

Philipps



Universität  
Marburg

Das Cellobioselipid Ustilaginsäure aus  
*Ustilago maydis*:  
Biosynthese und transkriptionelle  
Regulation

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

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Beate Teichmann

aus Gießen

Marburg/Lahn, Februar 2009



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Bölker von Oktober 2005 bis Februar 2009 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

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

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M.A., and Bölker, M. (2007) A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **66**: 525-533.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Das Cellobioselipid Ustilaginsäure aus *Ustilago maydis*: Biosynthese und transkriptionelle Regulation“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

Beate Teichmann

# Zusammenfassung der Arbeit

Der Brandpilz *Ustilago maydis* produziert unter Stickstoffmangelbedingungen zwei Arten von extrazellulären Glycolipiden, Ustilaginsäure und Mannosylerythritollipide. In dieser Arbeit konnte der Biosyntheseweg für die Ustilaginsäure aufgeklärt werden. Sämtliche Gene, die an der Biosynthese dieses Cellobioselipids beteiligt sind, liegen in einem Gencluster angeordnet, das von einem eigenen Transkriptionsfaktor reguliert wird. An der Biosynthese der Ustilaginsäure sind zwei Cytochrom P450 Monooxygenasen, eine Fettsäuresynthase, eine Glycosyltransferase, eine Acyl- und eine Acetyltransferase sowie zwei Hydrogenasen beteiligt. Durch Deletionsanalysen der einzelnen Gene, sowie massenspektrometrische Analyse der Substanzen, die von den Deletionsstämmen synthetisiert wurden, konnten die Enzyme charakterisiert und ihre Funktion den einzelnen Schritten während der Biosynthese zugeordnet werden.

Des Weiteren wurde der Transkriptionsfaktor Rua1 näher untersucht. Er gehört zur Familie der Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfingerproteine und ist für die Regulation des Ustilaginsäuregenclusters verantwortlich. Über die C-terminal gelegene Zinkfingerdomäne bindet Rua1 an ein konserviertes DNA-Motiv innerhalb der Promotorregion der einzelnen Clustergene und aktiviert dadurch deren Transkription.

Die Ustilaginsäure weist antibiotische Wirksamkeit gegenüber pro- und eukaryotischen Mikroorganismen auf. So konnte in dieser Arbeit durch Inkubation von *S. cerevisiae* Zellen mit Ustilaginsäurederivaten, die von den verschiedenen Mutantenstämmen produziert wurden, bestimmt werden, welche Gruppen des Moleküls essentiell für die antibiotische Wirkung sind.

Darüberhinaus weist *U. maydis* Biocontrolaktivität gegenüber dem pflanzenpathogenen Pilz *Botrytis cinerea* auf. *B. cinerea* verursacht Grauschimmelfäule z.B. auf Tomatenpflanzen. Eine Inkubation von *U. maydis* Zellen mit *B. cinerea* Sporen auf Tomatenblättern konnte eine Infektion durch *B. cinerea* verhindern. Verantwortlich für diese antagonistische Wirksamkeit ist die Ustilaginsäure, denn Deletionsstämme, die keine Ustilaginsäure produzieren können, sind nicht in der Lage, eine Infektion durch *B. cinerea* zu verhindern. *U. maydis* eignet sich damit für den Einsatz in der Natur, da er auf natürliche Weise Pflanzenschädlinge eliminieren kann.

# Abkürzungen und Fachbegriffe

Amp	Ampicillin	MS <sup>n</sup>	Tandem-
ATP	Adenosin-Triphosphat		Massenspektrometrie
bp	Basenpaar(e)	N-terminal	Amino-terminal
°C	Grad Celsius	OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
Ci	Curie	ORF	"open reading frame"
C-terminal	Carboxy-terminal	PCR	Polymerasekettenreaktion
Cbx	Carboxin	PD	"potato dextrose"
DC	Dünnschicht-	PEG	Polyethylenglycol
	chromatographie	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-
DNA	Desoxyribonukleinsäure		Ethansulfonat)
dNTP	Desoxyribonukleosid-	pH	negativer dekadischer
	Triphosphat		Logarithmus der
dpm	decays per minute		Wasserstoffionen-
EDTA	Ethylendiamin-		konzentration
	tetraessigsäure	PMSF	Phenylmethylsulfonyl
Fa	Firma		Fluorid
FAS	Fettsäuresynthase	PPI	Peptidyl-prolyl cis/trans
FTMS	Fouriertransformations-		Isomerase
	Massenspektrometrie	RNA	Ribonukleinsäure
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	rpm	Umdrehungen pro Minute
Hyg	Hygromycin	RT	Raumtemperatur
kb	Kilobasenpaar	SDS	Natriumdodecylsulfat
kDA	Kilo Dalton	Tris	Trishydroxymethylamino
Maldi-	Matrix assisted Laser		methan
TOF	desorption/Ionisation-Time	U	Unit
	of Flight Mass-spectrometry		(Enzymaktivitätseinheit)
MEL	Mannosylerythritollipid	UA	Ustilaginsäure
MOPS	3-(N- Morpholino)	üN	über Nacht
	propansulfonat	UV	ultraviolettes Licht
MS	Massenspektrometrie	wt	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Glycolipide als Sekundärmetabolite.....	1
1.2 Gencluster .....	2
1.3 <i>Ustilago maydis</i> .....	4
1.4 Sekundärmetabolite in <i>U. maydis</i> .....	5
1.5 Biosynthese der Mannosylerythritollipide .....	8
1.6 Ziel der Arbeit .....	9
2. Ergebnisse.....	11
2.1 Identifizierung eines Genclusters, der für die Synthese der Ustilaginsäure zuständig ist. ....	11
2.1.1 Analyse der Gene des UA Genclusters.....	11
2.1.2 Die Cytochrom P450 Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 sind für die Hydroxylierung der langen Fettsäurekette verantwortlich .....	13
2.1.3 Die Glycosyltransferase Ugt1 überträgt die Zuckereinheit auf die Fettsäurekette .....	18
2.1.4 Die Fettsäuresynthase Fas2 wird für die Synthese der mittellangen Hydroxyfettsäuren benötigt, die auf die Ustilaginsäure übertragen werden .....	20
2.1.5 Die Acyltransferasen Uat1 und Uat2 sind für die Acetylierung, bzw. Acylierung der Cellobioseeinheit verantwortlich.....	23
2.1.6 Die Hydroxylasen Ahd1 und Uhd1 hydroxylieren die Ustilaginsäure an zwei unterschiedlichen Positionen.....	25
2.1.7 Der ABC-Transporter Atr1 ist vermutlich am Export der UA beteiligt ..	28
2.1.8 Weitere Gene des UA Genclusters.....	28
2.2 Regulation des Ustilaginsäureclusters .....	29
2.2.1 Die C-terminale Zinkfingerregion von Rua1 ist ausreichend für die DNA Bindung .....	31
2.2.2 Identifizierung der regulatorischen Region, die von Rua1 erkannt wird	33
2.2.3 Charakterisierung des Rua1 Bindemotivs.....	35
2.3 Die antibiotische Wirkung der Ustilaginsäure .....	37
2.3.1 Toxische Wirkung der veränderten Ustilaginsäuren auf <i>S. cerevisiae</i> .....	37
2.3.2 <i>U. maydis</i> als Biocontrol Organismus.....	39
3. Diskussion.....	41
3.1 Charakterisierung eines Genclusters für das Glycolipid Ustilaginsäure .....	41
3.1.1 Cyp1 und Cyp2 hydroxylieren die langkettige Fettsäure.....	42
3.1.2 Die Glycosyltransferase Ugt1 überträgt die Zuckereinheit auf die Fettsäurekette .....	44
3.1.3 Die Fettsäuresynthase Fas2 wird für die Synthese der kurzkettigen Fettsäureseitenketten benötigt. ....	46
3.1.4 Die beiden Acyltransferasen Uat1 und Uat2 sind für die Acetylierung, bzw. Acylierung der Cellobioseeinheit verantwortlich.....	47
3.1.5 Die Hydroxylasen Ahd1 und Uhd1 hydroxylieren die Ustilaginsäure an zwei unterschiedlichen Positionen.....	50
3.1.6 Biosyntheseweg für die Ustilaginsäure .....	53



3.2	Regulation des Genclusters .....	55
3.2.1	DNA Bindung durch Rua1 .....	55
3.2.2	Charakterisierung des Rua1 Bindemotivs .....	56
3.2.3	Regulation von Rua1 .....	58
3.3	Die antibiotische Wirkung der Ustilaginsäure .....	60
3.4	Ausblick .....	63
4.	Material und Methoden .....	64
4.1	Material .....	64
4.1.1.	Chemikalien .....	64
4.1.2.	Puffer und Lösungen .....	66
4.1.3.	Medien .....	70
4.1.4.	Kits .....	72
4.1.5.	Enzyme .....	73
4.1.6.	Sonstiges .....	73
4.1.7.	Größenstandards .....	74
4.1.8.	Stämme .....	74
4.1.9.	Oligonukleotide .....	85
4.2.	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden .....	87
4.2.1.	<i>E. coli</i> .....	87
4.2.2.	<i>U. maydis</i> .....	89
4.2.3.	<i>S. cerevisiae</i> .....	91
4.3.	Molekularbiologische Standardmethoden .....	92
4.3.1.	Isolierung von Nukleinsäuren .....	92
4.3.2.	Analyse, Modifikation und Klonierung von Nukleinsäuren .....	95
4.3.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	99
4.4.	Biochemische Methoden .....	100
4.4.1.	Reinigung und Nachweis von Glycolipiden .....	100
4.4.2.	Promotorbindestudien .....	101
4.5.	Massenspektrometrische Untersuchungen .....	101
5.	Literaturverzeichnis .....	103

# 1. Einleitung

## 1.1 Glycolipide als Sekundärmetabolite

Viele Mikroorganismen produzieren eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten. Im Gegensatz zum Primärstoffwechsel sind Produkte, die im Sekundärmetabolismus produziert werden, nicht essentiell für den Organismus. Sie werden oft am Ende der Wachstumsphase oder während der stationären Phase gebildet. Beispiele für Sekundärmetabolite sind Antibiotika wie Penicillin (produziert von *Aspergillus nidulans* und *Penicillium chrysogenum*) oder Cephalosporin (produziert von *Cephalosporium acremonium*), Siderophore und Toxine wie z.B. Aflatoxin und Sterigmatocystin (produziert von *A. flavus* und *A. parasiticus*) sowie die Gruppe der Biodetergenzien.

Biodetergenzien sind amphipathische Moleküle, das heißt, sie besitzen sowohl hydrophile, als auch hydrophobe Anteile. Diese Eigenschaft verleiht ihnen die Möglichkeit, sich zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen z.B. Wasser/Öl einzulagern und damit zur Bildung von Mikroemulsionen beizutragen. Des Weiteren sind sie in der Lage, die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten herabzusetzen (Desai and Banat, 1997). Biodetergenzien werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen gebildet und dienen zum Anheften an hydrophobe Oberflächen, zur Freisetzung von Nährstoffen und manchmal auch aufgrund ihrer Toxizität zum Ausschalten von Konkurrenten bei Nährstoffmangel (Ron and Rosenberg, 2001). Biodetergenzien lassen sich in zwei große Gruppen einteilen, in solche mit niedrigem und mit hohem Molekulargewicht (Ron and Rosenberg, 2001; Rosenberg and Ron, 1999). Zur Gruppe der Biodetergenzien mit niedrigem Molekulargewicht gehören Glycolipide und Lipopeptide. Glycolipide bestehen aus einem Zucker, der mit einer oder mehreren Fettsäure- oder Hydroxyfettsäureketten verbunden ist. Zu den wichtigsten oberflächenaktiven Glycolipiden gehören Trehaloselipide, Rhamnolipide, Sophorolipide und Cellobioselipide.

Die Gruppe der Biodetergenzien mit hohem Molekulargewicht umfasst Detergenzien bei denen der hydrophile Anteil aus einem polymeren Molekül besteht, wie z.B. bei Polysacchariden, Lipopolysacchariden und Lipoproteinen (Desai and Banat, 1997).

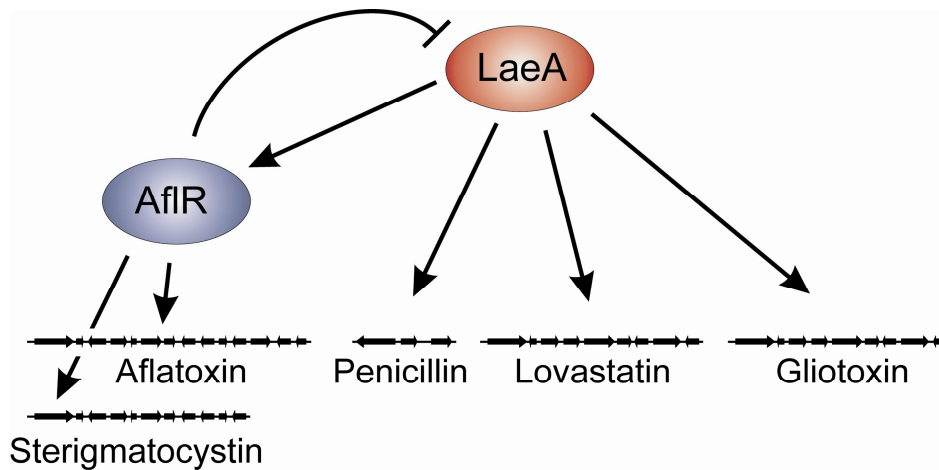
Das Biodetergenz mit der höchsten bisher bekannten Oberflächenaktivität, ist das zyklische Lipopeptid Surfactin, das von *Bacillus subtilis* produziert wird. Es hat antibiotische und zytotoxische Wirksamkeit (Peypoux et al., 1999).

## 1.2 Gencluster

Im Gegensatz zu prokaryotischen Biosynthesegenen, die in der Regel als Operons angeordnet sind, finden sich in filamentösen Pilzen die Gene, die für den Syntheseweg eines Metaboliten kodieren, normalerweise verteilt im Genom. Dies trifft interessanterweise nicht für Biosynthesegene von Sekundärmetaboliten zu, diese Gene sind häufig in sogenannten Genclustern zusammengefasst (Keller and Hohn, 1997; Walton, 2000). Besonders gut sind die Gencluster für die Biosynthese von Aflatoxin (AF) und Sterigmatocystin (ST) in *Aspergillus* untersucht. Aflatoxin und Sterigmatocystin gehören zu den stärksten, krebserregenden Mycotoxinen (Fujii et al., 1976; Wogan, 1992). Man unterscheidet mindestens 20 natürlich vorkommende Aflatoxine, von denen Aflatoxin B<sub>1</sub> das für den Menschen am gefährlichste ist. Aflatoxine werden nur von *A. parasiticus*, *A. flavus* und *A. nomius* produziert, während die Vorstufe Sterigmatocystin unter anderem auch von *A. nidulans* synthetisiert wird (Yabe and Nakajima, 2004). Insgesamt 18 Reaktionsschritte laufen ab, um aus Acetyl-CoA das Endprodukt Aflatoxin herzustellen. An der Synthese sind 25 koregulierte Gene beteiligt, die in einem Gencluster mit einer Länge von etwa 60 kbp angeordnet sind (Brown et al., 1996b; Yu et al., 1995). Für das erste stabile Zwischenprodukt wird sowohl eine Polyketidsynthase (PKS) als auch eine Fettsäuresynthase (FAS) benötigt (Brown et al., 1996a; Watanabe et al., 1996). Die FAS, die durch zwei Gene (*fas1* und *fas2*) kodiert wird, produziert eine C<sub>6</sub>-Fettsäurekette, die als Startereinheit für die PKS dient. Des weiteren enthält das Gencluster fünf Monooxygenasen, verschiedene Reduktasen und Dehydrogenasen, eine Methyltransferase sowie eine Esterase, die für die verschiedenen Reaktionen während der Biosynthese benötigt werden (Brown et al., 1996b; Keller and Hohn, 1997). Neben den Biosynthesegenen enthält das Gencluster außerdem einen eigenen Transkriptionsfaktor AfIR, der für die Regulation der Clustergene verantwortlich ist. AfIR enthält einen C<sub>6</sub>-Zinkfinger, der für die DNA Bindung zuständig ist (Ehrlich et al., 1998). Durch die Bindung an ein konserviertes DNA-Motiv in den Promotorregionen

der Clustergene, reguliert AfIR die Expression sämtlicher Aflatoxin- bzw. Sterigmatocystin-Biosynthesegene (Woloshuk *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1996).

Neben diesem Gencluster enthalten *Aspergillus*stämme noch eine Reihe weiterer Sekundärmetabolitgencluster. Dazu gehören die Gencluster für die



**Abbildung 1: Modell zur globalen Regulation der Sekundärmetabolitcluster durch LaeA.** Die Abbildung wurde verändert übernommen von (Bok and Keller, 2004).

Synthese von Penicillin, Lovastatin und Gliotoxin. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass alle Cluster, inklusive des AF/ST Genclusters, durch einen gemeinsamen Regulator LaeA reguliert werden. Bei diesem Protein handelt es sich nicht um einen typischen Transkriptionsfaktor, sondern um eine Methyltransferase, die durch Modifikation des Chromatins in der Lage ist, sämtliche Sekundärmetabolitgencluster zu regulieren (Abbildung 1) (Bok and Keller, 2004; Bok *et al.*, 2006b).

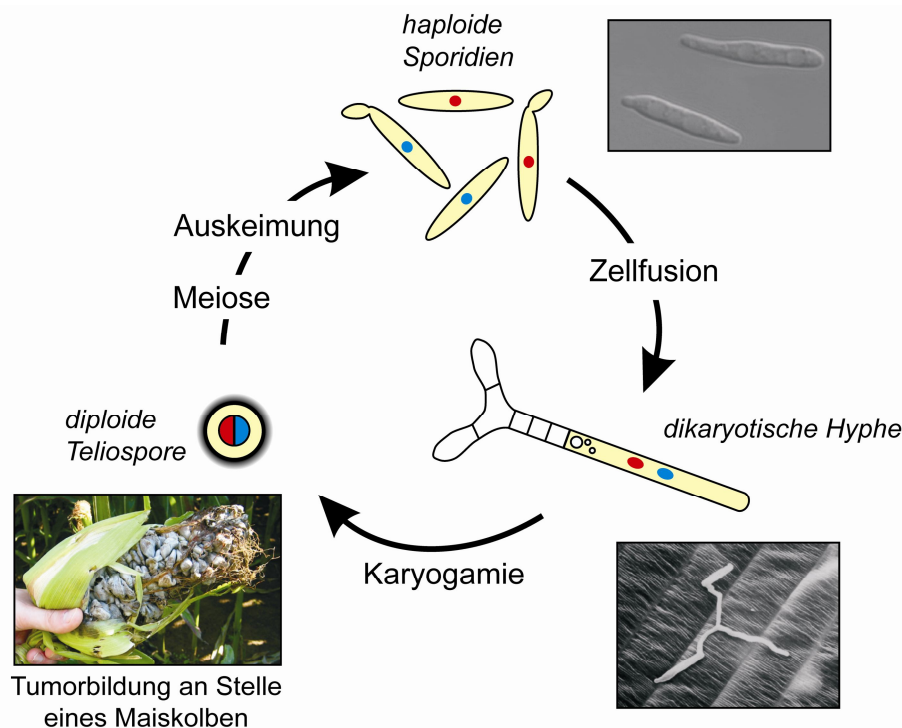
Auch in anderen Pilzen sind Sekundärmetabolitgencluster bekannt. So sind die Gene für die Biosynthese von Cephalosporin aus *C. acremonium*, in einem Gencluster angeordnet (Mathison *et al.*, 1993). Dasselbe gilt für die Gene, die für die Synthese des Penicillins in *P. chrysogenum* verantwortlich sind (Diez *et al.*, 1990), sowie die für das Mycotoxin Trichothecen aus *Fusarium graminearum* und *F. sporotrichioides* (Hohn *et al.*, 1993).

Welchen Vorteil das Auftreten von Genen in Form von Clustern hat, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Hypothese besagt, dass die Fähigkeit zur Produktion bestimmter Sekundärmetabolite häufig über horizontalen Gentransfer weitergegeben wird. Dies ist nur möglich, wenn alle Gene gemeinsam übertragen werden. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass manche

pilzlichen Gencluster auf diesem Weg möglicherweise sogar von Prokaryoten erworben wurden (Walton, 2000).

### 1.3 *Ustilago maydis*

Der Brandpilz *Ustilago maydis* hat sich in den letzten Jahren als Modellorganismus für verschiedene Analysen bewährt. Ein Vorteil dieses Modellorganismus ist, dass er sich leicht im Labor kultivieren und effizient genetisch manipulieren lässt. Das Genom von *U. maydis* ist komplett sequenziert und öffentlich zugänglich <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago> (Kämper *et al.*, 2006).



**Abbildung 2: Lebenszyklus von *U. maydis*.** *U. maydis* Sporidien unterschiedlichen Paarungstypes sind in der Lage, miteinander zu kreuzen. Es entsteht ein filamentöses Dikaryon, welches die Pflanze infiziert. Nach Eindringen in die inter- und intrazellulären Kompartimente der Pflanze kommt es zur Proliferation der Hyphenzellen und zur Tumorinduktion. Die Kerne der Hyphen verschmelzen, und infektiöse Teliosporen werden abgeschnürt. Platzt der Tumor auf, werden diese freigesetzt und durch Wind und Regen verstreut. Nach Auskeimen der Teliosporen und anschließender Meiose entstehen haploide Basidiosporen.

*U. maydis* gehört im Reich der Pilze zur Gruppe der Basidiomyceten, einer Gruppe, zu der auch bekannte Speisepilze, wie der Champignon oder der

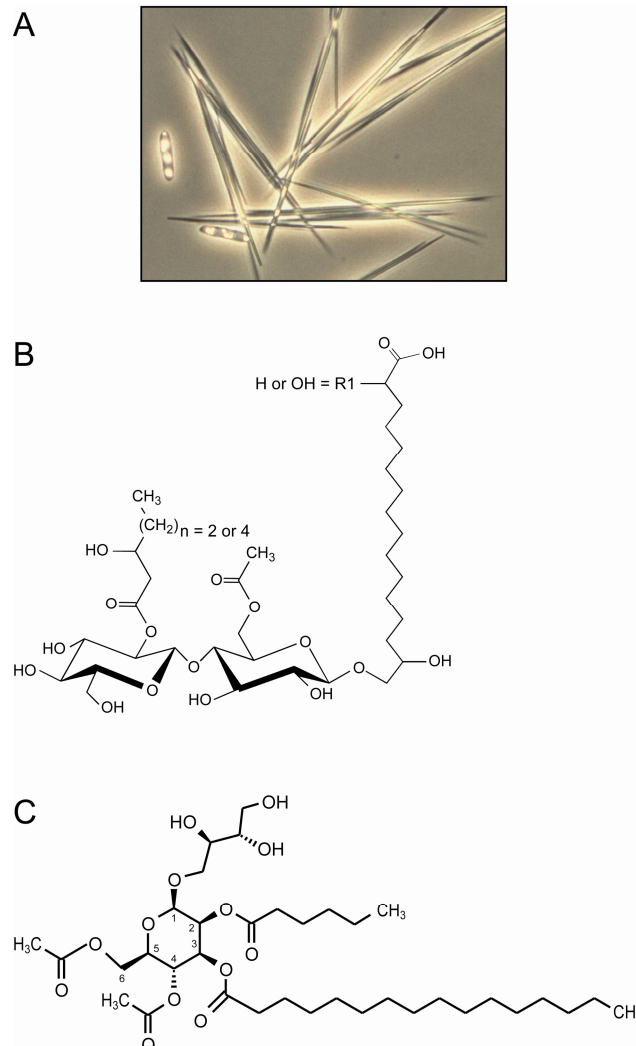
Pfifferling gehören. *U. maydis* ist ein pflanzenpathogener Pilz, der als Wirtspflanze Mais (*Zea mays*) oder dessen verwandte Art Teosinte (*Zea mexicana*) befällt. Typische Symptome einer infizierten Pflanze sind zunächst Chlorose, Anthocyanfärbung und später Tumor- bzw. Gallenbildung an allen oberirdischen Teilen der Pflanze (Abbildung 2), bis hin zum Absterben der Pflanze (Kahmann *et al.*, 2000).

