arbeit mit der Sequenzierung des Ssp1-Proteins sehr unterstützt.

Ebenfalls ein herzlicher Dank an Olli für eine richtig schöne Zeit im Labor und die riesige Hilfe beim bösen Formatieren; Mario danke danke danke für`s Korrekturlesen (ich weiss, „besitzen“ und nicht „besitzen“), ebenso Michael, Alex und Katja (gut, dass es mit Dir noch eine Biologin gibt, die sich die Wimpern tuscht !). Klasse, dass es Menschen wie euch gibt ! Philip (der eigentlich auch ein Bayer werden wollte), danke für die schöne Zeit und den Beweis dafür, dass auch Männer kochen können (und wie !!!).

Ebenfalls ein herzlicher Dank an Georgi für seinen unglaublichen Humor und gute Gespräche (und dass mich meine Mama jetzt immer sofort anruft, wenn sie im Fernsehen etwas über Georgien gesehen hat). Danke an Volker für eine klasse Laboratmosphäre, Angelika für das ewige Sonnenscheinlächeln, sowie Isabell und Lubi für die gemütlichen Sommer-Kochabende, Julia für ihre unvergleichliche Art, ihren Humor und ihr riesengroßes Herz, und natürlich alle anderen Kahmänner und -frauen in München und Marburg, sowie Ria für ihre Hilfe in der Spülküche und bei den täglichen Kleinigkeiten.

Und ein dickes Danke an Bernd und Anne für das Anfangszitat in letzter Minute (das war genau 21⁴⁵ Uhr am 17.11.01).

Lebenslauf

- PERSONALIEN** Sieglinde Maria Franziska Elisabeth Huber
Geboren am 2. März 1971 in Altötting, Bayern
- SCHULBILDUNG** 1977-1981 Grundschule Altötting Süd
1981-1990 Gymnasium der Englischen Fräulein Altötting,
Abschluss: Abitur, Gesamtnote 2,1
- STUDIUM** 1990-1993 Grundstudium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Abschluss: Vordiplom, Gesamtnote 2,4
1993-1996 Hauptstudium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Anthropologie und Humangeneik, Immunologie, Biochemie.
Abschluss: Diplom in Biologie mit der Gesamtnote 1,3
1/96-10/96 Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zum Thema "Etablierung eines Testsystems zur Erzeugung von b-Proteinen mit veränderten Dimerisierungseigenschaften und neuer Spezifität"
Betreuer: PD Dr. J. Kämper, Prof. Dr. R. Kahmann
- PROMOTION** 1997-2001 Doktorarbeit zum Thema "Isolierung und Charakterisierung des sporenspezifisch exprimierten Gens *ssp1* in *Ustilago maydis*" (1997-2000 am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg)
Betreuer: PD Dr. J. Kämper, Prof. Dr. R. Kahmann

WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN

Quadbeck-Seeger, C.; Wanner, G.; Huber, S., Kahmann, R.; und Kämper J. (2000) A protein with similarities to the human retinoblastoma binding protein 2 acts specifically as a repressor for genes regulated by the *b* mating type locus in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.*, **38**, 154-166.