Der Lebenszyklus von *U. maydis* kann in drei Abschnitte unterteilt werden: ein haploides, ein dikaryotisches und ein diploides Stadium (Abbildung 2). Während des haploiden Stadiums lebt der Pilz als Einzelzelle saprophytisch im Boden und vermehrt sich durch Knospung. Treffen zwei kompatible, haploide Zellen auf einer Blattoberfläche aufeinander, können sie sich durch ein Pheromon-Rezeptor-System erkennen. Die Sporidien bilden Konjugationshyphen aus, die aufeinander zuwachsen, miteinander verschmelzen und ein dikaryotisches Filament bilden (Snetselaar *et al.*, 1996). Dieses Filament ist nun in der Lage, die Pflanze zu infizieren und die Bildung von Gallen zu induzieren. Innerhalb des Gallengewebes differenzieren die Pilzhyphen, die Zellkerne verschmelzen miteinander und es entstehen diploide Teliosporen. Bricht das Tumorgewebe auf, werden die Teliosporen freigesetzt und können dann mit Wind und Regen verbreitet werden (Banuett and Herskowitz, 1996). Teliosporen können als Dauerformen mehrere Jahre überleben. Unter geeigneten Bedingungen keimen die Teliosporen wieder aus und bilden durch Meiose vegetativ wachsende, haploide Sporidien (Banuett, 1992, 1995).

### 1.4 Sekundärmetabolite in *U. maydis*

Schon seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass *U. maydis* eine Reihe interessanter Sekundärmetabolite produziert (Haskins, 1950). In dieser Zeit war man intensiv damit beschäftigt, neue antibiotisch wirksame Stoffe zu finden, die dann in der Medizin Anwendung finden sollten. Das  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Cephalosporin aus *Acremonium chrysogenum* wurde beispielsweise in dieser Zeit entdeckt und wird auch heute noch in der Medizin angewendet. Bei dieser intensiven Suche nach antibiotikaproduzierenden Mikroorganismen wurde auch entdeckt, dass *U. maydis* Substanzen synthetisiert, die antibiotische Eigenschaften gegenüber Bakterien aufwiesen.

Allerdings zeigten diese im Tierversuch keine Wirkung, weshalb *U. maydis* als möglicher Antibiotikaproduzent wieder in Vergessenheit geriet (Haskins and Thorn, 1951).



**Abbildung 3: Struktur der von *U. maydis* produzierten Glycolipide.** Glycolipide bilden in wässrigem Medium lange, nadelförmige, optisch aktive, kristallähnliche Strukturen (A). Chemische Struktur der Ustilaginsäure (B) und des Mannosylerythritollipids (C).

Heute weiß man, dass *U. maydis* unter Stickstoffmangelbedingungen zwei Arten von extrazellulären Glycolipiden produziert, Ustilaginsäure (UA) und Mannosylerythritollipid (MEL). Diese Glycolipide fallen bei niedrigem pH-Wert im Medium aus und erscheinen dann als lange, nadelförmige, optisch aktive Kristalle (Abbildung 3A) (Haskins, 1950). Chemisch handelt es sich bei der Ustilaginsäure um ein Gemisch aus Cellobioselipiden, bei der das Disaccharid Cellobiose o-glycosidisch mit der  $\omega$ -Hydroxylgruppe einer lang-

kettigen Hydroxyfettsäure verbunden ist (Abbildung 3B). Bei der Fettsäure handelt es sich entweder um 15,16-Dihydroxyhexadekansäure oder 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure. Außerdem ist die Cellobiose an zwei weiteren Positionen mit einer Acetylgruppe und einer  $\beta$ -Hydroxyfettsäure der Länge C6 oder C8 verestert (Lemieux, 1953). Ustilaginsäure besitzt hohe Oberflächenaktivität und weist antibiotische Wirksamkeit sowohl gegenüber pro- als auch eukaryotischen Mikroorganismen auf (Haskins and Thorn, 1951; Teichmann, 2005). Auch das Mannosylerythritollipid wurde in den 50er Jahren erstmals erwähnt und zwar als ein extrazelluläres Öl, das eine höhere Dichte als Wasser aufweist (Haskins *et al.*, 1955). Es besteht aus einem Disaccharid, das sich aus Mannose und Erythritol zusammensetzt. Die Mannoseeinheit ist mit zwei Fettsäureketten verschiedener Länge, sowie zwei Acetylgruppen verestert (Abbildung 3C) (Fluharty and O'Brien, 1969; Hewald *et al.*, 2005). Für die MELs wird vermutet, dass sie sich als flüssiges, oberflächenaktives Detergenz auf der Blattoberfläche ausbreiten und damit als Trägersubstanz für eine bessere Verbreitung der von *U. maydis* produzierten hydrophoben Pheromone dienen können.

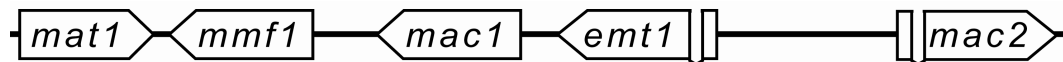
Neben den Glycolipiden produziert *U. maydis* außerdem zwei verschiedene Arten an Siderophoren (Ferrichrom und FerrichromA), die für die Aufnahme und Speicherung von Eisen benötigt werden (Budde and Leong, 1989). Bei Eisenmangel werden die Siderophore in das umgebende Medium ausgeschieden, und dann nach Komplexierung der Eisen-Ionen von den Zellen über spezifische Transportsysteme wieder aufgenommen (Neilands, 1995). Für die Biosynthese der Siderophore sind mehrere Gencluster zuständig, die durch cAMP, Eisen und den eisenabhängigen Transkriptionsfaktor Urbs1 reguliert werden (Eichhorn *et al.*, 2006; Winterberg, 2008).

Des weiteren dient *U. maydis* als Modellorganismus für die Aufklärung der Synthesewege verschiedener Sekundärmetabolite, die von Basidiomyceten aus der Aminosäure Tryptophan gebildet werden bzw. diese als Vorstufe besitzen (Mayser *et al.*, 1998). So konnte gezeigt werden, dass Indolpigmente von *U. maydis* nur dann produziert werden, wenn als Stickstoffquelle Tryptophan im Medium vorliegt (Zuther *et al.*, 2008).



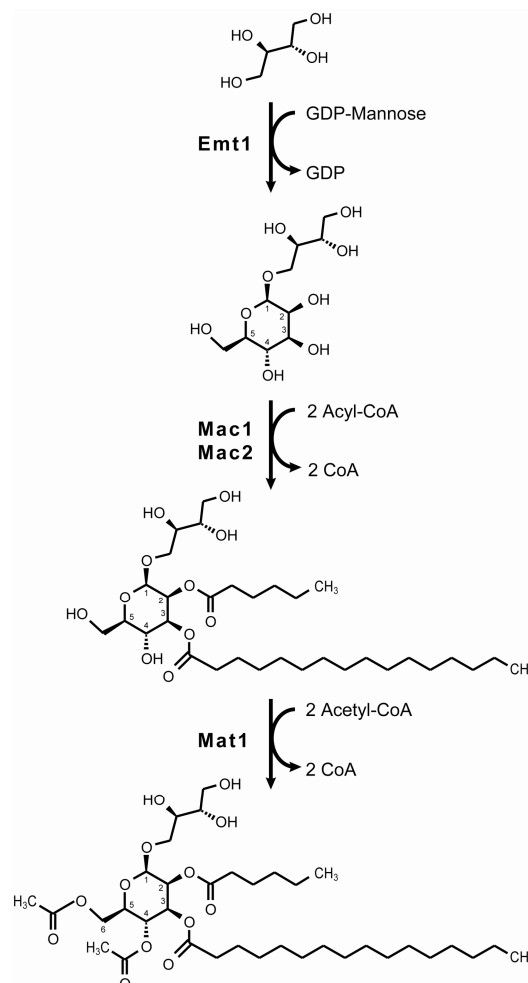
## 1.5 Biosynthese der Mannosylerythritollipide

Das Gencluster, das die Gene für die Biosynthese der Mannosylerythritollipide enthält, wurde in einer früheren Arbeit bereits näher charakterisiert (Hewald *et al.*



**Abbildung 4: MEL Biosynthesecluster.** Fünf Gene werden für die Synthese der MELs benötigt, die Glycosyltransferase (*emt1*), ein Transporter der Major facilitator Familie (*mmf1*), 2 Acyltransferasen (*mac1* und *mac2*) sowie eine Acetyltransferase (*mat1*). Die Abbildung wurde aus (Hewald *et al.*, 2006) übernommen.

*al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gencluster aus fünf Genen besteht, die alle unter Stickstoffmangelbedingungen exprimiert werden und für

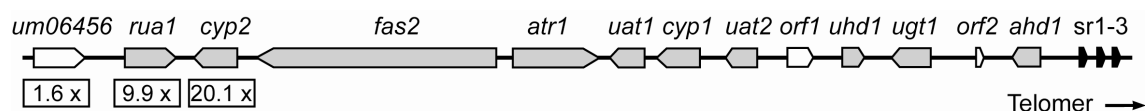


**Abbildung 5: Biosynthese der MELs.** Die einzelnen Biosyntheseschritte sind im Text erklärt. Die Abbildung wurde aus (Hewald *et al.*, 2006) übernommen.

die Produktion der MELs zuständig sind. Das Gencluster besteht aus der Glycosyltransferase Emt1, zwei Acyltransferasen (Mac1 und Mac2), einer Acetyltransferase (Mat1) sowie einem Transporter der Major Facilitator Familie (Mmf1) (Abbildung 4). Durch Deletionsanalysen der einzelnen Gene konnte der Biosyntheseweg für die MELs abgeleitet werden. Im ersten Schritt der Biosynthese kommt es zu einer Übertragung eines Mannoserestes von GDP-Mannose auf Erythritol. Diese Reaktion wird von der Glycosyltransferase Emt1 katalysiert und führt zur Bildung von Mannosylerythritol. Im nächsten Schritt werden durch Mac1 und Mac2 Fettsäureketten verschiedener Längen auf die C2 bzw. C3 Position des Mannosylerythritols übertragen. Im letzten Schritt wird die Mannose an Position C4 und C6 teilweise durch Mat1 acetyliert (Abbildung 5) (Hewald *et al.*, 2006).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Während meiner Diplomarbeit konnte ich ein Gencluster aus *U. maydis* Initial charakterisieren, das vermutlich alle Gene für die Biosynthese der Ustilaginsäure enthält (Teichmann *et al.*, 2007). Bei der Analyse verschiedener Cytochrom P450 Monooxygenasen wurde das Gen *cyp1* identifiziert, das



**Abbildung 6: Genetische Organisation des UA Biosyntheseclusters.** Das UA Gencluster enthält 12 Gene, die alle unter Stickstoffmangelbedingungen exprimiert werden. Die Induktion von *rua1* und *cyp2* unter diesen Bedingungen wurde mit Hilfe einer Micorarray-Analyse bestimmt. *Rua1* stellt die linke Grenze des Clusters dar, das angrenzende Gen *um06456* ist unter Stickstoffmangelbedingungen nicht exprimiert (1.6x). *Sr1-3* steht für subtelomerische Wiederholungssequenzen. Die Namen der Gene wurden aus der Diplomarbeit übernommen und sind in Tabelle 1 aufgelistet (Teichmann, 2005).

essentiell für die Synthese von Ustilaginsäure ist. Weiterhin war bei Microarray-Analysen unter induzierenden Bedingungen beobachtet worden, dass stromaufwärts von *cyp1* zwei weitere Gene liegen, die unter Stickstoffmangel stark hochreguliert werden. In der Nachbarschaft dieser drei Gene befanden sich

noch neun weitere, die als Kandidaten für ein Gencluster in Frage kamen. Diese Gene wurden daraufhin mit Hilfe von Northern-Blot Analysen auf Expression unter Stickstoffmangelbedingungen hin überprüft. So konnte gezeigt werden, dass diese 12 koregulierten Gene einem Gencluster angehören, welches unter Stickstoffmangelbedingungen exprimiert wird und das vermutlich für die Synthese der Ustilaginsäure verantwortlich ist (Abbildung 6). Dieses Gencluster liegt im subtelomerischen Bereich des Chromosom 23 und umfasst eine Länge von etwa 45 kbp.

Von den 12 Genen des Clusters konnten bisher nur beiden Cytochrom P450 Monooxygenasen näher charakterisiert werden. Die Deletion von *cyp1* führt zu Stämmen, die nicht mehr in der Lage sind, Ustilaginsäure zu produzieren. *Cyp2* Deletionsstämme dagegen produzieren hydrophobere Glycolipide als Wildtypstämme. Daher wurde vermutet, dass beide Cytochrom P450 Monooxygenasen dafür verantwortlich sind, Vorstufen der Ustilaginsäure zu hydroxylieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genaue Funktion von *Cyp1* und *Cyp2* bei der Synthese von UA aufzuklären. Des weiteren sollte die Funktion des potentiellen Transkriptionsfaktors *Rua1* näher untersucht werden. *Rua1* liegt am linken Rand des Genclusters. Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen ließen darauf schließen, dass es sich bei *Rua1* vermutlich um einen Transkriptionsfaktor der  $Cys_2His_2$  Zinkfingerfamilie handelt. *Rua1* Deletionsstämme sind nicht mehr in der Lage, Ustilaginsäuren zu produzieren, da in diesen Stämmen die Synthesegene auch unter Stickstoffmangelbedingungen nicht exprimiert werden (Teichmann, 2005). In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob es sich bei *Rua1* tatsächlich um den Transkriptionsfaktor für das Ustilaginsäurecluster handelt und an welche Promotorregion er bindet. Weiterhin sollten in dieser Arbeit die bisher noch uncharakterisierten Gene des Clusters untersucht werden und ihre Funktion den Reaktionsschritten der Ustilaginsäure-Synthese zugeordnet werden. Letztendlich sollte es damit möglich sein, den kompletten Biosyntheseweg für die UA ableiten zu können.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Identifizierung eines Genclusters, der für die Synthese der Ustilaginsäure zuständig ist.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Entdeckung eines Genclusters der vermutlich alle Gene enthält, die für die Synthese der Ustilaginsäure benötigt werden (Teichmann, 2005). Diese Vermutung ergab sich aus der Tatsache, dass alle Gene dieses Clusters koreguliert sind und eine deutliche Induktion unter Stickstoffmangelbedingungen zeigen. Der Gencluster liegt im subtelomerischen Bereich des Chromosom 23 und besteht aus 12 Genen (Abbildung 6). Für drei Gene des Clusters, *cyp1*, *cyp2* und *rua1* konnte bereits durch Deletionsanalysen gezeigt werden, dass sie Einfluss auf die Ustilaginsäureproduktion haben.

Das Ziel dieser Arbeit war die genaue Aufklärung der Funktion der bereits bekannten und der noch uncharakterisierten Clustergene und der Mechanismus der Regulation.

#### 2.1.1 Analyse der Gene des UA Genclusters

Vergleicht man die Sequenzen der 12 Clustergene mit der Datenbank so findet man neun ORFs, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen aufweisen (Tabelle 1). Die linke Grenze des Clusters bildet das Gen um06458 (*rua1*). Es kodiert für ein Polypeptid dessen C-terminale Domäne eine hohe Ähnlichkeit zu dem Protein Meu26 („meiotic upregulated“) aus *Schizosaccharomyces pombe* zeigt. Die Funktion von Meu26 in *S. pombe* ist noch nicht bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass es während der Meiose, die in *S. pombe* durch Stickstoffmangel induziert wird (Watanabe *et al.*, 2001). Im konservierten C-terminalen Bereich von Rua1 befindet sich eine Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfingerdomäne. Deshalb wurde vermutet, dass es sich bei diesem Protein um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte.

**Tabelle 1: Analyse der Clustergene**

Gen (Datenbank Eintrag)	Mögliche Funktion	Größe	Homolog mit bekannter Funktion	E- value	Strukturmotiv
<i>rua1</i> (um06458)	Regulator der UA Biosynthesegene	757	<i>S. pombe</i> : Meu26, hochreguliert in Meiose	4x10 <sup>-8</sup>	Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> Zinkfinger Motiv
<i>cyp2</i> (um06459)	ω-1 Hydroxyl- ierung der Palmitinsäure	589	<i>H. sapiens</i> : CYP3A43	1x10 <sup>-27</sup>	Cytochrom P450 Monooxygenase
<i>fas2</i> (um06460)	Synthese lang- oder kurzkettiger Fettsäuren	3704	<i>A. nidulans</i> : Fettsäure- synthase, α und β Untereinheit	0.0	Enthält alle Untereinheiten einer FAS mit Ausnahme der PPT-Domäne
<i>atr1</i> (um06461)	Export der UA	1382	<i>A. nidulans</i> : Multidrug Resistance Protein AtrD	0.0	ABC Transporter Familie
<i>uat1</i> (um06462)	Acetyl-/ Acylierung der Cellobiose	513	<i>C. annuum</i> : Acytransferase	2.0	HXXXD Motiv der BAHD-Superfamilie der Acyltransferasen
<i>cyp1</i> (um06463)	ω-Hydroxyl- ierung der Palmitinsäure	640	<i>C. tropicalis</i> : P450 Monooxygenase CYP52A	3x10 <sup>-44</sup>	Cytochrom P450 Monooxygenase
<i>uat2</i> (um06464)	unbekannt	391	-	-	-
<i>orf1</i> (um06465)	unbekannt	382	-	-	-
<i>uhd1</i> (um06466)	Hydroxylierung von kurzen Fettsäuren	300	<i>N. tabacum</i> : Cinnamyl- Alkohol- Dehydrogenase (CAD1)	5x10 <sup>-15</sup>	Dehydrogenase
<i>ugt1</i> (um06467)	Glycosylierung der 16-OH- Palmitinsäure	578	<i>V. vinifera</i> : UDP- Glucose: Flavonoid 3- O-Glucosyltransferase	1x10 <sup>-13</sup>	Ugt Familie 2
<i>orf2</i> (um11813)	unbekannt	115	-	-	-
<i>ahd1</i> (um06469)	α-Hydroxyl- ierung der Palmitinsäure	395	<i>Nicotiana benthamiana</i> : C-4 Sterol Methyloxidase 2	1x10 <sup>-14</sup>	Histidinreiche Motive charakteristisch für Membran gebundene Nicht-Häm- Eisenproteine

Das nächste Gen im Cluster (*cyp2*) codiert für eine Cytochrom P450 Monooxygenase, deren Deletion zu einer Veränderung des Laufverhaltens der sezernierten UAs führt.

Der nachfolgende Leserahmen kodiert für ein Protein, das 3704 Aminosäuren lang ist und Ähnlichkeiten sowohl zur  $\alpha$ - als auch zur  $\beta$ -Untereinheit von pilzlichen Fettsäuresynthasen aufweist. Im Unterschied zu allen anderen bisher bekannten pilzlichen Fettsäuresynthasen, bei denen die beiden Untereinheiten durch zwei verschiedene Leserahmen kodiert werden, handelt es sich bei *fas2* um einen durchgehenden ORF, der beide Untereinheiten beinhaltet.

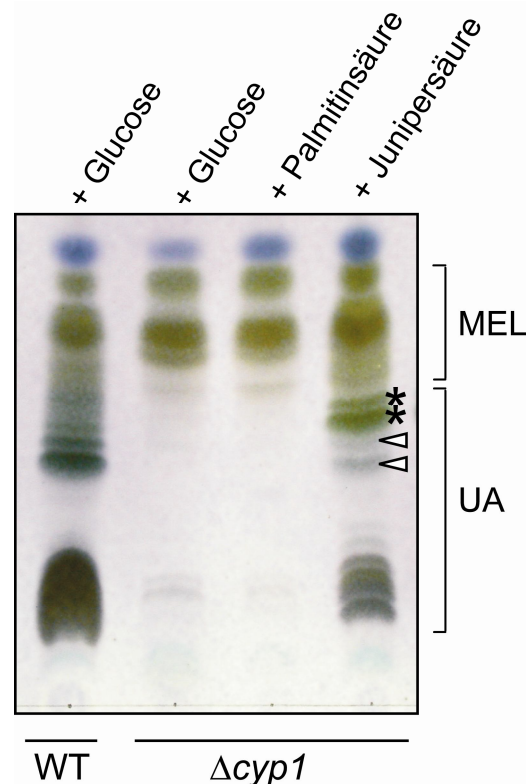
Das Gen *atr1* kodiert für ein Membranprotein aus der Familie der ABC-Transporter und *ugt1* zeigt Sequenzähnlichkeiten zu UDP-Glucose abhängigen Glycosyltransferasen, wobei die höchste Ähnlichkeit zur UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glycosyltransferase aus *Vitis vinifera* besteht (Kobayashi *et al.*, 2001). Das Genprodukt zu *uat1* besitzt eine kurze Sequenz, die charakteristisch für Acyltransferasen der BAHD-Superfamilie sind (Ma *et al.*, 2005) und *uhd1* zeigt Sequenzähnlichkeit zur Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD1) aus *N. tabacum* (Damiani *et al.*, 2005). Das Genprodukt zu *ahd1*, welches das Gencluster nach rechts abgrenzt, zeigt Ähnlichkeit zu Proteinen der Familie der Nicht-Häm-Eisenproteine. Die verbleibenden drei ORFs (*uat2*, *orf1* und *orf2*) zeigen keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen.

### **2.1.2 Die Cytochrom P450 Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 sind für die Hydroxylierung der langen Fettsäurekette verantwortlich**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die zwei Cytochrom P450 Monooxygenasen an der Synthese der Ustilaginsäure beteiligt sind. Während  $\Delta cyp1$  Mutantenstämme nicht mehr in der Lage waren, Ustilaginsäure zu produzieren (Abbildung 7), zeigte sich in  $\Delta cyp2$  Stämmen ein verändertes Bandenmuster auf der Dünnschichtchromatographie (Abbildung 9). Cytochrom P450 Monooxygenasen übertragen einzelne Sauerstoffmoleküle auf eine große Anzahl verschiedener Substrate. Deshalb wurde vermutet, dass Cyp1 und Cyp2 für die Hydroxylierung der 15,16-Di- bzw. 2,15,16-Trihydroxypalmitinsäure zuständig

sein könnten. Daher sollte aufgeklärt werden, für welchen dieser Hydroxylierungsschritte die Proteine verantwortlich sind.

Da  $\Delta cyp1$  Mutanten nicht mehr in der Lage sind, UAs zu produzieren, lag die Vermutung nahe, dass dieses Genprodukt für die terminale Hydroxylierung der langen Fettsäurekette verantwortlich ist. Denn wenn diese OH-Gruppe fehlt, ist keine Bindung zwischen der langen Fettsäurekette und der Cellobiose möglich. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde getestet, ob sich der Biosynthesedefekt der  $\Delta cyp1$  Mutante durch Fütterung mit 16-Hydroxyhexadecansäure (Junipersäure) supprimieren lässt. Als Kontrolle wurde der Mutante Palmitinsäure (Hexadecansäure) als Kohlenstoffquelle angeboten. Wenn Cyp1 für die terminale Hydroxylierung der Fettsäure verantwortlich ist, sollten die Zellen bei Zugabe von Junipersäure, die bereits am terminalen



**Abbildung 7: Cyp1 hydroxyliert die  $\omega$ -Position der langkettigen Fettsäure.**  $\Delta cyp1$  Mutantenstämme wurden in stickstoffarmen Medien mit Glucose, Palmitinsäure bzw. Junipersäure als Kohlenstoffquelle angezogen und auf Ustilaginsäureproduktion mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Während *cyp1* Deletionsstämme, die in Medien mit Glucose und Palmitinsäure gewachsen sind (mittlere beiden Spuren), keine UA produzieren, sind solche, die Junipersäure zugesetzt bekommen hatten (rechte Spur) wieder in der Lage UA zu produzieren. Die linke Spur zeigt UA Produktion eines Wildtypstammes.

Kohlenstoff hydroxyliert ist, wieder UAs produzieren. Palmitinsäure dagegen sollte nicht verwendet werden können. Dazu wurden Wildtyp und  $\Delta cyp1$  Mutantenstämme in Stickstoffmangelmedium mit Glucose bzw. den oben erwähnten Fettsäuren vier Tage inkubiert. Dann wurden die produzierten Glycolipide mit Ethylacetat extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Das Laufmittel wurde so gewählt, dass hydrophobe Substanzen schneller laufen, während hydrophile eine höhere Affinität für das Trennmittel aufweisen. Nach der Auftrennung wurde die Platte mit einem Farbstoff bestehend aus Eisessig: Schwefelsäure: Anisaldehyd (50:1:0,5) eingesprüht, und durch Erhitzen entwickelt. Mit dieser Methode werden spezifisch Zuckerreste angefärbt, so dass ausschließlich Glycolipide sichtbar werden. Im oberen Bereich der Dünnschichtchromatographie (DC) laufen die hydrophoben Mannosylerythritollipide (MEL), während die hydrophileren Ustilaginsäuren (UA) im unteren Bereich zu finden sind.

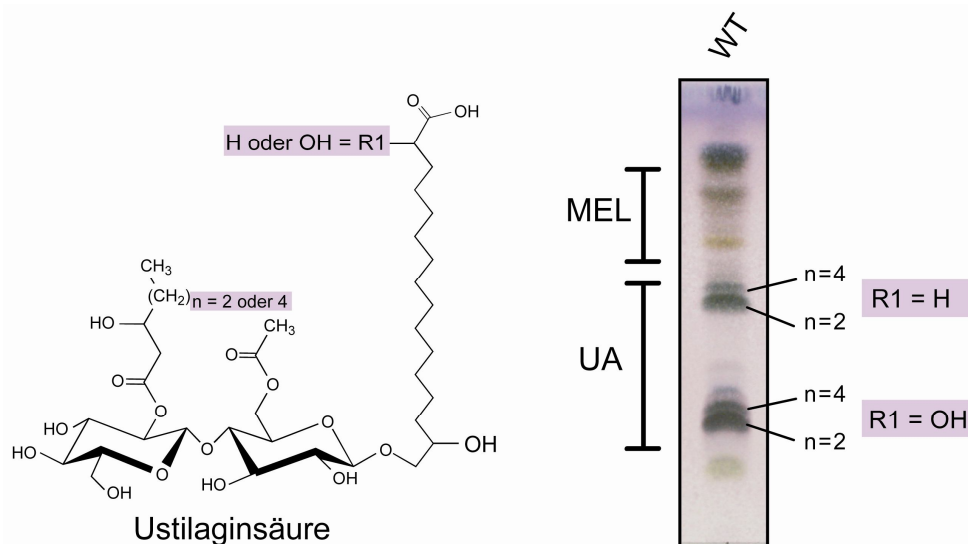
Abbildung 7 zeigt, dass  $\Delta cyp1$  Mutantenstämme, denen Glucose oder Palmitinsäure zugesetzt wurde, nicht in der Lage sind, Ustilaginsäure zu produzieren. Dagegen zeigten die  $\Delta cyp1$  Stämme, die Junipersäure als Kohlenstoffquelle zur Verfügung hatten, wieder deutliche Ustilaginsäureproduktion. Das spricht dafür, dass Cyp1 für die terminale Hydroxylierung der Fettsäure zuständig ist. Da die zugesetzte Junipersäure außer der terminalen Hydroxylgruppe keine weitere OH-Gruppe trägt, sind die produzierten UAs etwas hydrophober als die vom Wildtyp produzierte Ustilaginsäure (Abbildung 7 mit Sternchen markiert), denn Hydroxylgruppen verleihen aufgrund ihrer Polarität dem Molekül einen hydrophilen Charakter. Interessanterweise fällt auf, dass außerdem auch die Wildtypbanden auf der Dünnschichtchromatographie auftreten (Abbildung 7 mit Pfeilen markiert)! Dies deutet daraufhin, dass die Junipersäure in diesen Stämmen weiter hydroxyliert wird.

Um zu sehen, ob auch andere Fettsäuren mit einer  $\omega$ -ständigen Hydroxylgruppe von *U. maydis* zur Ustilaginsäurebiosynthese benutzt werden können, wurden die  $\Delta cyp1$  Stämme mit drei weiteren Fettsäuren, 15-Hydroxypentadekansäure, 12-Hydroxydodekansäure sowie Aleuritinsäure (9,10,16-Trihydroxypalmitinsäure), gefüttert. In allen drei Fällen wurden Glycolipide produziert (keine Abbildung). Die Länge und der Hydroxylierungsgrad der eingebauten Fettsäure spielt für die UA Biosynthese demnach keine große



Rolle, sondern allein die Tatsache, dass eine terminale Hydroxylgruppe vorliegt.

Ustilaginsäurederivate, die von  $\Delta cyp2$  Mutanten produziert werden, sind hydrophober als die von Wildtypstämmen, sie laufen in der Dünnschichtchromatographie deutlich weiter als vom Wildtyp produzierte Ustilaginsäuren (Abbildung 9A). Diese veränderten Ustilaginsäuren wurden mittels Fouriertransformations-Massenspektrometrie (FTMS) analysiert.



**Abbildung 8: Massenspektrometrische Analyse der Wildtyp-Ustilaginsäuren.**

Ustilaginsäurebanden wurden von der DC gekratzt und mittels FTMS analysiert. UA, die an der  $\alpha$ -Position (R1) der Fettsäure hydroxyliert sind, laufen in der DC wesentlich langsamer, als UAs, die an dieser Position keine OH-Gruppe tragen. Innerhalb der Doppelbande findet man UAs die am zweiten Zuckermolekül eine Hydroxyoctansäure (n = 4) besitzen oben und diejenigen, die eine Hydroxyhexansäure (n = 2) tragen unten.

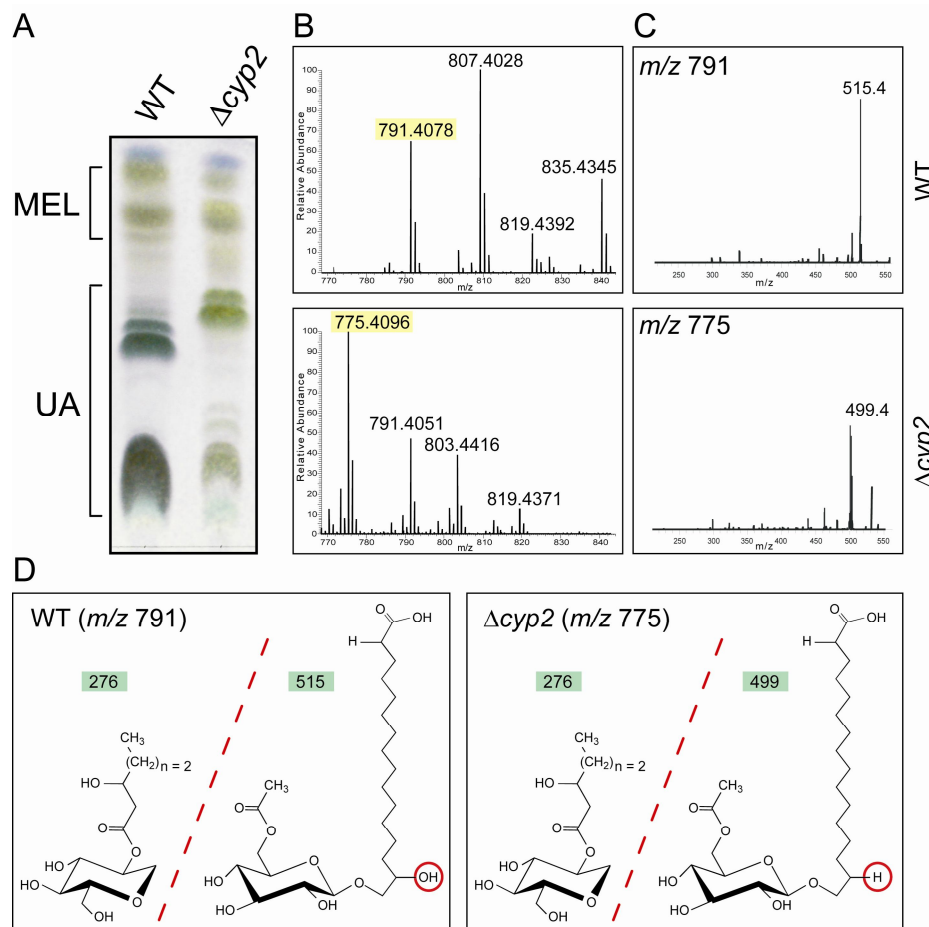
Zunächst wurden die vier Wildtyp-Ustilaginsäurebanden von der DC gekratzt und einzeln analysiert, um die erhaltenen Massen den Banden auf der DC zuordnen zu können. Hierbei konnten alle bekannten Ustilaginsäuren detektiert werden. Sie werden im folgenden ausschließlich mit dem sie begleitenden Natriumkation  $[M + Na^+]$  dargestellt und besitzen die Massen:  $m/z$  791.4078,  $m/z$  807.4028,  $m/z$  819.4392 und  $m/z$  835.4345 (Tabelle 2 und Abbildung 8). Die Analyse ergab, dass auf der Dünnschichtchromatographie  $\alpha$ -hydroxylierte UAs (R1 = OH) deutlich langsamer laufen, als diejenigen, denen diese Hydroxylgruppe fehlt. Innerhalb der Doppelbanden auf der DC laufen jeweils die UAs, die mit der längeren  $\beta$ -Hydroxyoctansäure (n = 4)

verestert sind, weiter als diejenigen, die eine  $\beta$ -Hydroxyhexansäure ( $n = 2$ ) tragen (Abbildung 8).

**Tabelle 2: Massenspektrometrische Analyse der von Wildtypzellen produzierten Ustilaginsäuren**

Molekulargewicht (M+Na <sup>+</sup> )	Seitengruppen	
	R1	n
<i>m/z</i>		
791.4078	H	2
807.4028	OH	2
819.4392	H	4
835.4345	OH	4

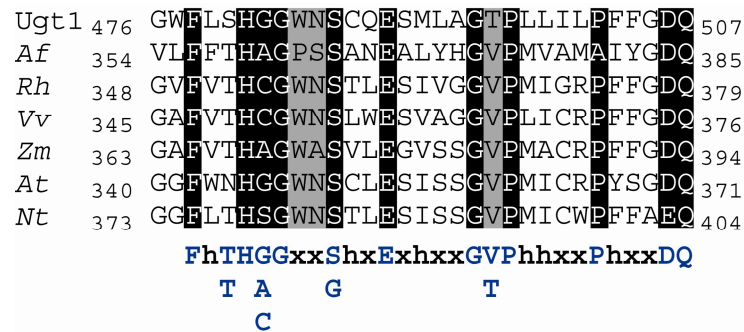
Um die veränderten Banden der  $\Delta cyp2$  Mutanten näher charakterisieren zu können wurden die Zellen für 4 Tage unter Stickstoffmangelbedingungen angezogen, die Ustilaginsäuren mit Ethylacetat extrahiert und massenspektrometrisch untersucht. Bei der FTMS Analyse der UAs des  $\Delta cyp2$  Stammes zeigte sich, dass diese UAs eine Massendifferenz von 15,998 gegenüber Wildtyp-Ustilaginsäuren aufwiesen (Abbildung 9B). Diese Massendifferenz zeigt exakt das Fehlen eines Sauerstoffatoms an, folglich fehlt den Ustilaginsäuren, die von  $\Delta cyp2$  Stämmen produziert werden, eine Hydroxylgruppe. Um sagen zu können, um welche Hydroxylgruppe es sich handelt, wurden die Proben mittels Tandem-Massenspektrometrie ( $MS^n$ ) weiter analysiert. Hierbei werden einzelne Ionen der UA weiter zerlegt, so dass einzelne Fragmente des Moleküls untersucht werden können. Für die Analyse wurden die Ustilaginsäuren mit der kleinsten Masse ( $m/z$  795 für den Wildtyp bzw.  $m/z$  775 für die  $\Delta cyp2$  Mutante) benutzt, da bekannt war, dass diese keine Hydroxylgruppe an der  $\alpha$ -Position der langen Fettsäure tragen. Das  $MS^n$  Ergebnis zeigte, dass die OH-Gruppe an der langen Fettsäurekette fehlen muss, denn nach der Fragmentierung war die OH-Gruppe der  $\beta$ -Hydroxyhexansäure noch vorhanden. Da Cyp1 für die Hydroxylierung der  $\omega$ -Position zuständig ist, ist anzunehmen, dass Cyp2 für die Hydroxylierung der subterminalen  $\omega$ -1-Position verantwortlich ist (Abbildung 9C und D).



**Abbildung 9: Cyp2 hydroxyliert die subterminale Position der langkettigen Fettsäure.** Dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Analyse von  $\Delta cyp2$  Stämmen. Ustilaginsäuren, die von  $\Delta cyp2$  Mutanten produziert wurden, sind hydrophober als Wildtyp UAs (A) und zeigen eine Massendifferenz von 15,998 gegenüber wildtypischen (B).  $MS^n$ -Analyse der Massen  $m/z$  795 (Wildtyp) und  $m/z$  775 ( $\Delta cyp2$ ) (C). Schematische Darstellung der UA Fragmentierung (D).

### 2.1.3 Die Glycosyltransferase Ugt1 überträgt die Zuckereinheit auf die Fettsäurekette

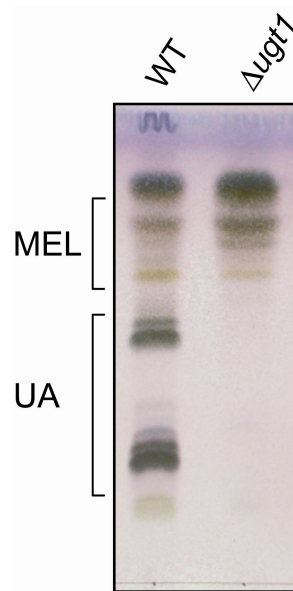
Das Gen *ugt1* zeigt hohe Sequenzähnlichkeit zur Familie der UDP-Glucose abhängigen Glycosyltransferasen. Glycosyltransferasen dieser Familie weisen C-terminal eine hochkonservierte Sequenz auf die auch in *ugt1* zu finden ist. In Abbildung 10 ist der Sequenzvergleich von Ugt1 zu Proteinen anderer Organismen dargestellt. Neben der Ähnlichkeit zu einem pilzlichen Protein aus *Aspergillus fumigatus* treten hauptsächlich pflanzliche Glycosyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Rosa hybrid cultivar*, *Vitis vinifera* und *Nicotiana*



**Abbildung 10: Sequenzvergleich von Ugt1.** Ugt1 weist C-terminal eine hochkonservierte Sequenz auf, die typisch für UDP-Glucose abhängige Glycosyltransferasen ist. Unter dem Alignment ist die Konsensussequenz dieses Motivs dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind blau markiert. Die Abkürzungen stehen für: Af = *A. fumigatus*, Rh = *Rosa hybrid cultivar*, Vv = *V. vinifera*, Zm = *Z. mays*, At = *A. thaliana* und Nt = *Nicotiana tabacum*.

*tabacum* auf. Ugt1 weist starke Homologie zur UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase aus *V. vinifera* auf, die für den letzten Glycosylierungsschritt während der Anthocyanbiosynthese verantwortlich ist (Boss *et al.*, 1996a). Anthocyane sind wasserlösliche Pflanzenfarbstoffe, die in nahezu allen höheren Pflanzen vorkommen und den Blüten und Früchten die rote, violette, blaue oder blauschwarze Färbung geben, im Falle von *V. vinifera* ist die Glycosyltransferase für die dunkle Färbung von Rotweinträumen verantwortlich (Boss *et al.*, 1996b; Kobayashi *et al.*, 2001).

Um zu untersuchen, welche Funktion Ugt1 in *U. maydis* hat, wurde ein Deletionsstamm erzeugt, in dem *ugt1* durch homologe Rekombination gegen eine Resistenzkassette für Hygromycin ausgetauscht wurde. Die erfolgreiche Deletion konnte mittels Southern-Blot und Komplementation nachgewiesen werden. Zur Analyse des Phänotyps wurden Wildtyp- und Mutantenstämme für vier Tage unter Stickstoffmangelbedingungen angezogen und dann mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie auf Ustilaginsäureproduktion untersucht. Während der Wildtyp normale Mengen an Ustilaginsäure produzierte, waren  $\Delta ugt1$  Mutanten nicht mehr in der Lage, Ustilaginsäure herzustellen (Abbildung 11). UDP-Glucose abhängige Glycosyltransferasen übertragen Glucoseeinheiten auf ihr Substrat. Deshalb wird vermutet, dass Ugt1 an der Glycosylierung der Ustilaginsäure beteiligt ist. Interessanterweise enthält das Ustilaginsäurecluster nur eine Glycosyltransferase. Während der UA Synthese müssen aber zwei Glucosemoleküle auf die Fettsäure übertragen werden. Es stellt sich daher die Frage, ob Ugt1 beide Zuckereinheiten auf die



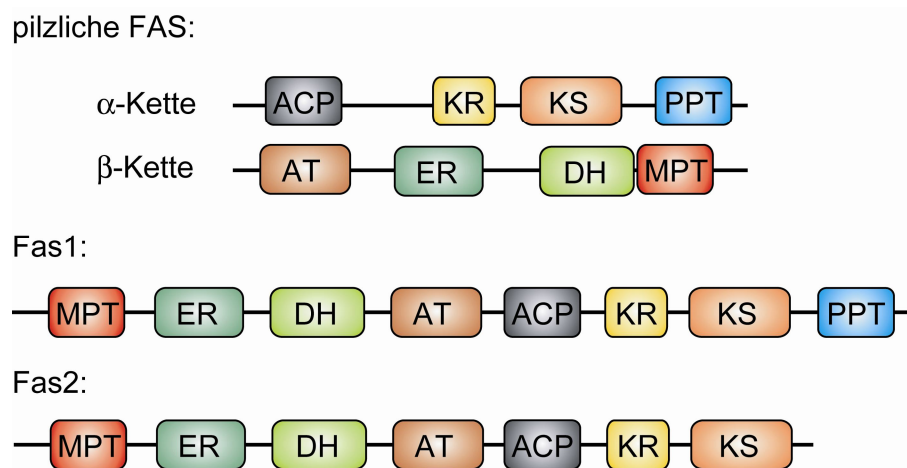
**Abbildung 11: Ugt1 Deletionsstämme produzieren keine UA mehr.**  $\Delta ugt1$  Mutantenstämme wurden in stickstoffarmen Medien mit Glucose über vier Tage angezogen und auf Ustilaginsäureproduktion mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Während der Wildtyp (linke Spur) normale Mengen an UAs produzierte, konnte bei  $\Delta ugt1$  Mutanten (rechte Spur) keine UA Produktion mehr beobachtet werden.

Fettsäure überträgt, oder ob für einen der beiden Schritte eine weitere, bisher uncharakterisierte Glycosyltransferase zuständig ist.

#### 2.1.4 Die Fettsäuresynthase Fas2 wird für die Synthese der mittellangen Hydroxyfettsäuren benötigt, die auf die Ustilaginsäure übertragen werden

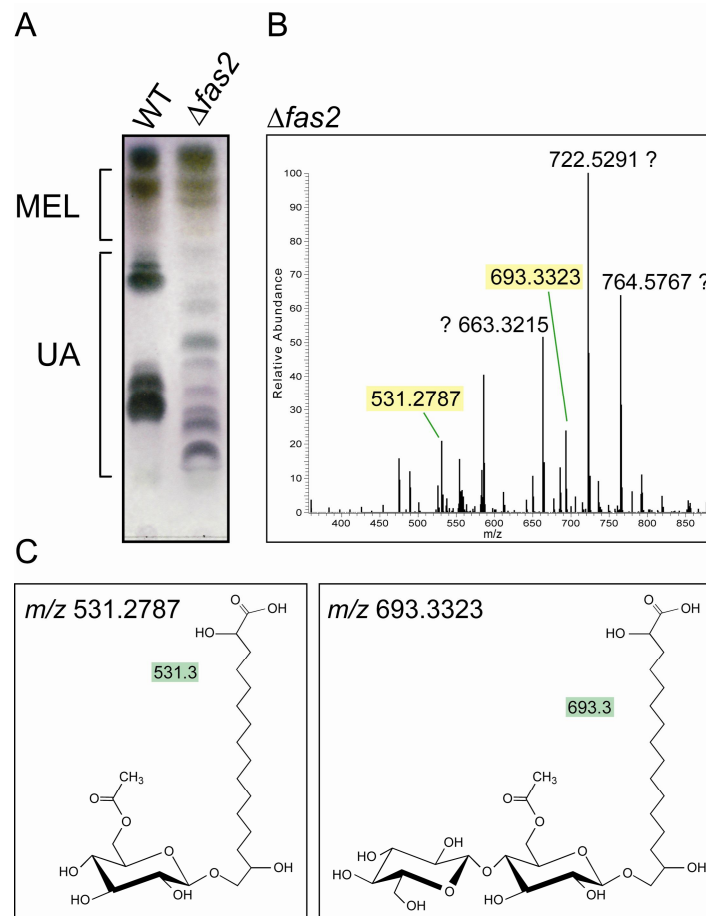
Im Genom von *U. maydis* befinden sich interessanterweise zwei Gene, die für Fettsäuresynthasen kodieren. Die eine ist vermutlich für die Synthese von Fettsäuren zuständig, die im Primärmetabolismus benötigt werden und wurde daher Fas1 genannt. Im Ustilaginsäure-Biosynthesecluster findet sich ein weiteres Gen, das starke Sequenzähnlichkeit zu Fettsäuresynthasen aufweist. Es umfasst einen sehr langen ORF mit einer Länge von 11114 bp, und wurde aufgrund der starken Homologie zu Fettsäuresynthasen Fas2 genannt. Vergleicht man die Proteinsequenz von Fas2 mit der anderer Organismen, so fällt auf, dass die Fettsäuresynthase aus *U. maydis*, aus einer durchgehenden

Polypeptidkette besteht, die alle katalytischen Domänen enthält. Andere pilzliche Fettsäuresynthasen dagegen, bestehen in der Regel aus zwei Polypeptidketten, einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, auf denen die sieben unterschiedlichen katalytischen Zentren angeordnet sind (Abbildung 12). Weiterhin fällt auf, dass in Fas2 die C-terminale Phosphopantetheintransferase (PPT) fehlt. Diese Unter-einheit wird für die Aktivierung des ACP benötigt, indem sie ein Phosphopantethein auf das ACP überträgt. Es stellt sich also die Frage, auf welche Weise in Fas2 das ACP aktiviert wird.



**Abbildung 12: Struktur pilzlicher Fettsäuresynthasen im Vergleich zu *U. maydis* Fas1 und Fas2.** Die katalytischen Zentren der pilzlichen FAS sind auf zwei Polypeptidketten angeordnet, die beiden Fettsäuresynthasen aus *U. maydis* dagegen auf einer. Die Abkürzungen der katalytischen Zentren stehen für: Acyl-Carrier-Protein (ACP), Acetyltransferase (AT), Ketoacylsynthase (KS), Malonyl/Palmitoyltransferase (MPT), Ketoacylreduktase (KR), Dehydratase (DH), Enoylreduktase (ER) und Phosphopantetheintransferase (PPT).

Um zu analysieren, welche Fettsäure durch Fas2 synthetisiert wird, wurde das *fas2* Gen deletiert. Die Ustilaginsäureproduktion der  $\Delta fas2$  Mutante wurde dann mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Abbildung 13A zeigt, dass  $\Delta fas2$  Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich verändertes Bandenspektrum aufweisen. Diese veränderten Ustilaginsäuren wurden daher mit einer Massenspektrometrie weiter untersucht (Abbildung 13B). Es fällt auf, dass die Probe eine Vielzahl an Substanzen mit unterschiedlichen Massen beinhaltet. Einige davon (in Abbildung 13B mit einem Fragezeichen markiert) sind vermutlich Kontaminationen, die bei der Präparation der Probe entstehen, da sie auch in anderen Massenspektren auftauchen. Die Substanzen mit den Massen  $m/z$  531.2787 und  $m/z$  693.3323 dagegen sind eindeutig als Ustilagin-



**Abbildung 13: Fas2 synthetisiert Hexan- und Oktansäure.** Dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Analyse von  $\Delta fas2$  Stämmen. Die DC von  $\Delta fas2$  Mutanten weist ein völlig verändertes Bandenspektrum auf (A). Die FTMS Analyse der  $\Delta fas2$  Mutanten zeigt UAs, denen die Acylgruppe fehlt ( $m/z$  693.3323) bzw. die nur mit einem Zucker beladen sind ( $m/z$  531.2787). Des Weiteren sind Massen vorhanden, die mit einem Fragezeichen versehen wurden, da sie bisher nicht eindeutig zuzuordnen sind (B). Schematische Darstellung der in  $\Delta fas2$  Stämmen gefundenen Ustilaginsäuren (C).

säurevorstufen einzuordnen. Hierbei handelt es sich bei der Masse  $m/z$  693.3323 um eine UA, der die Acylgruppe am zweiten Zucker fehlt und bei der Masse  $m/z$  531.2787 um eine, die nur mit einem Zucker beladen ist (Abbildung 13B und C). Das Fehlen der Acylgruppe am zweiten Zucker spricht dafür, dass Fas2 für die Synthese dieser kurzen Fettsäurekette verantwortlich ist.

### 2.1.5 Die Acyltransferasen Uat1 und Uat2 sind für die Acetylierung, bzw. Acylierung der Cellobioseeinheit verantwortlich

Das Gen *uat1* enthält einige konservierte Aminosäuren, die für die Familie der Acyltransferasen der BAHD-Superfamilie charakteristisch sind. Enzyme dieser Familie spielen eine Rolle bei der Biosynthese einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten (Stewart *et al.*, 2005; St-Pierre *et al.*, 1998). Sie besitzen ein kurzes, konserviertes Motiv mit der Sequenz HXXXDG und DFGWGKP. Die homologe Sequenz aus Uat1 lautet: **HWLVDF** und **DFGEKLGKP**.

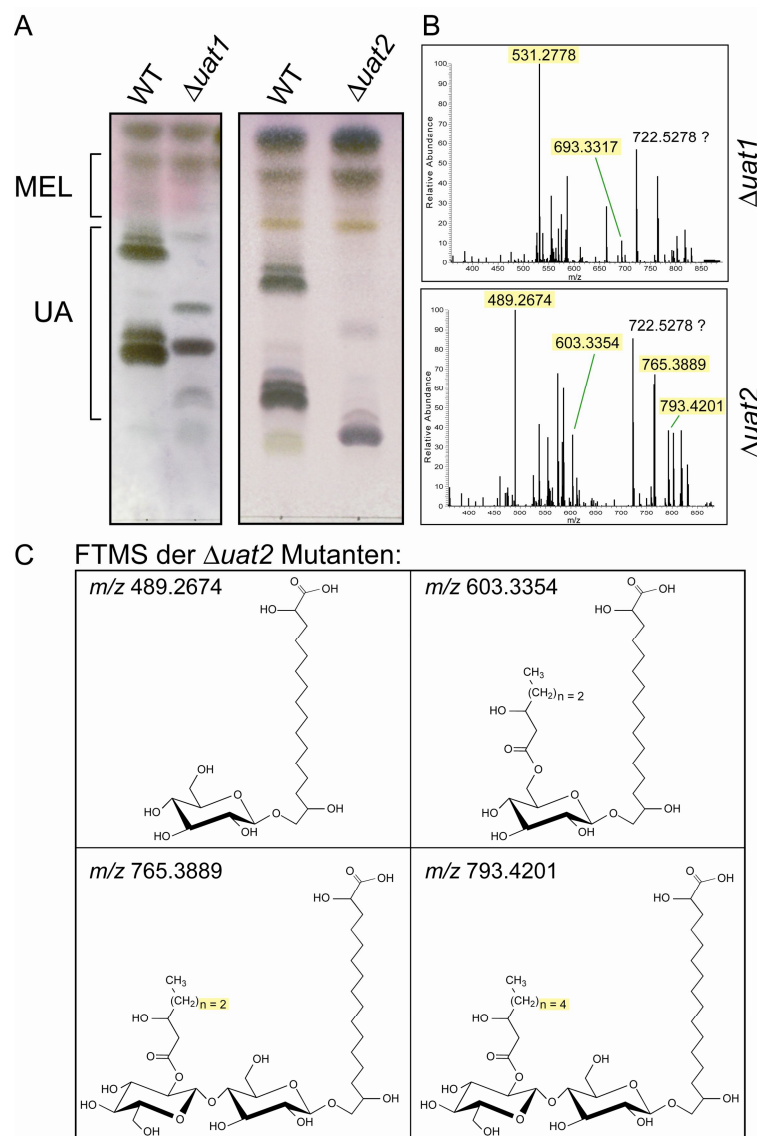
Uat2 dagegen weist überhaupt keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen auf. Um die Funktion dieser beiden Proteine zu untersuchen, wurden Deletionsstämme für beide Gene hergestellt. Die Mutanten wurden dann mittels Dünnschichtchromatographie auf Ustilaginsäureproduktion untersucht. Während  $\Delta uat1$  Stämme im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Bandenspektrum in der DC aufweisen, produzieren  $\Delta uat2$  Stämme UAs, die deutlich hydrophiler waren als die vom Wildtyp sekretierten Ustilaginsäuren (Abbildung 14A). Die veränderten Ustilaginsäuren wurden daraufhin massenspektrometrisch untersucht. Neben verschiedenen unspezifischen Massen konnten bei der Analyse der  $\Delta uat1$  Probe zwei Massen eindeutig Ustilaginsäuren zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich um die Massen  $m/z$  531.2778, eine nicht acylierte UA, und  $m/z$  693.3317, ein Ustilaginsäure-Vorläuferprodukt, dem der zweite Zucker fehlt (Abbildung 14B oben). Interessanterweise sind dies dieselben Banden, die auch im Massenspektrum von  $\Delta fas2$  Mutanten auftreten (Abbildung 13B), was dafür spricht, dass Uat1 die von Fas2 synthetisierte kleine Fettsäure auf die Ustilaginsäure überträgt.

Das Ergebnis der Massenspektrometrie von  $\Delta uat2$  Mutanten zeigt vier Massen, die eindeutig verschiedenen Ustilaginsäurevorstufen zuzuordnen sind. Bei der Masse  $m/z$  489.2674 handelt es sich um ein Molekül bei dem die lange Fettsäurekette mit einer Glucoseeinheit beladen ist. Die Massen  $m/z$  765.3889 und  $m/z$  793.4201 sind vollständige Ustilaginsäuren mit einer Hydroxyhexansäure bzw. einer Hydroxyoktansäure am zweiten Zucker verestert. Beiden Formen fehlt allerdings die Acetylgruppe am ersten Zuckermolekül. Die Masse  $m/z$  603.3354 ist eine Ustilaginsäurevorstufe, die nur ein Zuckermolekül



trägt, das aber ungewöhnlicherweise statt mit einer Acetylgruppe mit einer Hydroxyhexansäure verestert ist (Abbildung 14B unten und C).

Interessanterweise fehlt in allen Fällen die Acetylgruppe am ersten Zuckermolekül. Es wird daher vermutet, dass es sich bei Uat2 um eine Acetyltransferase handelt, deren Aufgabe die Übertragung einer Acetylgruppe auf die Cellobiose der UA ist.



**Abbildung 14: Uat2 sorgt für die Acetylierung des ersten Zuckermoleküls, Uat1 acyliert den zweiten Zucker.** Dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Analyse von  $\Delta uat1$  und  $\Delta uat2$  Stämmen. In der DC zeigen  $\Delta uat1$  Stämme ein verändertes UAs Bandenmuster, während  $\Delta uat2$  Mutanten UAs produzieren, die hydrophiler sind als Wildtyp-Ustilaginsäuren (A). Die FTMS Analyse der  $\Delta uat1$  Mutanten zeigte UAs, denen die Acylgruppe fehlt ( $m/z$  693.3323) bzw. die nur mit einem Zucker beladen sind ( $m/z$  531.2787) (B oben). Die FTMS der  $\Delta uat2$  Mutante zeigt vier Massen ( $m/z$  489.2674,  $m/z$  765.3889,  $m/z$  793.4201 und  $m/z$  603.3354), die eindeutig Ustilaginsäuren zuzuordnen sind (B unten und C).

### 2.1.6 Die Hydroxylasen Uhd1 und Uhd1 hydroxylieren die Ustilaginsäure an zwei unterschiedlichen Positionen.

Die Sequenz von Uhd1 zeigt starke Homologie zur Familie der NAD(P)H abhängigen Oxidoreduktasen. Das Strukturmotiv dieser Familie zeichnet sich durch ein wechselndes  $\beta\alpha\beta$ -Helix Motiv aus, das man auch als Rossmann-Faltung bezeichnet (Rossmann *et al.*, 1974). Innerhalb der ersten 35 Aminosäuren findet sich außerdem ein hochkonserviertes Motiv, das den Kontakt zu

```

Uhd1  1  MAGTSRNVRLVVTGANGFVGS HIVSLLLSRGYVVNATVR---RQ 41
Nt    1  --MSLAAKTVCVTGASGYIASWLVKFLLRGYTVKASVRDPNDP 42
Vr    1  -MSTAAGKLVCVTGASGYIASWLVKFLLRGYTVKATVRDTPNDP 43
At    1  --MNCGGKVVCVTGASGYIASWLVKLLLRGYTVNATVRDPKDK 42
Zm    1  -MANTAKGKVCVTGASGFIASWLVKRLLESYHVLGTVRDPGNG 43
Af    1  ----MASETVLITGASGFIAATHIVESFLRAGYNVRGTVRSERTA 40
Ps    1  -----MSKVFITGASGFIAQHIVKLFIDNGYSVIGTVRSIEKG 38
Tt    5  QIRDNNQIRVLLTGASGYLAGHVLFLCLLRGYQVRGTVRSLQNH 49

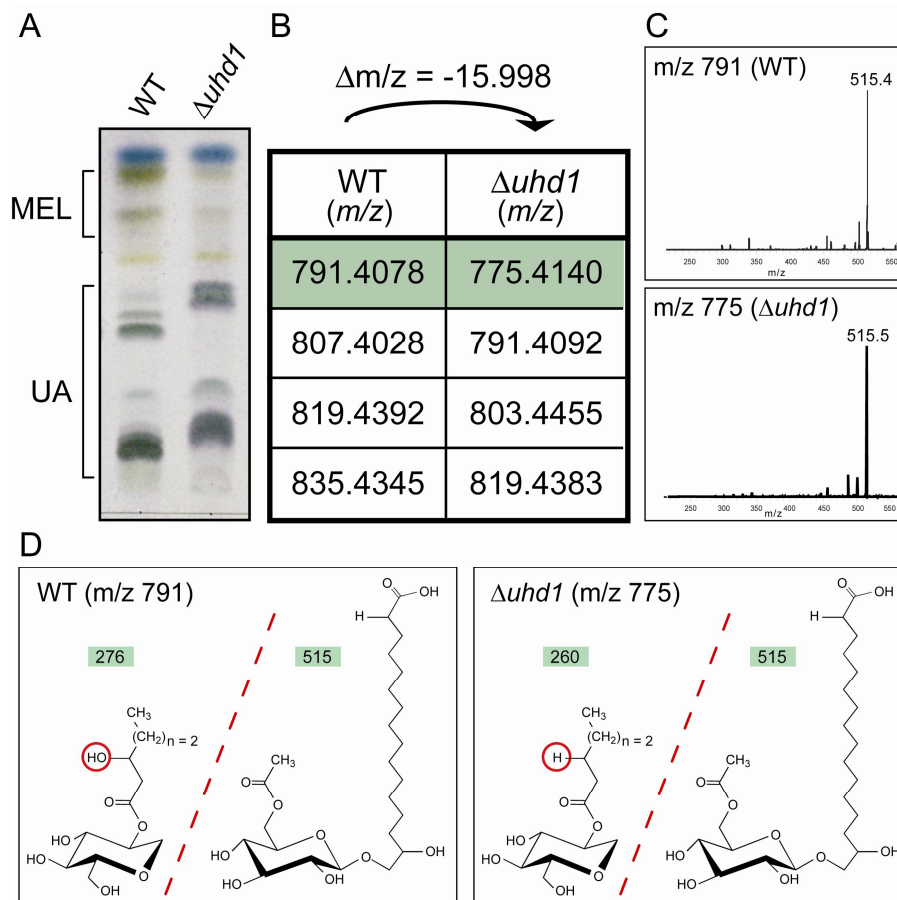
```

**Abbildung 15: Sequenzvergleich von Uhd1.** Uhd1 zeigt starke Sequenzähnlichkeit zur Familie der NAD(P)H abhängigen Oxidoreduktasen, insbesondere zu pflanzlichen und anderen pilzlichen Dehydrogenasen. Das konservierte Motiv weist auf ein NAD(P)H bindendes Protein hin. Eine konservierte, positiv geladene Aminosäure (lila), sechs hydrophobe Aminosäuren (rot), eine glycinreiche Region (grün) und eine negativ geladene Aminosäure (blau). Die Abkürzungen stehen für: *Nt* = *Nicotiana tabacum*, *Vr* = *Vigna radiata*, *At* = *Arabidopsis thaliana*, *Zm* = *Zea mays*, *Af* = *Aspergillus flavus*, *Ps* = *Pichia stipitis*, *Tt* = *Tetrahymena thermophila*.

NAD(P)<sup>+</sup> herstellt. Es besteht aus einer glycinreichen Region, sechs gleichmäßig verteilten hydrophoben Aminosäuren, einer sauren Aminosäure, sowie einer N-terminalen positiv geladenen Aminosäure und zwar vorzugsweise Lysin oder Arginin (Abbildung 15) (Bellamacina, 1996). Innerhalb dieser Familie weist Uhd1 starke Ähnlichkeit zu pflanzlichen und pilzlichen Dehydrogenasen, insbesondere der Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD1) aus *N. tabacum* auf (Damiani *et al.*, 2005).

Um zu untersuchen, welche Funktion Uhd1 hat, wurde das Gen deletiert und die Mutantenstämme auf Ustilaginsäureproduktion untersucht. Interessanterweise zeigte sich in der Dünnschichtchromatographie ein ähnlicher Phänotyp wie bei  $\Delta cyp2$  Mutanten. Alle von  $\Delta uhd1$  Mutanten produzierten UAs waren etwas hydrophober als die vom Wildtyp produzierten Ustilaginsäuren (Abbildung 16A). Die massenspektrometrische Untersuchung ergab, dass genau wie in  $\Delta cyp2$  Stämmen, Ustilaginsäuren produziert wurden, die eine

Massendifferenz von  $m/z$  15.998 gegenüber den Wildtyp-Ustilaginsäuren aufwiesen (Abbildung 16B). Das spricht dafür, dass Uhd1 ebenfalls für die Übertragung einer Hydroxylgruppe auf die Ustilaginsäure zuständig ist. Um



**Abbildung 16: Uhd1 hydroxyliert die  $\beta$ -Position der kurzen Fettsäure.** Dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Analyse von  $\Delta uhd1$  Stämmen. Ustilaginsäuren, die von  $\Delta uhd1$  Mutanten produziert wurden, sind hydrophober als Wildtyp UAs (A) und zeigen eine Massendifferenz von 15,998 gegenüber wildtypischen (B). MS<sup>n</sup>-Analyse der Massen  $m/z$  795 (Wildtyp) und  $m/z$  775 ( $\Delta uhd1$ ) (C). Schematische Darstellung der UA Fragmentierung (D).

zu identifizieren, welche Hydroxylgruppe fehlt, wurden die Ustilaginsäuren mit den kleinsten Masse ( $m/z$  791.4078 für den Wildtyp und  $m/z$  775.4140 für die  $\Delta uhd1$  Mutante) mit Hilfe einer Tandem-Massenspektrometrie weiter untersucht. Hierbei ergab sich, dass in dieser Mutante die  $\beta$ -Hydroxylgruppe an der kurzen Fettsäure fehlt (Abbildung 16C und D), weshalb angenommen wurde, dass Uhd1 für die Übertragung dieser Hydroxylgruppe zuständig ist.

Das Gen *ahd1* kodiert für ein Protein, welches zur Familie der Nicht-Häm-Di Eisenproteine gehört. Proteine dieser Familie sind durch konservierte

histidinreiche Sequenzen charakterisiert (Shanklin *et al.*, 1994). Innerhalb dieser Familie zeigt Ahd1 starke Sequenzähnlichkeit zu pflanzlichen und pilzlichen Proteinen (Abbildung 17). Ahd1 besitzt das für Nicht-Häm-Eisenproteine typische histidinreiche Motiv, sowie vier hydrophobe Bereiche die als Transmembrandomänen wirken. Neben einem weiteren Protein aus *U. maydis*

```

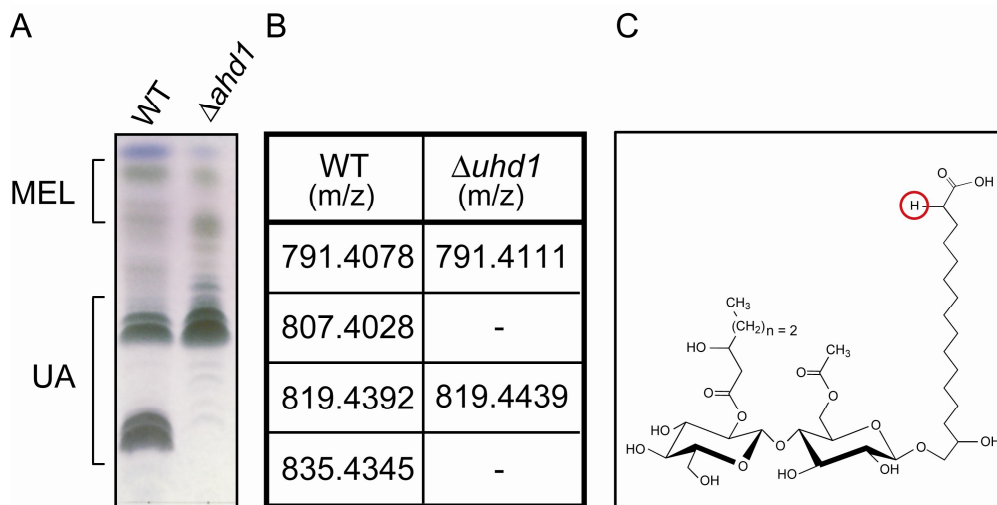
Ahd1 136 FYTVHRALEHHPRIYKYIHKKHHEFSAPIA...ALVHDWHEHYFNTENYGPVGL 239
Um    111 FYTVHRALEHWGPLYKHIHKKHHEYSAPFG...ADHHDYHHQAFVG---CYST 223
An    123 FYHSHRGLDHPKIYRHIHKKHHEFTTPIA...MEVHDMHHELFGVNGFTIGF 228
At    113 FYWGHRIILHTKWLYKNVHSHVHHEYATPFG...ADFHDYHHRLLYTKSGNYSS 223
Nb    113 FYWGHRIILHTKWLYKHVHSHVHHEYATPFG...ADFHDYHHRLLYTKSGNYSS 226
Ag    116 FYYAHRLLHSRRIYRYIHKQHHEWTAPIA...PEAHDFHHLKFNQCFGLGV 219
Aa    116 FYYAHRLLHNRHIYKYIHKQHHEWTAPIA...PEAHDFHHLKFNQCFGLGV 219
Hs    116 FYYSHRLLHHPYFYKTIHKKHHEWTAPIG...PEFDYHHLKFNQCYGVLGV 219

```

**Abbildung 17: Sequenzvergleich von Ahd1.** Ahd1 zeigt Homologie zur Familie der Nicht-Häm-Eisenproteine. Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch ein konserviertes histidinreiches Motiv (schwarz hinterlegt) aus. Ahd1 weist Ähnlichkeit zu zwei weiteren pilzlichen Proteinen aus *Um* = *U. maydis* und *An* = *Aspergillus niger*, sowie zu pflanzlichen und tierischen Proteinen auf. Unter anderem besteht auch eine Homologie zu einem menschlichen Protein (*Hs*). *At* = *Arabidopsis thaliana*, *Nb* = *Nicotiana benthamiana*, *Ag* = *Anopheles gambiae*, *Aa* = *Aedes aegypti*.

konnte eine Homologie zu Sterol-Methyloxidasen (SMO) aus *N. benthamiana* und *A. thaliana* ermittelt werden. Diese Enzyme sind an der Biosynthese verschiedener Sterole beteiligt, bei der Methylgruppen entfernt werden (Darnet *et al.*, 2001; Darnet and Rahier, 2004). Des Weiteren zeigten sich Ähnlichkeiten zu tierischen Proteinen aus *Anopheles gambiae* und *Aedes aegypti* sowie zu einem menschlichen Protein.

Um zu analysieren, welche Funktion Ahd1 bei der Ustilaginsäuresynthese hat, wurde das Gen deletiert und auf Ustilaginsäureproduktion untersucht. In der Dünnschichtchromatographie (Abbildung 18A) zeigte sich, dass im Vergleich zum Wildtyp jeweils die beiden Ustilaginsäuren fehlten, die an der  $\alpha$ -Position der langen Fettsäurekette hydroxyliert sind. Diese Beobachtung konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie bestätigt werden. Es zeigte sich, dass nur die Ustilaginsäuren mit den Massen  $m/z$  791.4111 und  $m/z$  819.4439 vorhanden waren (Abbildung 18B und C). Deshalb wird angenommen, dass Ahd1 für die Übertragung der Hydroxylgruppe auf die  $\alpha$ -Position der langen Fettsäurekette verantwortlich ist.



**Abbildung 18: Ahd1 hydroxyliert die  $\alpha$ -Position der langkettigen Fettsäure.** Dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Analyse von  $\Delta ahd1$  Stämmen.  $\Delta ahd1$  Mutantenstämme produzieren nur die hydrophoben Ustilaginsäuren. UAs die an der  $\alpha$ -Position der Fettsäure hydroxyliert sind fehlen auf der DC (A). Die FTMS Analyse bestätigt das Fehlen der  $\alpha$ -hydroxylierten Ustilaginsäuren (B). Schematische Darstellung der von  $\Delta ahd1$  Stämmen produzierten UA. Die Position, an der die Hydroxylgruppe fehlt, wurde rot eingekreist (C).

### 2.1.7 Der ABC-Transporter Atr1 ist vermutlich am Export der UA beteiligt

Das Gen *Atr1* codiert für ein Transportprotein der ABC-Transporter Familie. Auf Grund der Tatsache, dass *atr1* unter Stickstoffmangelbedingungen stark exprimiert wird, wurde angenommen, dass er am Export der UA beteiligt sein könnte. Allerdings hatte eine Deletion dieses Gens nur geringen Einfluss auf die Menge der sekretierten Ustilaginsäuren (Caliaro, 2006). Dies lässt vermuten, dass die Funktion von *Atr1* in diesem Fall von anderen Transportern übernommen wird.

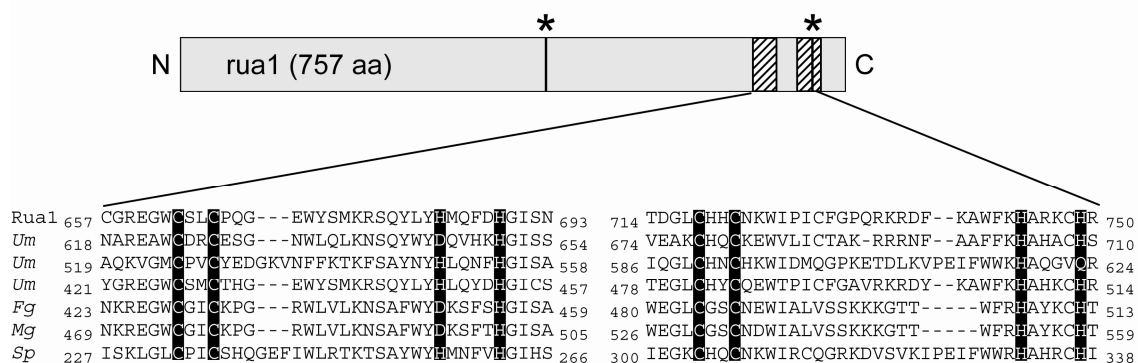
### 2.1.8 Weitere Gene des UA Genclusters

Der Gencluster beinhaltet zwei weitere Gene, *um06465* und *um06468*, für die bisher keine Homologie zu bekannten Proteinen gefunden werden konnte. Um zu analysieren, für welchen Biosyntheseschritt diese beiden Proteine benötigt

werden, wurden Deletionsmutanten erstellt. Allerdings war bei keinem der beiden Proteine ein veränderter Phänotyp in der DC zu erkennen, weshalb vermutet wurde, dass diese Gene entweder in der Datenbank falsch annotiert sind oder die Funktion dieser Proteine von einem anderen Enzym übernommen werden kann (keine Abbildung).

## 2.2 Regulation des Ustilaginsäureclusters

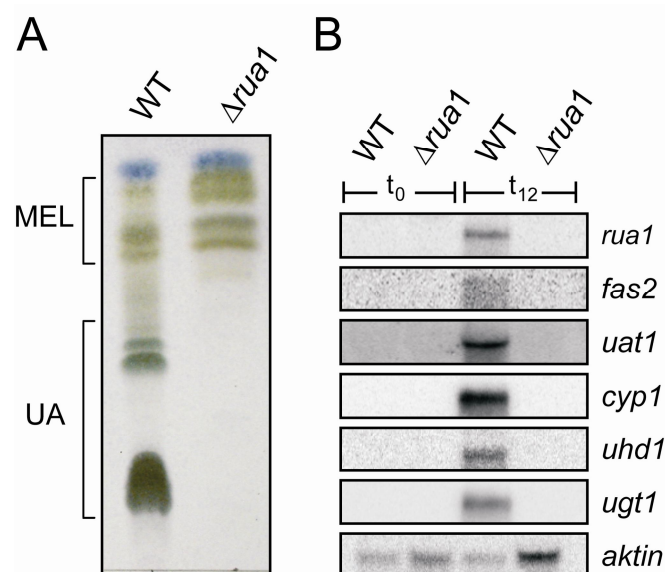
Der für die Produktion der Ustilaginsäure zuständige Gencluster enthält an seinem linken Rand ein Gen, dessen C-terminale Domäne hohe Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten Transkriptionsfaktoren aufweist. Aufgrund seiner vermuteten Funktion als Transkriptionsfaktor wurde es *rua1* genannt, was für „regulator of ustilagic acid biosynthesis“ („Regulator der Ustilaginsäure-Biosynthese“) steht. Rua1 ist 757 Aminosäuren lang und besitzt im C-terminalen Bereich zwei Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfingerdomänen, die hohe Sequenzähnlichkeit zu drei weiteren *U. maydis* Proteinen, sowie anderen pilzlichen Proteinen zeigen. Des weiteren konnten in der Sequenz von Rua1



**Abbildung 19: Schematische Darstellung von Rua1.** Rua1 ist ein 757 Aminosäuren großes Protein, das außer der Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfingerregion kaum Homologie zu anderen Proteinen aufweist. Es besitzt im C-terminalen Bereich zwei Zinkfingerdomänen (schraffierte Balken). Des weiteren konnten zwei Kernlokalisierungsdomänen identifiziert werden (Stern). Im unteren Teil der Abbildung ist die Sequenz der zwei Zinkfingerdomänen im Vergleich zu anderen pilzlichen Proteinen dargestellt. Dabei wurden die beiden Cysteine und die beiden Histidine, die für die Koordinierung des Zinkions zuständig sind schwarz hinterlegt. Die Abkürzungen stehen für: *Um* = *U. maydis*, *Fg* = *Fusarium gramineum*, *Mg* = *Magnaporthe grisea*, *Sp* = *Schizosaccharomyces pombe*.

zwei Kernlokalisierungssequenzen (NLS) identifiziert werden (Abbildung 19) (Liu, 2007).

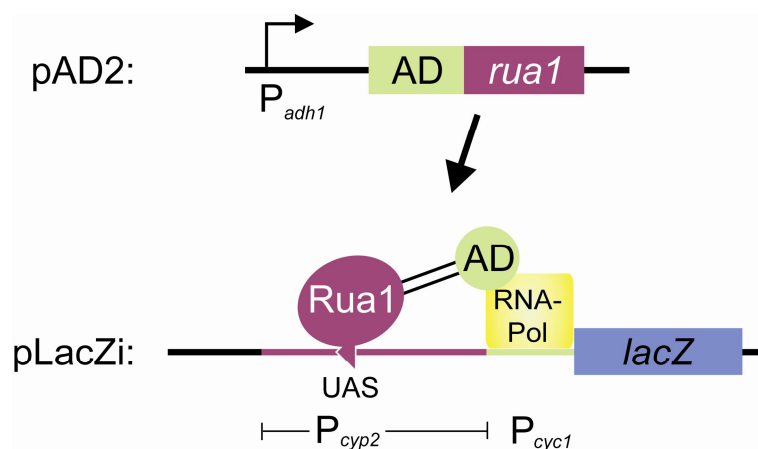
Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *rua1* dazu führt, dass die Zellen nicht mehr in der Lage sind, Ustilaginsäuren zu produzieren (Abbildung 20A). Weiterhin werden in  $\Delta rua1$  Stämmen alle untersuchten Gene aus dem Cluster auch unter Stickstoffmangelbedingungen nicht exprimiert (Abbildung 20B) (Teichmann, 2005). Es wurde daher vermutet, dass Rua1 für die Regulation des Genclusters unter Stickstoffmangelbedingungen zuständig ist. In dieser Arbeit sollte deshalb näher untersucht werden, ob es sich bei Rua1 tatsächlich um einen Transkriptionsfaktor handelt und welche Sequenzen in den Promotoren von Rua1 erkannt werden.



**Abbildung 20: Rua1 reguliert das Ustilaginsäurecluster.** Dünnschichtchromatographische Analyse von  $\Delta rua1$  Stämmen. Während der Wildtyp (linke Spur) normale Mengen an UAs produzierte, konnte bei  $\Delta rua1$  Mutanten (rechte Spur) keine UA Produktion mehr beobachtet werden (A). Northern-Blot Analyse von  $\Delta rua1$  Stämmen. RNA aus Wildtyp- und  $\Delta rua1$ -Stämmen wurde vor ( $t_0$ ) und 12h ( $t_{12}$ ) nach Inkubation in stickstofffreiem Medium präpariert. Während in Wildtypstämmen nach 12h eine starke Induktion aller Clustergene zu beobachten war, wurde in  $\Delta rua1$  Stämmen keines dieser Gene exprimiert. Als RNA Ladekontrolle diente eine Sonde gegen das konstitutiv exprimierte Aktin (B) (Teichmann, 2005).

## 2.2.1 Die C-terminale Zinkfingerregion von Rua1 ist ausreichend für die DNA Bindung

Die Funktion von Rua1 ist bisher weitgehend unbekannt, da mit Ausnahme der C-terminal vorhandenen Zinkfingerdomäne, das Protein keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen aufweist. Daher sollte untersucht werden, ob Rua1 tatsächlich in der Lage ist die Promotoren der Clustergene zu binden, und welcher Teil des Proteins dafür benötigt wird. Um dies zu untersuchen, wurde das Hefe-Ein-Hybrid-System verwendet, mit dem Protein-DNA Bindung *in vivo* nachgewiesen werden kann.



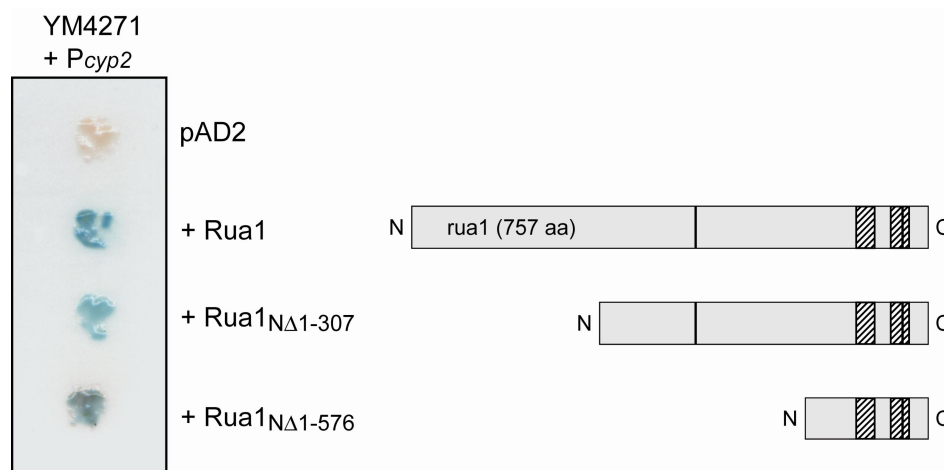
**Abbildung 21: Schematische Darstellung des Hefe-Ein-Hybrid-Systems.** Der zu untersuchende Promotorbereich ( $P_{cyp2}$ ) wird in einen Hefevektor ( $pLacZi$ ), der den Hefeminimalpromotor des Cytochrom C1 Gens ( $P_{cyc1}$ ) vor dem *lacZ* Gen enthält, kloniert. In ein zweites Plasmid ( $pAD2$ ), der eine Hefe-Aktivierungsdomäne, unter der Kontrolle des konstitutiven *adh1* Promotors ( $P_{adh1}$ ) enthält, werden Rua1, bzw. N-terminal verkürzte Varianten von Rua1 ( $Rua1_{N\Delta 1-307}$  und  $Rua1_{N\Delta 1-576}$ ) eingebracht. Ist Rua1 in der Lage, den Promotor zu binden, wird die  $\beta$ -Galactosidase exprimiert und die Hefezellen färben sich in Anwesenheit von X-Gal blau.

Hierzu exprimiert man das zu untersuchende Protein in einem Hefestamm, der die zu testende DNA-Sequenz vor einem Reporter gen besitzt. In unserem Fall wurde die 5'-untranslatierte Region des *cyp2* Gens, die den gesamten *cyp2* Promotor beinhaltet, in einem Hefevektor ( $pLacZi$ ) vor den Minimalpromotor des Cytochrom C1 Gens ( $P_{cyc1}$ ) kloniert. Die *cyp2* Promotorregion sollte die Bindeelemente für Rua1 besitzen. An diese Bindeelemente bindet Rua1 und kontrolliert damit zusammen mit dem *cyc1* Minimalpromotor die Expression



des Reportergens *LacZ*. Dieser Vektor wird stabil über das *URA3* Gen ins Hefegenom integriert.

In einen zweiten Vektor (pAD2), der eine Hefe-Aktivierungsdomäne, unter der Kontrolle des konstitutiven *adh1* Promotors enthält, wurde *Rua1*, bzw. N-terminal verkürzte Varianten von *Rua1* (*Rua1*<sub>N $\Delta$ 1-307</sub> und *Rua1*<sub>N $\Delta$ 1-576</sub>) kloniert. Bindet *Rua1* an die Promotorsequenz wird die  $\beta$ -Galactosidase exprimiert und die Hefezellen färben sich in Anwesenheit von X-Gal blau (Abbildung 21).



**Abbildung 22: *Rua1* bindet über die Zinkfingerdomäne an die Promotoren der Clustergene.** *Rua1* sowie N-terminal verkürzte Varianten von *Rua1* (*Rua1*<sub>N $\Delta$ 1-307</sub> und *Rua1*<sub>N $\Delta$ 1-576</sub>) wurden im Hefe-Ein-Hybrid getestet. In allen drei Fällen kommt es zu einer Aktivierung des *cyp2* Promotors, *lacZ* wird transkribiert und die Hefezellen färben sich nach Zugabe von X-Gal blau. Als Kontrolle wurde der Vektor (pAD2) allein eingesetzt. Hier bleiben die Hefezellen weiß.

Abbildung 22 zeigt, dass *Rua1* an Bindeelemente des *cyp2* Promotors zu bindet, die Hefezellen färben sich im  $\beta$ -Galactosidase-Plattentest deutlich blau. In einem Kontrollstamm, der nur den leeren pAD2 Vektor enthält, bleiben die Zellen weiß. Es sollte außerdem getestet werden, ob die C-terminale Zinkfingerdomäne allein ebenfalls für die Promotorbindung ausreicht. Deshalb wurde das Protein N-terminal um 307 bzw. 576 Aminosäuren verkürzt. Beide N-terminal verkürzten Versionen konnten ebenfalls den Promotor binden, allerdings trat die Blaufärbung bei der um 576 Aminosäuren verkürzten Version, deutlich später auf (Abbildung 22). Das Ergebnis des Hefe-Ein-Hybrid Versuchs zeigt, dass es sich bei *Rua1* tatsächlich um einen Transkriptionsfaktor handelt, der die Clustergene aktiviert. Außerdem scheint die Zinkfingerdomäne für die DNA Bindung verantwortlich zu sein.

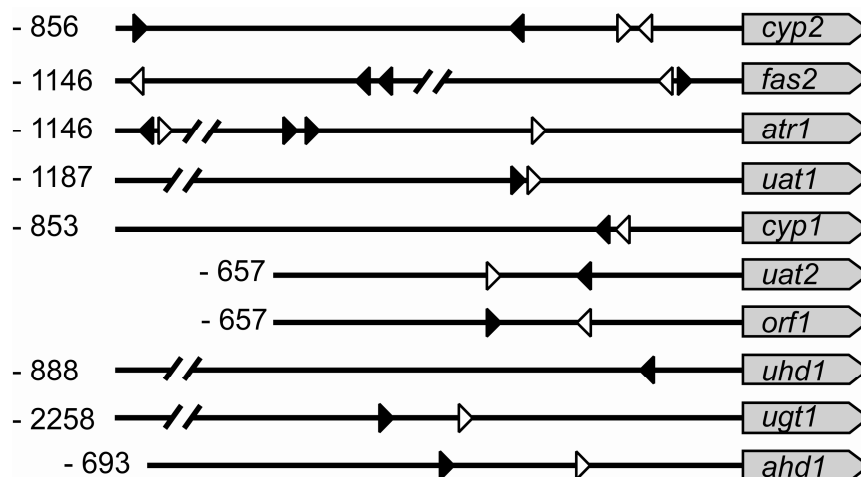
## 2.2.2 Identifizierung der regulatorischen Region, die von Rua1 erkannt wird

Um zu untersuchen ob die von Rua1 regulierten Gene in den Promotorbereichen konservierte Elemente enthalten, die als Bindestellen für Rua1 dienen könnten, wurden die Promotorsequenzen sämtlicher Clustergene verglichen. Hierfür wurde das Online-Computerprogramm „MEME“



**Abbildung 23: Ein konserviertes Motiv konnte in allen Promotorbereichen des Genclusters gefunden werden.** Mit Hilfe des Computerprogramms „MEME“ konnte eine Sequenz analysiert werden, die in allen Promotorbereichen der Clustergene ein oder mehrmals vorkommt.

(<http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) zu Hilfe genommen. Beim Vergleich aller 5'-untranslatierten Bereiche konnte ein Motiv ermittelt werden, das vor allen Clustergenen ein oder mehrfach auftrat. Dieses Motiv ist in

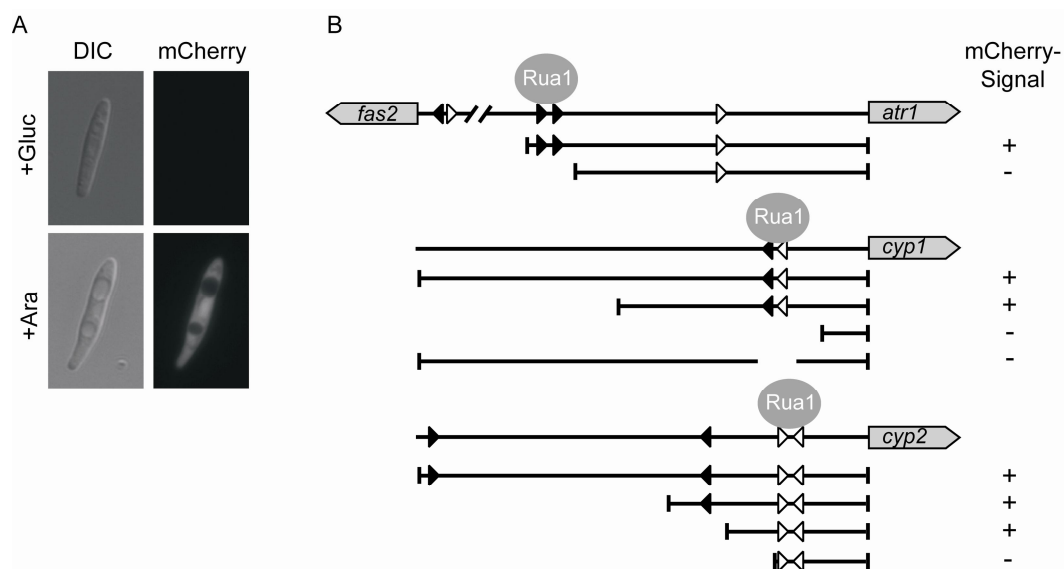


**Abbildung 24: Lokalisierung des möglichen Rua1 Bindemotivs.** Es wurde ermittelt wo und wie häufig das Bindemotiv in den Promotorbereichen der Clustergene vorkommt. (Schwarze Dreiecke = Das Motiv stimmt exakt mit der Konsensussequenz überein, weiße Dreiecke = 1-2 Nukleotide der variablen Region weichen von der Konsensussequenz ab. Die Dreieckspitzen zeigen die Orientierung des Motivs an).

Abbildung 23 dargestellt und lautet  $T/G G/T CGCAT A/T C/T C/T G/A$ . Es besteht aus einer Kernsequenz CGCAT, die konserviert ist und einer variablen Region aus 6 Nukleotiden, die um die Kernsequenz angeordnet sind.

Zunächst wurde ermittelt, wo das Motiv im 5'-untranslatierten Bereich der Clustergene lokalisiert ist, wie häufig es auftritt und in welcher Orientierung vor dem Transkriptionsstart es vorliegt. Hierbei wurden Sequenzen, die das exakte Motiv aufwiesen als schwarze Dreiecke und diejenigen, die 1-2 Nukleotide von der Konsensussequenz abwichen, mit weißen Dreiecken dargestellt (Abbildung 24).

Als nächstes sollte getestet werden, ob das vorhergesagte Motiv tatsächlich als Erkennungssequenz für Rua1 dienen kann. Hierzu wurde durch Verkürzung verschiedener Promotoren untersucht, ob die Anwesenheit des Motivs für die Rua1-abhängige Regulation benötigt wird. Mit Hilfe von PCR wurden



**Abbildung 25: Eingrenzung der DNA Bindedomäne von Rua1.** Verschiedene Promotoren des Genclusters wurden vor mCherry kloniert. Dieses Konstrukt wurde in einen *U. maydis* Stamm transformiert, der *rua1* unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren  $P_{crg}$ -Promotors enthält. Unter Glucosebedingungen wird *rua1* nicht exprimiert, die Zellen bleiben dunkel. Durch Zugabe von Arabinose wird *rua1* exprimiert, bindet in der Promotorregion vor dem mCherry-Lokus und die mCherry-Expression wird induziert. (A). Auswirkung verschiedener Verkürzungen der *atr1*, *cyp1* und *cyp2* Promotoren auf die Aktivität des mCherry Reporterstammes (B).

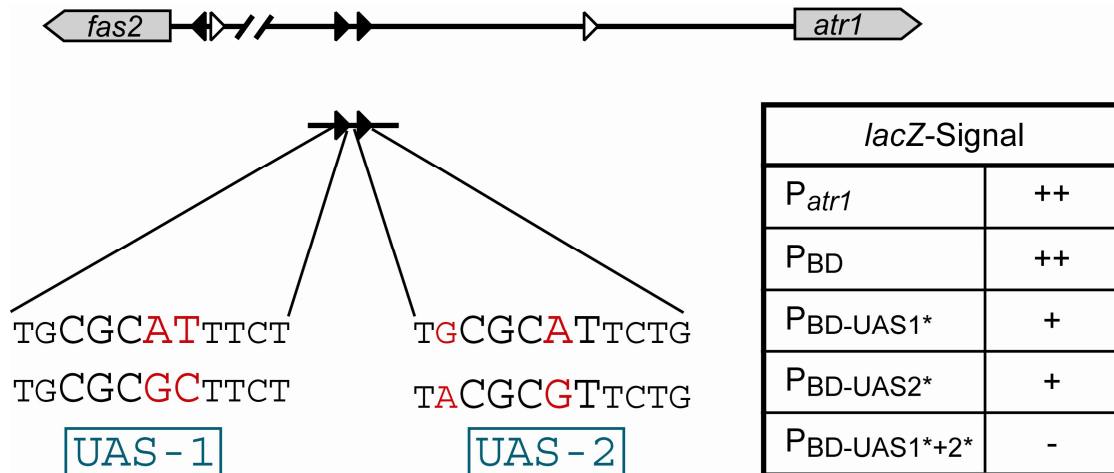
verschiedene Promotorbereiche unterschiedlicher Länge amplifiziert und vor das Reporter-gen mCherry kloniert; mCherry ist ein Derivat von mRFP1 und DsRed, das mit einer Wellenlänge von 587 nm angeregt werden kann und dann

Licht der Wellenlänge 610 nm emittiert (Shaner *et al.*, 2004; Shu *et al.*, 2006). Diese Konstrukte wurden dann in einen *U. maydis* Stamm transformiert, der Rua1 hinter dem Arabinose induzierbaren P<sub>crg</sub>-Promotor exprimiert. Schaltet man Rua1 durch Arabinose an, bindet es an den vor das Reporter gen geschalteten Promotor und mCherry wird exprimiert (Abbildung 25A). Expression von mCherry war also immer dann zu sehen, wenn in dem getesteten Promotorbereich mindestens noch eine Bindestelle für Rua1 enthalten war. In Abbildung 25B sind die getesteten Promotorbereiche dargestellt. Getestet wurden die Promotoren der Rua1 regulierten Gene *atr1*, *cyp1* und *cyp2*. Es fiel auf, dass die Entfernung des Motivs vor *atr1* und vor *cyp1* zum Verlust des mCherry-Signals führt. Interessanterweise traf dies nicht ganz für den Bereich vor *cyp2* zu. Hier kann man die exakte Bindedomäne wegnehmen, und erhält trotzdem ein mCherry-Signal. Allerdings liegen im Bereich vor dem Transkriptionsstart noch zwei weitere Motive, deren Sequenz um zwei Nukleotide abweicht. Deshalb wurde vermutet, dass Rua1 möglicherweise an diese bindet. Um dies zu überprüfen wurden noch weitere 100 bp der 5´untranslatierten Region weggenommen. Jetzt war, obwohl die beiden Motive nicht angegriffen worden waren, kein mCherry-Signal mehr zu sehen (Abbildung 25B). Rua1 ist also nicht mehr in der Lage in diesem Bereich an den Promotor zu binden. Dieses Ergebnis ist leider widersprüchlich und müsste noch weiter untersucht werden. Möglicherweise überschneidet sich die Bindestelle für Rua1 in diesem Bereich mit allgemeinen Promotorsequenzen, so dass trotz Bindung durch Rua1 keine Rekrutierung der RNA-Polymerase mehr möglich ist.

### 2.2.3 Charakterisierung des Rua1 Bindemotivs

Um die Rua1 Erkennungssequenz weiter einzugrenzen, sollte das Bindemotiv allein charakterisiert werden. Es wurde erwartet, dass das Bindemotiv als UAS („upstream activating sequence“) wirkt und somit für die Aktivierung der Gene benötigt wird. Diese Funktion sollte mit Hilfe des bereits beschriebenen Hefe-Ein-Hybrid-System getestet werden.

Dazu wurde ein etwa 200 bp großer Abschnitt des *atr1* Promotors gewählt. Dieser Bereich enthält zwei Wiederholungen des vorhergesagten Bindemotivs

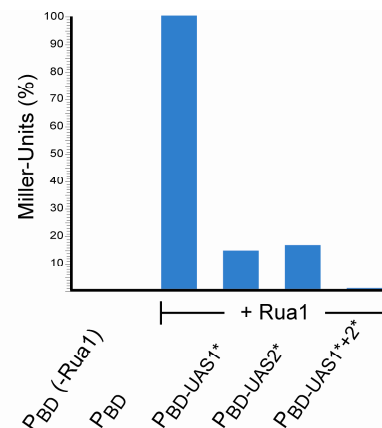


**Abbildung 26: Auswirkung von gezielten Mutation der möglichen Rua1-Bindedomäne auf die Aktivität des Promotors.** Die Bindedomäne (BD) sowie verschiedene Varianten der BD werden im Hefe-Ein-Hybrid-System auf Promotoraktivität getestet. Die in die jeweilige UAS eingeführten Mutationen sind mit roten Buchstaben dargestellt. Das *lacZ*-Signal steht für die Intensität der Blaufärbung der Hefezellen im  $\beta$ -Galactosidase-Plattentest: ++ = starke Blaufärbung, + = deutliche Blaufärbung erst nach einigen Stunden, - = keine Blaufärbung.

und wird im weiteren als „Bindedomäne (BD)“ bezeichnet. Mit dem Hefe-Ein-Hybrid-System wurden folgende Promotorbereiche getestet: Der gesamte *atr1* Promotor, die Bindedomäne und drei verschiedene Varianten der Bindedomäne in der einzelne Nucleotide innerhalb der UAS durch direkte Mutagenese ausgetauscht worden waren. In der ersten Variante wurde UAS1 mutiert (UAS1\*), in der zweiten UAS2 (UAS2\*) und in der dritten wurden in beiden UAS einzelne Nucleotide ausgetauscht (UAS1\*+2\*) (Abbildung 26).

**Tabelle 3: Quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität aus Flüssig-kulturen**

Stamm		Miller- Units
$P_{BD}$	ohne Rua1	0
$P_{BD}$	mit Rua1	2400
$P_{BD-UAS1^*}$		353
$P_{BD-UAS2^*}$		400
$P_{BD-UAS1^*+2^*}$		20



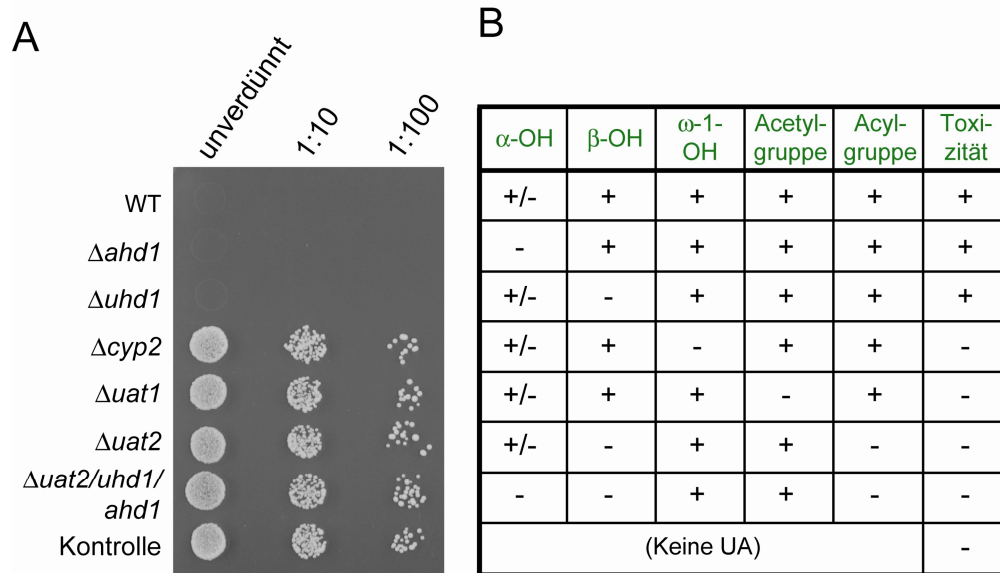
Im  $\beta$ -Galaktosidase-Plattentest zeigte sich nach kurzer Zeit für das Konstrukt mit dem kompletten *atr1* Promotor und der Bindedomäne eine sehr deutliche Blaufärbung der Hefekolonien. Wurde eine der beiden UAS mutiert, war die Intensität der Blaufärbung wesentlich schwächer, nach wenigen Stunden aber deutlich zu erkennen. Wurden beide UAS mutiert, zeigte sich auch nach mehreren Stunden Inkubation keine Blaufärbung der Hefekolonien (Tabelle in Abbildung 26). Dieses Ergebnis konnte durch die quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestätigt werden (Tabelle 3). Zusammengenommen ergeben die Daten einen starken Hinweis darauf, dass es sich bei dem in Abbildung 23 gezeigten Bindemotiv tatsächlich um die Erkennungssequenz für Rua1 handelt.

## 2.3 Die antibiotische Wirkung der Ustilaginsäure

Ustilaginsäure besitzt eine toxische Wirkung gegenüber anderen Mikroorganismen, darunter auch der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Teichmann, 2005). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, wie sich die verschiedenen Ustilaginsäurederivate, die von den einzelnen Mutanten produziert werden, hinsichtlich ihrer antibiotischen Wirksamkeit voneinander unterscheiden. So könnte es sein, dass die Ustilaginsäuren aufgrund der erheblichen Veränderungen der Struktur in ihrer antibiotischen Aktivität eingeschränkt sind, oder diese völlig verlieren.

### 2.3.1 Toxische Wirkung der veränderten Ustilaginsäuren auf *S. cerevisiae*

Um die Toxizität der einzelnen *U. maydis* Mutantenstämme auf *S. cerevisiae* zu testen wurden Hefezellen den veränderten Ustilaginsäuren ausgesetzt. Da sich Ustilaginsäure sehr schlecht aufzureinigen lässt, wurden die Hefezellen im Kulturüberstand der einzelnen Mutantenstämme inkubiert. Die Mutantenstämme wurden drei Tage unter Stickstoffmangel-Bedingungen angezogen. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, die Kulturüberstände mit *S. cerevisiae*

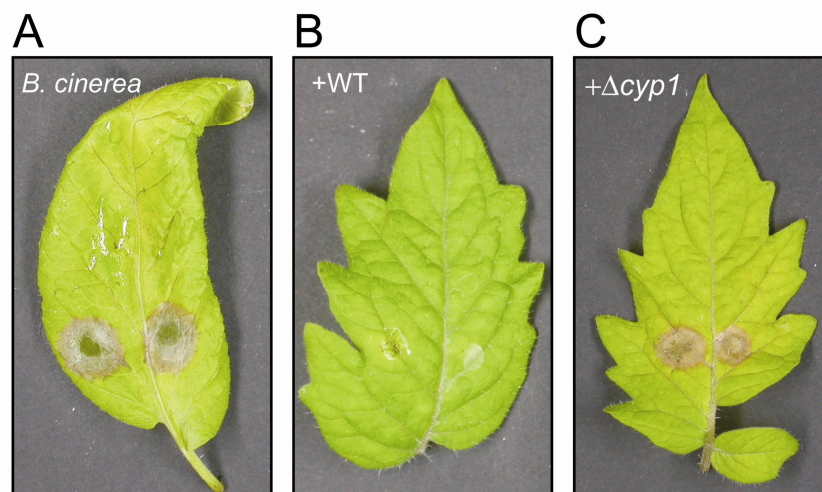


**Abbildung 27: Toxische Auswirkung der *U. maydis* Mutantenstämme auf *S. cerevisiae*.** *S. cerevisiae* Zellen wurden in Kulturüberständen von *U. maydis* für eine Stunde inkubiert und anschließend auf Vollmedium wachsen gelassen (A). Zusammenfassende Darstellung der fehlenden Seitengruppen der verschiedenen Mutantenstämme (B).

Zellen beimpft und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen in verschiedenen Verdünnungen auf eine Vollmediumplatte getropft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Man erkennt deutlich, dass Hefezellen, die Wildtyp-Ustilaginsäuren, ausgesetzt waren, bereits nach einer Stunde vollständig abgetötet waren. Ustilaginsäuren, die von  $\Delta ahd1$  Mutanten produziert werden waren genauso toxisch. Das war nicht weiter verwunderlich, denn UA denen die  $\alpha$ -OH Gruppe an der langen Fettsäurekette fehlt, befinden sich ebenfalls im Wildtypgemisch. Auch das Deletieren der  $\beta$ -OH-Gruppe an der kleinen Fettsäure in  $\Delta uhd1$  Stämmen hatte keinen Einfluss auf die Toxizität der Ustilaginsäure. Dagegen führte jede weitere vorgenommene Veränderung zu einem vollständigen Verlust der Toxizität gegenüber Hefezellen. Besonders interessant ist hierbei, dass das Fehlen der  $\omega$ -1-OH-Gruppe an der langen Fettsäurekette schon ausreicht, um die toxische Wirkung der UA zu zerstören. Dasselbe galt, wenn die Acetyl- oder die Acylgruppe in  $\Delta uat1$  bzw.  $\Delta uat2$  Stämmen entfernt wurden. Auch eine Kombination aus verschiedenen Mutanten ( $\Delta uat2/\Delta uhd1/\Delta ahd1$ ), bei der die Acylgruppe und die  $\alpha$ -OH-Gruppe entfernt worden waren, zeigte keine Toxizität mehr gegenüber *S. cerevisiae*.

### 2.3.2 *U. maydis* als Biocontrol Organismus

Um den Einsatz von chemischen Fungiziden zu reduzieren, werden immer häufiger Mikroorganismen gesucht, die Antibiotika produzieren, um mit deren Hilfe auf natürliche Weise Pflanzenschädlinge zu eliminieren. Diesen Vorgang der Biologischen Schädlingsbekämpfung bezeichnet man auch als „Biocontrol“. Es ist bereits bekannt, dass *Pseudozyma flocculosa*, ein naher Verwandter von *U. maydis* „Biocontrol Aktivität“ gegenüber anderen Mikroorganismen aufweist (Bélanger *et al.*, 1998). Dieser Pilz produziert das Glycolipid Flocculosin, das große Ähnlichkeit zur Ustilaginsäure aufweist (Cheng *et al.*, 2003; Mimee *et al.*, 2005).



**Abbildung 28: *U. maydis* als Biocontrol Organismus.** Es wurde getestet, ob *U. maydis* Biocontrol Aktivität gegenüber *B. cinerea* hat. Typische *B. cinerea* Infektion auf einem Tomatenblatt (A), Inkubation von *B. cinerea* Sporen mit *U. maydis* Zellen verhindert Infektion durch *B. cinerea* (B). Ustilaginsäuredefiziente  $\Delta cyp1$  Stämme sind nicht in der Lage eine Infektion zu verhindern (C).

Es sollte daher getestet werden, ob *U. maydis* ebenfalls als Organismus zur Biokontrolle von Pflanzenkrankheiten eingesetzt werden kann. Als Testorganismus wurde der Ascomycet *Botrytis cinerea* verwendet. *B. cinerea* ist der Verursacher der sogenannten Grauschimmelfäule. Er hat ein breites Wirtsspektrum und befällt unter anderem verschiedene Obst- und Gemüsepflanzen. Es sollte untersucht werden, ob *U. maydis* in der Lage ist, eine Infektion durch *B. cinerea* zu verhindern. Um dies zu testen, wurden Tomatenblätter mit einer Mischung aus *B. cinerea* Sporen und *U. maydis* Zellen, die zuvor 4 Tage unter Stickstoffmangelbedingungen angezogen worden



waren, infiziert. Abbildung 28A zeigt typische, nekrotische Läsionen einer *B. cinerea* Infektion auf einem Tomatenblatt. Wurden *B. cinerea* Sporen mit *U. maydis* Sporidien gemischt, konnte keine Infektion mehr beobachtet werden (Abbildung 28B). Dies zeigt, dass *U. maydis* tatsächlich eine *B. cinerea* Infektion verhindern kann. Interessanterweise konnten  $\Delta cyp1$  Zellen, die keine Ustilaginsäure mehr produzieren, eine Infektion durch *B. cinerea* nicht verhindern (Abbildung 28C). Dies bedeutet, dass die Ustilaginsäure die entscheidende Komponente für die antagonistische Wirkung des Pilzes ist.

## 3. Diskussion

### 3.1 Charakterisierung eines Genclusters für das Glycolipid Ustilaginsäure

Sowohl bei pro-, als auch bei eukaryotischen Mikroorganismen sind Gene, die für die Synthese von Sekundärmetaboliten kodieren, häufig in Genclustern angeordnet. In vielen Fällen werden diese Gencluster durch einen eigenen Transkriptionsfaktor reguliert, der unter bestimmten Umweltbedingungen angeschaltet wird. Insbesondere Nährstoffmangel, Austrocknung des Habitats oder andere Stressfaktoren können die Produktion von Virulenzfaktoren oder die Synthese von unterschiedlichen Sekundärmetaboliten, wie z.B. Antibiotika auslösen. Diese dienen dann dazu, den Organismus zu schützen und andere Mikroorganismen am Wachstum zu hindern, um sich selbst die verbleibenden Nährstoffe zu sichern.

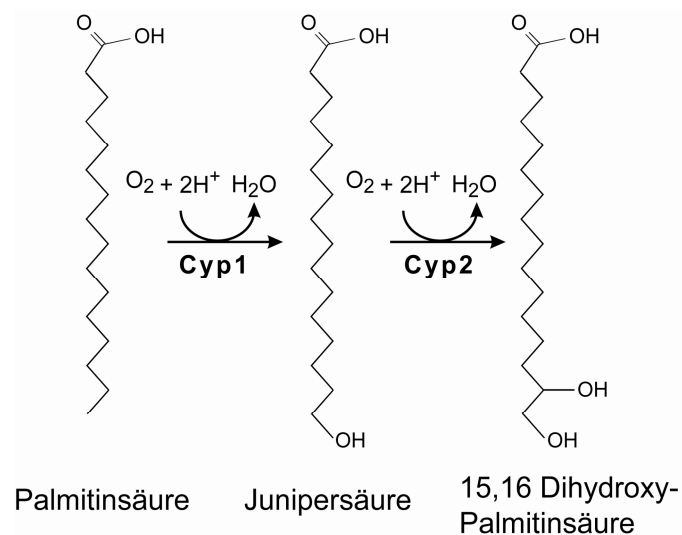
Unter Stickstoffmangelbedingungen produziert *U. maydis* als Sekundärmetabolite zwei Arten von Glycolipiden, das Cellobioselipid Ustilaginsäure und Mannosylerythritollipide. Eine mögliche Funktion der antibiotisch wirksamen Ustilaginsäuren ist vermutlich die Inhibition konkurrierender Mikroorganismen unter Nährstoffmangelbedingungen sein. Da Ustilaginsäure zwar von *U. maydis*, ansonsten aber nur von wenigen anderen Mikroorganismen abgebaut werden kann, könnte es außerdem als Reservekohlenstoffquelle dienen. Die biologische Funktion der MELs konnte bisher noch nicht endgültig geklärt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, den kompletten Biosyntheseweg der Ustilaginsäure aufzuklären. Mit Hilfe von Deletionsanalysen und biochemischen Ansätzen sollten alle Gene des Genclusters analysiert werden, um die Funktion der Enzyme den einzelnen Reaktionsschritten während der Biosynthese zuordnen zu können. Des Weiteren sollte der Transkriptionsfaktor charakterisiert werden, der für die Regulation des Genclusters verantwortlich ist.

### 3.1.1 Cyp1 und Cyp2 hydroxylieren die langkettige Fettsäure

Der erste Schritt in der Synthese der Ustilaginsäuren wird durch die beiden Cytochrom P450 Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 katalysiert. Eine Deletion von *cyp1* führt dazu, dass diese Stämme nicht mehr in der Lage sind, Ustilaginsäuren zu produzieren. Durch Zugabe von Junipersäure (16-Hydroxypalmitinsäure) als Kohlenstoffquelle konnten *cyp1* Deletionsstämme, wieder Ustilaginsäuren produzieren, während die Zugabe von Palmitinsäure zum Medium nicht zur Synthese von Ustilaginsäure führte. Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Fettsäuren ist die endständige Hydroxylgruppe, die in Junipersäure vorhanden ist. Daraus kann geschlossen werden, dass Cyp1 für die terminale Hydroxylierung der langen Fettsäurekette verantwortlich ist. Sequenzvergleiche mit Proteinen anderer Organismen zeigten, dass Cyp1 hohe Sequenzähnlichkeit zu Cytochrom P450 Monooxygenasen der Cyp94A Familie aufweist, insbesondere zu Cyp94A1 und Cyp94A2 aus *Vicia sativa* (Teichmann, 2005). Diese beiden Enzyme sind zu 58% identisch und hydroxylieren langkettige Fettsäuren. Für Cyp94A1 ist bekannt, dass sie Fettsäureketten der Länge C18 terminal hydroxyliert, während Cyp94A2 für die  $\omega$ ,  $\omega-1$  und  $\omega-2$ -Hydroxylierung von Laurylsäure (C12), Myristinsäure (C14) und Palmitinsäure (C16) zuständig ist (Le Bouquin *et al.*, 1999; Pinot *et al.*, 1999). Hierbei fällt auf, dass vorzugsweise die C12-Position der Fettsäure hydroxyliert wird, unabhängig von der Länge der Fettsäurekette. Dies spricht dafür, dass Cyp94A2 die Fettsäure von der Carboxylgruppe aus erkennt und von dort aus immer das zwölfte Kohlenstoffatom hydroxyliert. Cyp94A1 dagegen hydroxyliert ausschließlich die terminale Position, erkennt daher vermutlich die Fettsäure von der der Carboxylgruppe entgegengesetzten Position. Die Substratspezifität von Cyp1 scheint ähnlich zu sein, wie die von Cyp94A1, denn Cyp1 hydroxyliert ausschließlich die  $\omega$ -Position von Fettsäuren. Ob außer Palmitinsäure noch weitere Fettsäuren wie beispielsweise Myristinsäure (Tetradecansäure) oder Stearinsäure (Oktadecansäure) hydroxyliert werden können, konnte bisher nicht gezeigt werden. Um dies zu klären, könnte man *U. maydis* in einem Fütterungsversuch diese Fettsäuren als Kohlenstoffquelle anbieten um dann zu sehen, ob der Pilz daraus Ustilaginsäure mit einer C14er oder C18er Fettsäurekette synthetisiert.

Demgegenüber zeigte die Deletionsanalyse von *cyp2*, dass diese Mutanten Derivate der Ustilaginsäure produzieren, die hydrophober sind, als die vom Wildtyp synthetisierten. Durch massenspektrometrische Analysen konnte ermittelt werden, dass Cyp2 die Übertragung der subterminalen Hydroxylgruppe auf die lange Fettsäurekette katalysiert. Sequenzvergleiche mit Proteinen anderer Organismen zeigen, dass Cyp2 starke Homologie zu Cyp3A5 aus *H. sapiens* aufweist. Cyp3A5 gehört zusammen mit Cyp3A4, Cyp3A7 und Cyp3A43 zur Cyp3A Familie, die beim Menschen hauptsächlich in der Leber vorkommt und dort für Detoxifikationsreaktionen zuständig ist (Williams *et al.*, 2002). Die Cyp3A Familie zeichnet sich durch einen hohen Polymorphismus aus. Durch einzelne Nukleotidaustausche kommt es zur Bildung einer Vielzahl an Cyp3A Varianten, die verschiedene Substrate erkennen und hydroxylieren (Lamba *et al.*, 2002). Es war daher schwer, aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität von Cyp3A Enzymen eine Voraussage für die Funktion von Cyp2 zu machen. In massenspektrometrischen Analysen wurde jedoch deutlich, dass in *cyp2* Deletionsstämmen die  $\omega$ -1-Hydroxylgruppe der langen Fettsäure fehlt.



**Abbildung 29: Reaktionsmechanismus von Cyp1 und Cyp2..** Cyp1 hydroxyliert die terminale Position der Palmitinsäure, Cyp2 die subterminale.

Möglicherweise hydroxyliert zunächst Cyp1 die Fettsäure an der terminalen Position und erst anschließend Cyp2 die subterminale (Abbildung 29).  $\Delta cyp2$  Mutanten synthetisieren UAs, denen die Hydroxylgruppe an der subterminalen

Position fehlt, was darauf schließen lässt, dass eine Hydroxylierung durch Cyp1 nicht von dem Vorhandensein einer subterminalen OH-Gruppe abhängig sein kann. Im Fütterungsversuch mit Junipersäure sieht man hauptsächlich UA Banden, denen die subterminale Hydroxylgruppe fehlt (Abbildung 7 mit Sternchen markiert). Aber es fällt auf, dass außerdem Ustilaginsäurebanden auftauchen, die diese OH-Gruppe tragen (Abbildung 7 mit Pfeilspitzen markiert). Das bedeutet, dass Cyp2, die im Fütterungsversuch zugesetzte Junipersäure weiter hydroxylieren kann, eine terminal hydroxylierte Fettsäure daher vermutlich das Substrat ist. Dagegen spricht allerdings, dass im Fütterungsversuch die Wildtypbanden in wesentlich geringeren Konzentrationen auftreten, als Ustilaginsäuren, denen die  $\omega$ -1-Hydroxylgruppe fehlt. Eine terminal hydroxylierte Fettsäure, wird vermutlich sofort glycosyliert, und kann dann von Cyp2 nicht mehr als Substrat erkannt werden. Ein geringer Teil der zugesetzten Junipersäure wurde vorher noch von Cyp2 hydroxyliert, was die geringe Menge an Ustilaginsäuren erklärt, die im Fütterungsversuch die  $\omega$ -1-Hydroxylgruppe tragen. Eine weitere Vermutung könnte daher sein, dass Cyp1 und Cyp2 im Komplex arbeiten und gleichzeitig die Fettsäurekette hydroxylieren.

### 3.1.2 Die Glycosyltransferase Ugt1 überträgt die Zuckereinheit auf die Fettsäurekette

Der nächste Schritt in der Biosynthese der UAs wird durch die Glycosyltransferase Ugt1 durchgeführt. Ugt1 zeigt hohe Sequenzähnlichkeit zu UDP-Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus.

Interessanterweise enthält das UA-Biosynthesegencluster nur eine einzige Glycosyltransferase, für die Bildung der Cellobiose bei der Biosynthese der UA müssen aber zwei Glucosemoleküle auf die Fettsäure übertragen werden. Daher stellt sich die Frage, ob Ugt1 beide Glycosylierungsschritte durchführen kann, oder ob es eine weitere Glycosyltransferase gibt, die für einen der beiden Schritte verantwortlich ist. Da eine Deletion von *ugt1* dazu führt, dass keine UAs mehr produziert werden können, ist Ugt1 vermutlich für die Übertragung des ersten Glucosemoleküls verantwortlich. Anderenfalls müsste man in  $\Delta$ *ugt1* Mutanten Zwischenprodukte finden, die nur ein Zuckermolekül tragen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Ugt1 beide Zuckermoleküle hintereinander auf die Fettsäure überträgt. Solch eine sequenzielle Glycosylierungsreaktion konnte bereits in anderen Mikroorganismen beobachtet werden. So ist für eine Glycosyltransferase aus *Candida bogoriensis* beschrieben, dass sie für den Transfer von zwei Glucosemolekülen auf ein Substrat zuständig ist. *C. bogoriensis* produziert ein Sophoroselipid, bei dem durch ein Enzym, zunächst ein UDP-Glucosemolekül auf 13-Hydroxy-docosansäure (HDA), übertragen wird. Im nächsten Schritt wird dann durch dasselbe Enzym eine weitere Glucoseeinheit auf Glc-HDA übertragen, so dass das Endprodukt Sophorose-HDA (Glc<sub>2</sub>-HDA) entsteht (Breithaupt and Light, 1982).

In einigen Bakterienstämmen und auch in Pflanzen findet man ebenfalls Glycosyltransferasen, die mehrere Zuckermoleküle hintereinander auf ein Substrat übertragen können. So konnte für *A. tumefaciens* und *B. subtilis* gezeigt werden, dass sie Glycosyltransferasen besitzen, die bis zu vier Galactose- bzw. Glucoseeinheiten auf Diacylglycerol übertragen (Hölzl *et al.*, 2005; Jorasch *et al.*, 1998).

Ob Ugt1 ebenfalls schrittweise die beiden Zuckermoleküle auf die Fettsäure überträgt, muss noch genau geklärt werden. Dazu wäre es sinnvoll die Glycosyltransferase biochemisch aufzureinigen, um *in vitro* den Reaktionsmechanismus beobachten zu können. Im Testsystem sollten dann als Substrate Junipersäure und UDP-Glucose eingesetzt werden. Ein aus den Substraten hergestelltes Glycolipid könnte dann mit Ethylacetat extrahiert und mittels massenspektrometrischer Analysen analysieren werden.

Interessanterweise scheint Ugt1 keine sehr hohe Substratspezifität zu besitzen. Die Fütterungsversuche mit 15-Hydroxypentadekansäure, 12-Hydroxydodekansäure und Aleuritinsäure haben gezeigt, dass Ugt1 alle diese Fettsäuren glycosylieren kann. Wichtig scheint nur zu sein, dass die Fettsäure eine endständige Hydroxylgruppe trägt. Diese geringe Substratspezifität könnte darauf hindeuten, dass Ugt1 sowohl in der Lage ist, den Glucoserest auf die terminale OH-Gruppe der Hydroxyfettsäure, als auch auf die 4' OH-Gruppe der einfach glycosylierten Fettsäure zu übertragen.

### 3.1.3 Die Fettsäuresynthase Fas2 wird für die Synthese der kurzkettigen Fettsäureseitenketten benötigt.

Im Genom von *U. maydis* finden sich zwei Gene, die für Fettsäuresynthasen kodieren. Die eine, Fas1, ist für den Primärstoffwechsel zuständig und wurde bereits von J. Cajan näher untersucht (Cajan, 2008; Leibundgut *et al.*, 2007). Eine Deletion von *fas1* ist letal, kann aber durch Supplementation von Myristylsäure und Tween40 (Polyoxyethylene Sorbitan Monopalmitate) komplementiert werden (Cajan, 2008).

Im Ustilaginsäure Gencluster findet sich ein sehr langer ORF ohne Introns, der ebenfalls für eine Fettsäuresynthase kodiert. Da diese Fettsäuresynthase Fas2 nur unter UA-Produktionsbedingungen exprimiert wird, wurde deshalb vermutet, dass sie ausschließlich an der Synthese der Ustilaginsäure beteiligt ist. Interessanterweise finden sich bei anderen Mikroorganismen, die Sekundärmetabolite synthetisieren, häufig zusätzliche Fettsäuresynthasen. So konnte gezeigt werden, dass *A. nidulans* zwei funktionell völlig unterschiedliche FAS besitzt. Die eine FAS synthetisiert die langkettigen Fettsäuren, die für den Primärstoffwechsel benötigt werden und die andere produziert kürzere Fettsäuren der Länge C6, die für die Synthese von Sterigmatocystin dienen (Brown *et al.*, 1996a).

Man unterscheidet zwei Arten von Fettsäuresynthasen. Die meisten Bakterien und Pflanzen besitzen eine FAS vom TypII System, bei dem sich der Multienzymkomplex aus sieben einzelnen Proteinen zusammensetzt. Bei allen anderen Eukaryoten sind die funktionellen Einheiten der FAS in einem oder zwei Multidomänenproteinen angeordnet, die man als TypI System bezeichnet. Vom TypI System gibt es zwei Arten: Säugetiere besitzen eine FAS, die auf einer einzigen Polypeptidkette alle katalytischen Zentren vereinigt, während sie bei Pilzen auf zwei Polypeptidketten, der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette angeordnet sind.

Vergleicht man die Proteinsequenzen der Fettsäuresynthasen Fas1 und Fas2 aus *U. maydis* mit der anderer Organismen, so fällt auf, dass sie zwar homolog zu der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette der anderen pilzlichen Fettsäuresynthasen sind, aber nur aus einer Polypeptidkette bestehen, die alle katalytischen Zentren enthält. Die Anordnung der beiden Ketten innerhalb dieses Moleküls sieht so aus, dass N-terminal die  $\beta$ -Kette und C-terminal die  $\alpha$ -Kette lokalisiert ist

(Abbildung 12). Sie ähneln daher interessanterweise eher der FAS aus Säugertieren als der aus Pilzen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass Fas2 keine Phosphopantethenyltransferasendomäne (PPT) besitzt. Das Acyl-Carrier-Protein (ACP), das als Trägerprotein für die wachsende Fettsäurekette dient, besitzt als prosthetische Gruppe eine Phosphopantetheingruppe, die die wachsende Fettsäurekette am Komplex fixiert und sie von einem aktiven Zentrum zum nächsten befördert. Dieses Phosphopantethin wird von der kurzen C-terminalen PPT-Domäne auf das ACP übertragen (Schweizer and Hofmann, 2004), was die Frage aufwirft, wie in Fas2 diese Reaktion bewerkstelligt wird. Es ist möglich, dass das Phosphopantethin durch ein anderes Enzym übertragen wird, entweder durch die PPT von Fas1 oder von einem weiteren PPT-ähnlichen Protein aus *U. maydis*. Um dies zu testen, könnte man untersuchen, ob *fas1* Deletionsmutanten noch in der Lage sind, Ustilaginsäure zu produzieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fas2 für die Synthese der kurzen Fettsäurekette verantwortlich ist. Sie synthetisiert wahlweise eine Hexan- oder eine Oktansäure und erfüllt damit eine ähnliche Funktion wie die FAS aus *A. nidulans*, die für die Synthese von Sterigmatocystin verantwortlich ist.

### **3.1.4 Die beiden Acyltransferasen Uat1 und Uat2 sind für die Acetylierung, bzw. Acylierung der Cellobioseeinheit verantwortlich**

Im nächsten Schritt der UA Biosynthese werden die Zuckereinheiten modifiziert. Hierbei wird der erste Zucker acetyliert und der zweite mit einer  $\beta$ -Hydroxyfettsäurekette der Länge C6 oder C8 versehen.

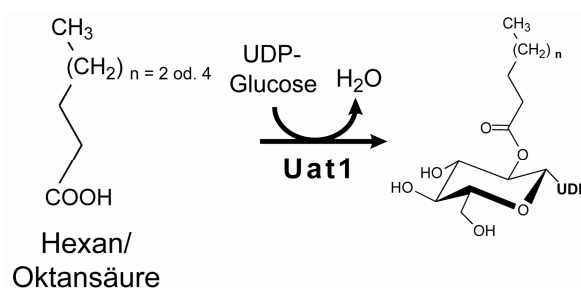
Vergleicht man die Sequenz von Uat1 mit der anderer Proteine, so fällt auf, dass Uat1 ein Sequenzmotiv besitzt, welches typisch für Acyltransferasen der BAHD-Superfamilie ist. Enzyme dieser Familie findet man hauptsächlich in Pflanzen, wo sie häufig an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten, wie z.B. verschiedener Alkaloide beteiligt sind. Ein solches Alkaloid ist beispielsweise Capsaicin, welches für die Schärfe in Paprika oder Chilischoten (*Capsicum* ssp.) verantwortlich ist. Während der Biosynthese von Capsaicin spielt die Acyltransferase *Pun1* eine entscheidende Rolle. In homozygot, rezessiven *pun1*-



Pflanzen werden keine Capsaicinoide gebildet und die Paprika enthält keine Schärfe (Stewart *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2007).

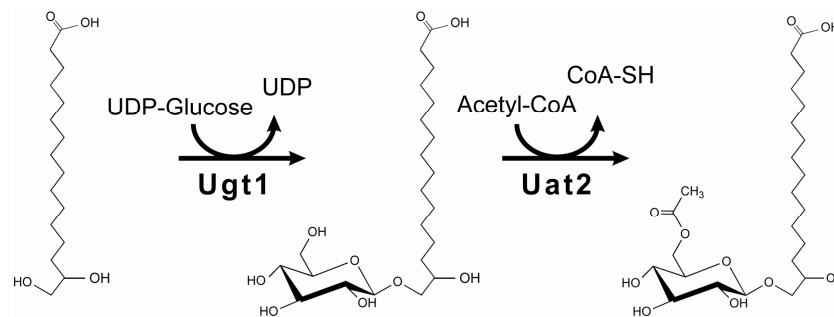
Enzyme der BAHD-Superfamilie besitzen ein kurzes, sehr konserviertes Motiv mit der Sequenz HXXXDG und DFGWGKP. Die homologe Sequenz aus Uat1 lautet: **HWLVDF** und **DFGEKLGKP**. Sie zeigt nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu dem charakterisierten Motiv der BAHD-Superfamilie. Interessanterweise konnte aber gezeigt werden, dass innerhalb des HXXXDG Motivs das Histidin eine essentielle Aminosäure ist. Mutiert man das Histidin der Acetyltransferase DAT aus *Catharanthus roseus*, so verliert das Enzym seine Funktion. DAT ist für den letzten Schritt der Vindolinbiosynthese verantwortlich, ein Alkaloid, das in der Medizin als Chemotherapeutikum eingesetzt wird (St-Pierre *et al.*, 1998). Uat1 besitzt zwar nicht das vollständige Motiv der BAHD-Superfamilie, die entscheidende Aminosäure, das Histidin, ist aber vorhanden. Um charakterisieren zu können, ob Uat1 tatsächlich der BAHD-Superfamilie angehört, wäre es daher interessant, das homologe Motiv zu mutieren, indem man beispielsweise ebenfalls das Histidin gegen eine andere Aminosäure austauscht. Würde Uat1 daraufhin seine Funktion verlieren, so könnte angenommen werden, dass es sich bei dem Motiv tatsächlich um die konservierte Sequenz dieser Familie handelt.

Dass es sich bei Uat1 um eine Acyltransferase handelt, konnten die massenspektrometrischen Untersuchungen zeigen. Uat1 ist für die Acylierung des zweiten Zuckermoleküls verantwortlich (Abbildung 30). In der massenspektrometrischen Analyse von  $\Delta uat2$  Mutanten findet man ausschließlich UA-Vorstufen, bei denen der zweite Zucker bereits mit einer Acylgruppe verestert ist. Daher wird vermutet, dass zunächst Uat1 die kleine



**Abbildung 30: Reaktionsmechanismus von Uat1.** Uat1 überträgt die kurze Fettsäurekette auf ein Glucosemolekül.

Fettsäure auf UDP-Glucose überträgt, bevor Ugt1 diese acylierte UDP-Glucose dann mit der UA-Vorstufe verknüpft.



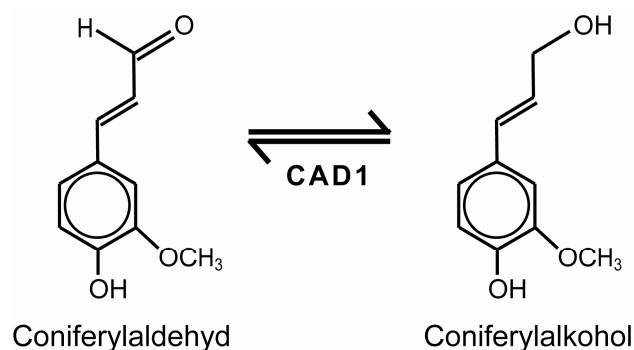
**Abbildung 31: Reaktionsmechanismus von Uat2.** Uat2 acetyliert das durch Ugt1 übertragene erste Glucosemolekül.

Uat2 zeigt keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Uat2 um eine Acetyltransferase handelt, die das erste Zuckermolekül mit einer Acetylgruppe belädt (Abbildung 31). Da man UA-Vorstufen findet, die unmodifizierte Zuckermoleküle an der ersten Position tragen (Abbildung 14C), wird vermutet, dass zunächst Ugt1 die Fettsäure mit einem Glucosemolekül belädt, welches dann durch Uat2 acetyliert wird. Wäre das acetylierte Glucosemolekül das Substrat für Ugt1, sollte man eine Fettsäure, die mit einem unmodifizierten Glucosemolekül beladen ist, nicht als Zwischenprodukt finden können. Für Ugt1 scheint demnach unmodifizierte UDP-Glucose das erste Substrat zu sein während im zweiten Schritt acylierte Glucose benutzt wird. Es erscheint verwunderlich, dass Ugt1 zwei so unterschiedliche Moleküle als Substrate erkennen soll. Wie aber bereits schon im Kapitel über die Ugt1 diskutiert wurde, erkennt sie ebenfalls unterschiedliche Fettsäuren als Substrate. Daher könnte es durchaus möglich sein, dass sie auch verschieden modifizierte UDP-Glucosemoleküle erkennt.

In der massenspektrometrischen Analyse der  $\Delta uat2$  Mutante findet sich eine UA-Vorstufe mit der Masse  $m/z$  603.3354, der fälschlicherweise die acylierte UDP-Glucose als erste Zuckereinheit angehängt wurde. Interessanterweise findet sich aber keine Masse, bei der an diese Form eine zweite Glucoseeinheit übertragen wurde. Das spricht dafür, dass die acylierte Glucoseform ein Signal für Ugt1 sein könnte, keine weiteren Glucosemoleküle mehr zu anhängen. So wird sichergestellt, dass die fertige Ustilaginsäure nur Cellobiose enthält.

### 3.1.5 Die Hydroxylasen Ahd1 und Uhd1 hydroxylieren die Ustilaginsäure an zwei unterschiedlichen Positionen

Die Sequenz von Uhd1 zeigt starke Homologie zur Familie der NAD(P)H abhängigen Oxidoreduktasen. Innerhalb dieser Familie weist Uhd1 starke Ähnlichkeit zu pflanzlichen und pilzlichen Dehydrogenasen, insbesondere der NADPH abhängigen Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD1) aus *N. tabacum* auf. CAD1 ist für den letzten Schritt der Coniferylalkoholsynthese, einem Bestandteil von Lignin, zuständig. Bei dieser Reaktion wird ein Aldehyd zu einem Alkohol reduziert (Abbildung 32) (Damiani *et al.*, 2005).



**Abbildung 32: Reaktion der Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase CAD1 aus *N. tabacum*.** CAD1 reduziert Coniferylaldehyd zu Coniferylalkohol. Die Abbildung wurde verändert aus (Damiani *et al.*, 2005) übernommen.

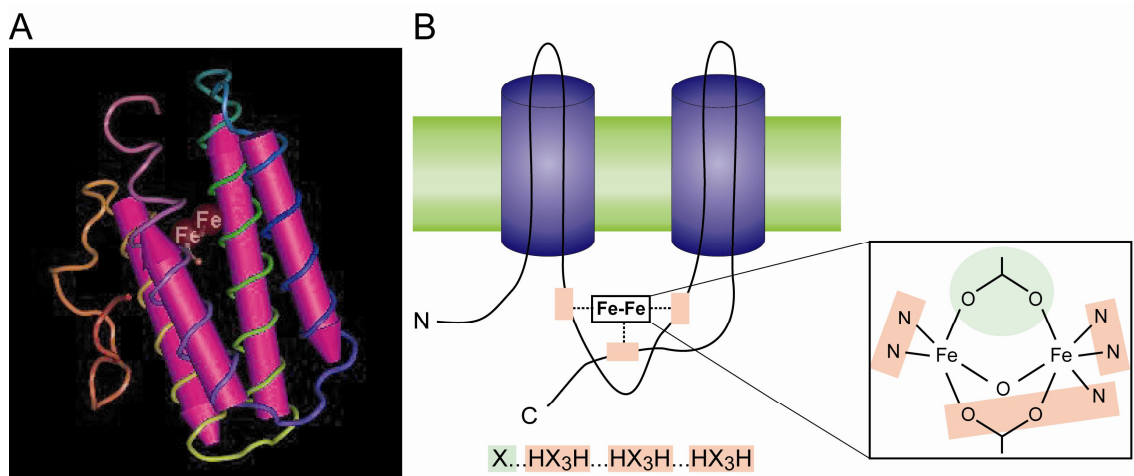
Für eine ähnliche Reaktion ist eine NADPH abhängige Aldehydreduktase (VR-ERE) aus *Vigna radiata* verantwortlich. Mit Hilfe dieses Enzyms ist die Pflanze in der Lage, ein pilzliches Toxin (Eutypin) unschädlich zu machen. Durch Umwandlung von Eutypin zu Eutypinol verliert das Toxin seine Wirksamkeit und ist für die Pflanze nicht mehr schädlich. Auch in diesem Fall kommt es NADPH abhängig zu einer Reduktion einer Aldehydgruppe zu einem Alkohol (Guillen *et al.*, 1998).

Uhd1 überträgt die Hydroxylgruppe auf die  $\beta$ -Position der kurzen Fettsäure. Der genaue Reaktionsmechanismus ist aber noch unklar. Wenn Uhd1 wie CAD1 oder VR-ERE wirken würde und für die Reduktion einer  $\beta$ -Ketogruppe in einen Alkohol verantwortlich wäre, würde sich die Frage stellen, welches Enzym dann für das Einführen der Ketogruppe verantwortlich ist. Da ein solches Enzym innerhalb des Genclusters nicht charakterisiert werden konnte, könnte man vermuten, dass Uhd1 wie Cyp1 oder Cyp2 als Hydrogenase wirkt

und die Fettsäurekette einfach hydroxyliert. Dafür spricht außerdem, dass in  $\Delta uhd1$  Mutanten die kleine Fettsäure unmodifiziert angehängt wird, wäre Uhd1 für die Reduktion einer Ketogruppe verantwortlich, müsste die kleine Fettsäure in  $\Delta uhd1$  Mutanten eine Ketogruppe tragen.

Interessanterweise sind alle UA-Vorstufen, die man in  $\Delta uat2$  Mutanten findet und die die kleine Fettsäurekette tragen, an der  $\beta$ -Position hydroxyliert. Dies lässt darauf schließen, dass Uhd1 die Fettsäure modifiziert, bevor das acylierte Zuckermolekül durch Ugt1 angehängt wird. Da in  $\Delta uhd1$  Mutanten Uat1 die kurze Fettsäurekette ohne  $\beta$ -OH-Gruppe auf UDP-Glucose übertragen kann, liegt die Vermutung nahe, dass Uhd1 die Fettsäure erst hydroxyliert, wenn sie bereits auf das Glucosemolekül übertragen wurde. Um dies zu überprüfen, könnte man Uhd1 biochemisch aufreinigen und dem Enzym Hexan- bzw. Oktansäure bzw. deren aktivierte Formen (Hexanoyl-CoA oder Oktanoyl-CoA) als Substrat anbieten. Würde die Fettsäure hydroxyliert, könnte man einerseits davon ausgehen, dass Uhd1 allein für die Reaktion verantwortlich ist, und dass Uhd1 in der Reihenfolge doch vor Uat1 wirkt.

Ahd1 gehört zur Familie der Nicht-Häm Eisenproteine. Mitglieder dieser Familie findet man in einer Vielzahl an Organismen, beispielsweise Hämerythrin, das respiratorische Blutprotein von Invertebraten oder die Methan Monooxygenase aus methanotrophen Bakterien gehören dazu (Sanders-Loehr *et al.*, 1989). Die Reaktionen, die durch Enzyme dieser Familie katalysiert werden, sind Hydroxylierung, Demethylierung, Desaturierung, Epoxidierung oder Acetylierung von hydrophoben Substraten. Das Reaktionszentrum dieser Enzyme besteht aus einem zweikernigen durch Aminosäuren koordiniertem Eisenzentrum, mit einem Sauerstoff als Liganden (Abbildung 33B (kleiner Kasten)). Dieses Cluster liegt eingebettet in einer Polypeptidkette mit einer Sekundärstruktur, die aus vier  $\alpha$ -Helices gebildet wird (Abbildung 33A). Die Primärstruktur des Proteins enthält ein konserviertes histidinreiches Motiv ( $HX_{(3 \text{ oder } 4)}H$ ,  $HX_{(2 \text{ oder } 3)}HH$  und  $HX_{(2 \text{ oder } 3)}HH$ ), welches für die Koordination der beiden Eisenatome verantwortlich ist (Shanklin *et al.*, 1994). Des Weiteren enthält die Polypeptidsequenz mehrere hydrophobe Domänen, die als Transmembrandomänen wirken und das Protein in der Membran Endoplasmatischen Retikulums verankern (Abbildung 33B).

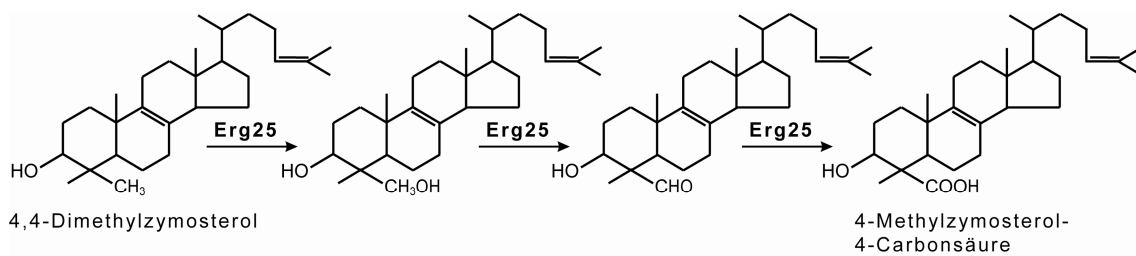


**Abbildung 33: Struktur von Nicht-Häm-Dieisenproteine.** Sekundärstruktur von Hämerythrin, einem typischen Nicht-Häm-Dieisenprotein (A). Die Polypeptidsequenz enthält mehrere hydrophobe Domänen, die als Transmembrandomänen wirken, die histidinreichen Motive sind rosa markiert. Das Reaktionszentrum besteht aus einem zweikernigen durch sechs Histidine (rosa unterlegt) und einer variablen Aminosäure (grün unterlegt) koordiniertem Eisenzentrum, mit einem Sauerstoff als Liganden (B). Die Abbildung wurde verändert aus (Shanklin *et al.*, 1994) und (Sanders-Loehr *et al.*, 1989) übernommen.

Ahd1 besitzt das für Nicht-Häm-Dieisenproteine typische histidinreiche Motiv, sowie vier hydrophobe Bereiche die als Transmembrandomänen wirken. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ahd1 für die Übertragung der  $\alpha$ -Hydroxylgruppe auf die lange Fettsäurekette verantwortlich ist.

Proteine dieser Familie sind für Demethylierungsreaktionen, also das Entfernen von Methylgruppen, zuständig sind (Darnet and Rahier, 2004). Für ein verwandtes Protein aus *S. cerevisiae* (Erg25) konnte gezeigt werden, dass diese Demethylierung in verschiedenen Stufen abläuft. Erg25 ist an der Bioynthese von Ergosterol, einem wichtigen Bestandteil pilzlicher Zellmembranen, beteiligt und entfernt hierbei eine Methylgruppe des Zwischenproduktes 4,4-Dimethylzymosterol. In der ersten Stufe entsteht an der C-4 $\alpha$  Gruppe ein Alkohol, der dann zunächst zu einer Aldehyd- und anschließend zu einer Carboxylgruppe aufoxidiert wird (Abbildung 34) (Bard *et al.*, 1996).

Es wäre daher zu vermuten, dass Ahd1 einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie Erg25 hat, allerdings nur bis zur ersten Stufe oxidiert, bei der eine Hydroxylgruppe entsteht.

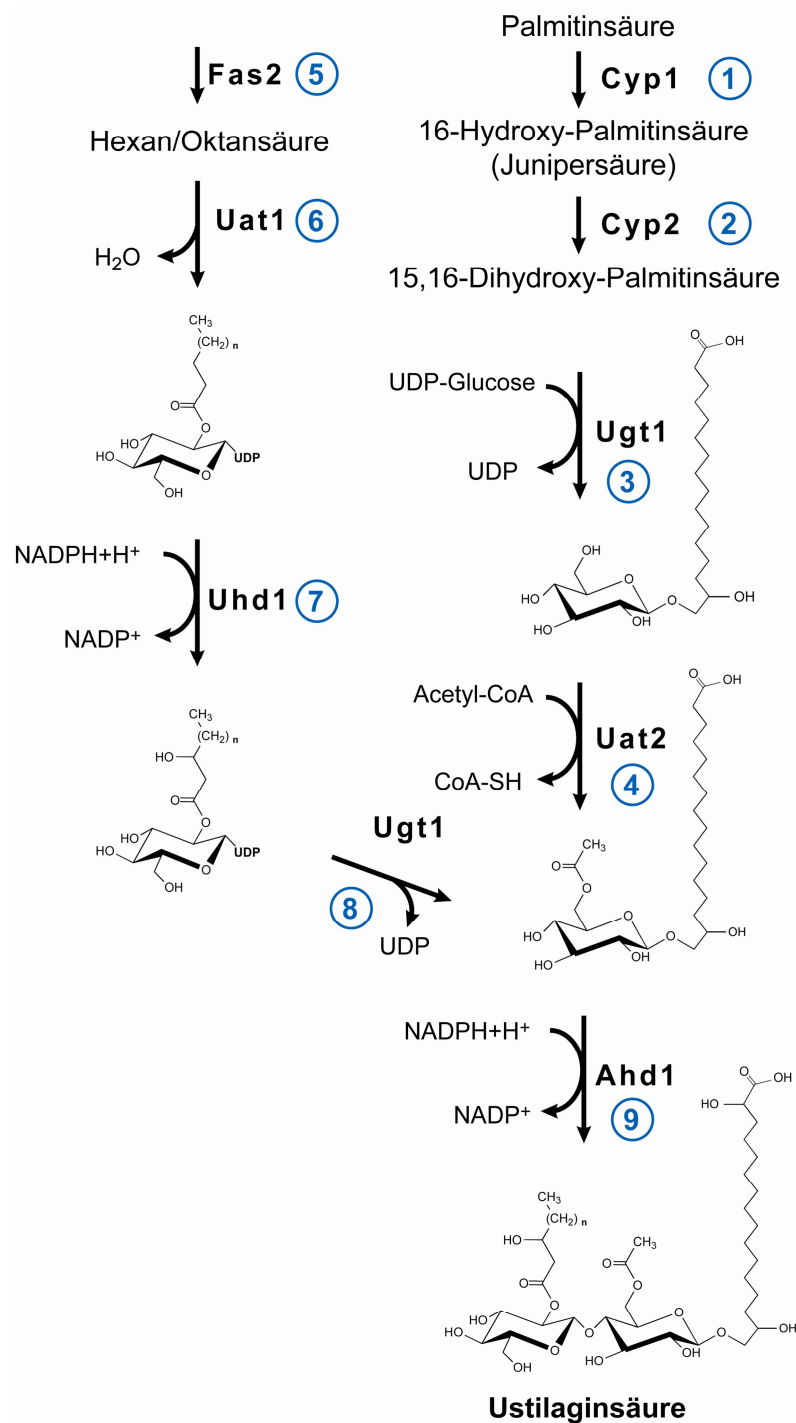


**Abbildung 34: Entfernung einer Methylgruppe durch Erg25.** Die Sterol-Methyl-Oxidase Erg25 aus *S. cerevisiae* ist für Demethylierungsreaktionen während der Ergosterolbiosynthese verantwortlich. Im Zuge der Demethylierung entsteht zunächst ein Alkohol, dann eine Aldehydgruppe, die dann zu einer Carboxylgruppe aufoxidiert wird. Die Abbildung wurde verändert aus (Bard *et al.*, 1996) übernommen.

Interessanterweise trägt nur etwa die Hälfte der produzierten Ustilaginsäuren die  $\alpha$ -Hydroxylgruppe, was darauf schließen lässt, dass Ahd1 für den letzten Schritt in der Biosynthese der UA verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass fertige UAs zum Teil so schnell ausgeschleust werden, dass Ahd1 nicht mehr in der Lage ist, diese zu hydroxylieren. Interessanterweise finden sich in  $\Delta uat1$  und  $\Delta uat2$  Mutanten, ausschließlich UA-Vorstufen, die an der  $\alpha$ -Position hydroxyliert sind. Hier kommt es anscheinend zu einer deutlichen Verzögerung der Synthese oder des Exports, weshalb Ahd1 hier genügend Zeit bleibt, die Fettsäure zu hydroxylieren.

### 3.1.6 Biosyntheseweg für die Ustilaginsäure

In dieser Arbeit konnten 10 Gene charakterisiert werden, die für die Biosynthese der Ustilaginsäure zuständig sind. Diese Gene liegen in einem gemeinsam regulierten Gencluster. Fasst man die Daten zusammen, so kann man folgenden Biosyntheseweg für die Ustilaginsäure postulieren (Abbildung 35): Die Biosynthese beginnt mit zwei Cytochrom P450 Monooxygenasen, Cyp1 und Cyp2, die Palmitinsäure an der terminalen und subterminalen Position hydroxylieren (1+2). Im nächsten Schritt wird durch die Glycosyltransferase Ugt1 ein Glucosemolekül auf die Fettsäure übertragen (3). Das Glucosemolekül wird an der 6'-Position durch Uat2 acetyliert (4). Die Fettsäuresynthase Fas2 ist für die Synthese einer Hexan- bzw. einer Oktansäure



**Abbildung 35: Biosynthese der Ustilaginsäuren.** Die einzelnen Biosyntheseschritte sind im Text erklärt.

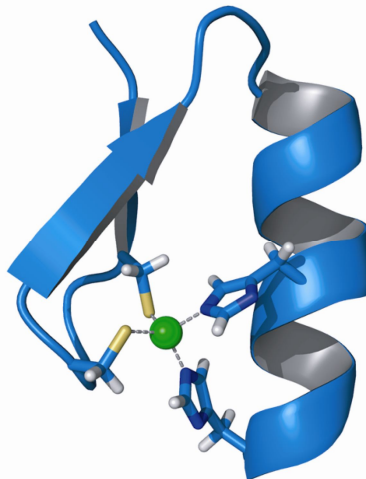
zuständig (5). Diese wird durch die Acyltransferase Uat1 auf ein UDP-Glucosemolekül übertragen (6) und außerdem durch die Oxidoreduktase Uhd1 an der  $\beta$ -Position hydroxyliert (7). Dieses acylierte Zuckermolekül wird vermutlich ebenfalls durch Ugt1 an die UA-Vorstufe angehängt (8). Im letzten Schritt kommt es bei etwa der Hälfte aller UA-Moleküle noch zu einer

Hydroxylierung der  $\alpha$ -Position der langen Fettsäurekette durch Ahd1 (9). Das Gencluster enthält ein weiteres Gen, *atr1*, das für ein Transportprotein der ABC-Transporterfamilie kodiert. Mit Hilfe dieses Transporters, wird die fertige Ustilaginsäure dann vermutlich aus der Zelle geschleust.

## 3.2 Regulation des Genclusters

### 3.2.1 DNA Bindung durch Rua1

In dieser Arbeit wurde der Transkriptionsfaktor Rua1 charakterisiert, der für die Regulation aller Gene des Ustilaginsäureclusters zuständig ist. Rua1 gehört zur Familie der Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfingerproteine. Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfinger sind die häufigsten DNA-Bindemotive eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine enthalten typischerweise eine Reihe tandemartig angeordneter Zinkfinger, die den Kontakt zur DNA herstellen. Ein Zinkfinger besteht aus



**Abbildung 36: Schematische Darstellung eines Zinkfingers.** Ein Zinkfinger setzt sich zusammen aus zwei  $\beta$ -Faltblättern (blaue Pfeile) gefolgt von einer  $\alpha$ -Helix (blaue Spirale). Das Zinkion (grüne Kugel) wird von zwei Cysteinen und zwei Histidinen koordiniert. Die Abbildung wurde von der Homepage [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9c/Zinc\\_finger\\_rendered.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9c/Zinc_finger_rendered.png) übernommen.

etwa 30 Aminosäuren und ist aus zwei  $\beta$ -Faltblättern gefolgt von einer  $\alpha$ -Helix aufgebaut. Über zwei Cysteine innerhalb der  $\beta$ -Faltblätter und zwei Histidine



innerhalb der  $\alpha$ -Helix wird ein Zinkion komplexiert. Über die Koordination des Zinkions und verschiedene hydrophobe Aminosäuren innerhalb des Motifs wird die Stabilität des Zinkfingers gewährleistet (Abbildung 36) (Wolfe *et al.*, 2000).

Rua1 zeigt wenig Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen anderer Organismen. Allerdings findet sich eine signifikante Homologie zur Zinkfingerdomäne aus Meu26, einem Protein aus *S. pombe*, sowie zu einer kleinen Familie weiterer pilzlicher Proteine. Diese Proteine sind bisher nicht näher charakterisiert, für *meu26* konnte lediglich gezeigt werden, dass es während der Meiose exprimiert ist (Watanabe *et al.*, 2001). Dies könnte auf eine ähnliche Funktion für Rua1 hindeuten, da in *S. pombe* die Meiose durch Stickstoffmangel induziert wird.

Rua1 Deletionsstämme sind nicht in der Lage, Ustilaginsäuren zu produzieren, da, aufgrund des Fehlens von Rua1, keines der Biosynthesegene exprimiert wird. Dies zeigt, dass Rua1 an der Regulation des Ustilaginsäureclusters beteiligt ist (Teichmann, 2005). In dieser Arbeit wurde daraufhin das Rua1-Protein näher untersucht. Mit Hilfe des Ein-Hybrid-Systems in *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Rua1 an DNA binden kann und dass die C-terminal konservierte Zinkfingerregion daher als DNA-Bindedomäne wirkt. Allerdings konnte bisher die DNA Bindung von Rua1 nur *in vivo* mit Hilfe des Hefe-Ein-Hybrid-Systems festgestellt werden. Es wäre sicher interessant zu sehen, ob diese Interaktion auch *in vitro* möglich ist. Leider haben Gelretardierungsversuche, mit aufgereinigten Faktoren bisher kein Ergebnis gezeigt.

### 3.2.2 Charakterisierung des Rua1 Bindemotivs

Eukaryotische Promotoren bestehen aus zwei Bereichen. Einem sogenannten Basalpromotor, der in der Nähe des Transkriptionsstarts liegt und nur die allgemeinen Promotorelemente enthält, welche absolut notwendig für die Transkription sind. Hier binden die allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die für die Initiation der Transkription verantwortlich sind. Typische Promotorelemente des Minimalpromotors sind die sogenannte TATA-Box, das Inr-Element („Initiator-Element“), das BRE-Element („TFIIB recognition element“) und das DPE-Element („Downstream Promotor element“) (Kadonaga, 2002;

Novina and Roy, 1996). Diese Elemente sind aber in Pilzen nur schwach konserviert und konnten bisher auch in den Promotorbereichen der Clustergene nicht identifiziert werden.

Zum anderen gibt es spezifische Promotorelemente, welche für die Regulation der Expression bestimmter Gene eine Bedeutung haben. Diese Regulations-elemente können entweder nahe beim Transkriptionsstart liegen, in der Regel einige hundert Basenpaare stromaufwärts (UAS = „upstream activating sequence“) oder wie die sogenannten Enhancer weit entfernt vom Promotor (Nussinov *et al.*, 1986). An sie binden die spezifischen Transkriptionsfaktoren. Zwei gut beschriebene Transkriptionsregulatoren sind die Zinkfingerproteine Sp1 und Zif268, die in Zellen vieler eukaryotischer Organismen vorkommen. Sie besitzen drei Zinkfingerdomänen, deren Kristallstruktur ermittelt wurde (Pavletich and Pabo, 1991). Sp1 bindet in der großen Furche der DNA an sogenannte GC-Boxen und rekrutiert dann über die C-terminal gelegene Aktivierungsdomäne weitere Faktoren der Transkriptionsmaschinerie. Von Zif268 konnte außerdem die Interaktion der Zinkfinger mit der DNA bestimmt werden. Die Erkennungssequenz von Zif268 ist 10 Nukleotide lang, und sehr GC-reich. Innerhalb dieser Sequenz bindet jeder Zinkfinger an genau drei bestimmte Nukleotide mit unterschiedlicher Affinität (Choo, 1998; Elrod-Erickson *et al.*, 1996; Yokono *et al.*, 1998). Mutiert man die drei Zinkfinger von Zif268 an derselben geometrisch identischen Protein-DNA Kontaktstelle, so ist die DNA-Bindeaffinität unterschiedlich stark gestört. Und zwar nimmt die Bindeaffinität in der folgenden Reihenfolge ab: Zinkfinger 2>3>1 (Choo, 1998; Iuchi, 2001).

Die durch Vergleich der Promotorsequenzen und Deletionsanalysen ermittelte Bindestelle für Rua1 in den Promotoren der Clustergene lautet: T<sub>G</sub>/G<sub>T</sub> CGCAT A<sub>T</sub>/C<sub>T</sub> C<sub>T</sub>/G<sub>A</sub> (Abbildung 23). Mutiert man die Bindestelle, so ist Rua1 nicht mehr in der Lage, an die DNA zu binden. Interessanterweise enthalten die Promotoren der Clustergene diese UAS in unterschiedlicher Anzahl. Dies liegt möglicherweise daran, dass einige der Gene stärker exprimiert werden, als andere. So konnte in der 5´untranslatierten Region vor *atr1* das Motiv zweimal identifiziert werden. Mutiert man nur eine der beiden Sequenzen, so kann die andere noch durch Rua1 gebunden werden. Allerdings ist die Expression des LacZ Gens im Hefe-Ein-Hybrid-System um 80% herabgesetzt, was dafür spricht, dass in der Wildtypsituation tatsächlich beide

UAS effektiv benutzt werden. Interessanterweise konnte dies auch für einige Promotoren des Sterigmatocystinclusters aus *A. nidulans* gezeigt werden. Beispielsweise enthält der Promotor vor dem Gen *stcU* drei AflR Bindestellen. Mutiert man nur eine dieser Bindestellen, so ist die Expression dieses Genes um ein vielfaches herabgesetzt (Fernandes *et al.*, 1998).

Welche Aminosäure innerhalb der Zinkfinger welche Nukleotide der UAS binden, konnte bisher noch nicht bestimmt werden. Durch einzelne Nukleotidaustausche innerhalb der Zinkfingerdomäne könnte man analysieren, welche Aminosäuren für die DNA-Bindung benötigt werden. Es konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass eine Mutation eines der Cysteine des zweiten Zinkfingers in der Aminosäuresequenz von Rua1, dazu führt, dass Rua1 die DNA nicht mehr binden kann (Teichmann, 2005). Allerdings ist dies nicht weiter verwunderlich, denn durch diese Mutation wird die Sekundärstruktur des Zinkfingers gestört. Damit zeigt sich aber, dass ein Zinkfinger allein nicht ausreicht um die Funktion von Rua1 aufrecht zu halten.

Abschließend kann gesagt werden, dass es sich bei Rua1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der über die Zinkfingerdomäne an die ermittelte DNA-Sequenz der Clustergene bindet, dort als Aktivator dient und über eine bisher noch uncharakterisierte Aktivierungsdomäne die Transkriptionsmaschinerie rekrutiert.

### 3.2.3 Regulation von Rua1

Mit Hilfe von Microarray Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Rua1 unter Stickstoffmangelbedingungen induziert wird (Teichmann *et al.*, 2007). Wie allerdings Rua1 selbst induziert wird und welche Rezeptoren für die Stickstoffwahrnehmung verantwortlich sind, konnte bisher noch nicht geklärt werden. In *U. maydis* konnte außerdem ein weiterer Transkriptionsfaktor der Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfingerfamilie, Nit1 („nitrogen regulator“), charakterisiert werden (Liu, 2007). Schaltet man dieses Gen aus, so können weder Ustilaginsäuren noch Mannosylerythritollipide, das zweite von *U. maydis* produzierte Glycolipid, gebildet werden. Nit1 zeigt kaum Ähnlichkeit zu anderen Proteinen. Lediglich die Zinkfingerdomäne ist hoch konserviert, sie besitzt starke Ähnlichkeit zur Zinkfingerdomäne von Con7p einem Transkriptions-

faktor aus *Magnaporthe grisea*, dem Erreger des Reisbrandes. Für Con7p konnte gezeigt werden, dass es sich um einen globalen Regulator handelt, der für die Bildung von Appressorien und Pathogenität verantwortlich ist (Odenbach *et al.*, 2007).

Ähnliches konnte für die Regulation der Sekundärmetabolite in Aspergillusstämmen gezeigt werden. In diesem Fall ist der globale Regulator LaeA allerdings eine Methyltransferase, die durch Chromatinmodifikationen die Promotorregionen freilegt, so dass die entsprechenden Gencluster exprimiert werden können (Abbildung 1) (Bok and Keller, 2004; Bok *et al.*, 2006b). Ausgehend von der Hypothese, dass LaeA ein Regulator für sämtliche bekannten und bisher noch unbekanntes Sekundärmetabolitcluster in *A. nidulans* ist, wurde deshalb versucht, durch Überexpression und Deletion von *laeA* weitere Sekundärmetabolitcluster zu finden. Mit Hilfe von Microarray-Analysen wurden dann zusammenhängende Gene ermittelt, die in den jeweiligen Stämmen exprimiert oder reprimiert werden. Je nachdem welche Funktion die einzelnen regulierten Gene hatten, konnte man darauf schließen, ob es sich um ein Sekundärmetabolitcluster handelt oder nicht. Schließlich wurden dann einzelne Gene aus solch einem Cluster ausgeschaltet um zu sehen, um welchen Sekundärmetabolit es sich handelt. So konnte unter anderem das Biosynthesegencluster für Terrequinone, eine Substanz, die gegen Tumore wirkt, entdeckt werden. Diese Technik wurde als „Genomic mining“ bezeichnet (Bok *et al.*, 2006a).

Man könnte sich vorstellen, dass Nit1 wie Con7p und LaeA als globaler Regulator dient und als solcher für die Aktivierung sämtlicher Sekundärmetabolitgencluster unter Stickstoffmangelbedingungen verantwortlich ist

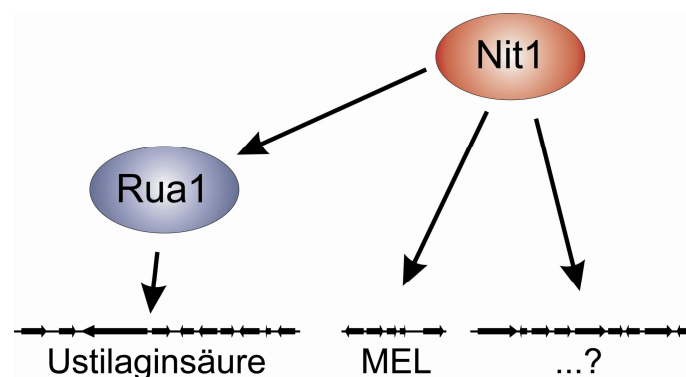
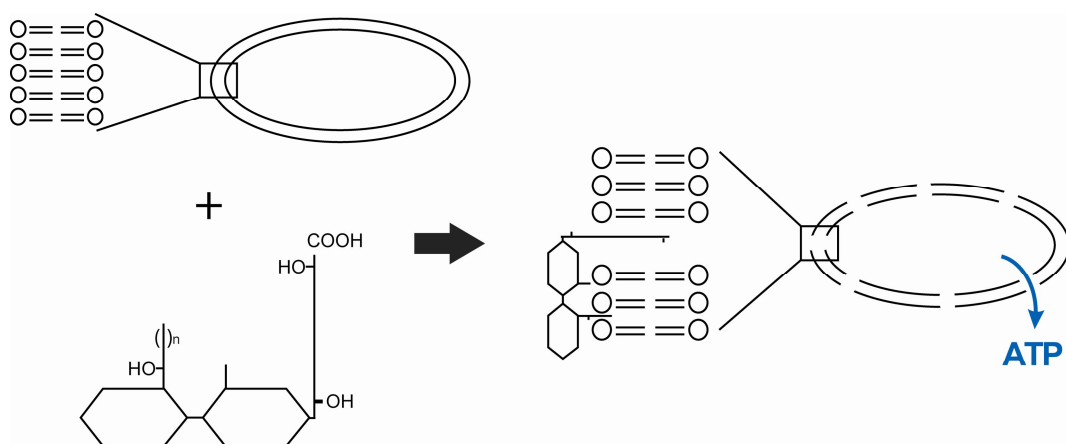


Abbildung 37: Modell zur Stickstoffregulation in *U. maydis*.

(Abbildung 37). Ein weiterer interessanter Aspekt wäre nun den Deletionsstamm bzw. einen Überexpressionsstamm von Nit1 ebenfalls mit Hilfe von Microarray-Analysen genomweit auf zusammenhängende Gene zu untersuchen, um damit weitere Sekundärmetabolitcluster zu finden. Außerdem finden sich im Genom von *U. maydis* drei weitere Transkriptionsfaktoren, die große Sequenzähnlichkeit zu Rua1 aufweisen (Abbildung 19). Es stellt sich daher die Frage, welche Funktion diese Proteine haben und ob es sich hier ebenfalls um Regulatoren für Sekundärmetabolite handelt. Um dies zu überprüfen, könnten die drei Gene ebenfalls mit Hilfe Deletionsanalysen oder durch Überexpression untersucht werden.

### 3.3 Die antibiotische Wirkung der Ustilaginsäure

Bereits seit den 50er Jahren ist bekannt, dass Ustilaginsäure antibiotisch gegenüber einer Reihe von Mikroorganismen wirkt (Haskins and Thorn, 1951). Der Wirkungsmechanismus für Ustilaginsäure ist noch nicht vollständig geklärt. Ein verwandter Basidiomycet *Cryptococcus humicola* produziert ein Cellobioselipid, das eine ähnliche Struktur wie Ustilaginsäure aufweist. Dieses als „Microcin“ bezeichnete Glycolipid hat ebenfalls antibiotische Wirksamkeit gegenüber einer Reihe anderer Mikroorganismen. Es konnte gezeigt werden, dass Microcin die Zytoplasmamembran anderer Organismen zerstört, indem es



**Abbildung 38: Modell zur Wirkungsweise von Ustilaginsäure.** Ustilaginsäure lagert sich in die Zytoplasmamembran ein, was die Membranpermeabilität erhöht. Die Folge ist ein gestörtes Membranpotential und der Austritt von kleinen Molekülen, wie ATP, aus der Zelle.

sich in die Lipiddoppelschicht einlagert und damit die Membranpermeabilität erhöht. Dadurch wird zunächst das auf der Membran anliegende Membranpotential gestört, wodurch es zu einer Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase kommt, was zu einer Übersäuerung des Zytoplasmas führt. Durch weiter steigende Membrandurchlässigkeit kommt es schließlich zum Ausfluss kleinerer Moleküle, wie beispielsweise ATP und damit zu einem gestörten Gleichgewicht des Zytoplasmas. Die Folge davon ist, dass Enzyme inaktiviert werden und die Zelle abstirbt (Puchkov *et al.*, 2001; Puchkov *et al.*, 2002).

Für *Pseudozyma fusiformata* einem Pilz, der ebenfalls zur Familie der Ustilaginales gehört und Ustilaginsäure produziert, wurden bereits Studien über die membranschädigende Wirkung der Ustilaginsäure gemacht (Kulakovskaya *et al.*, 2003; Kulakovskaya *et al.*, 2005). *C. terreus* und *S. cerevisiae* Zellen die mit Ustilaginsäure behandelt worden waren, setzten ATP frei, das durch Aktivierung von Luciferase nachgewiesen werden konnte. Dies spricht dafür, dass Ustilaginsäure dieselbe Wirkungsweise besitzt, wie sie für Microcin aus *C. humicola*, beschrieben wurde (Abbildung 38).

In dieser Arbeit wurden die von verschiedenen Mutantenstämmen produzierten Ustilaginsäurevorstufen auf antibiotische Wirkung getestet. Es zeigte sich, dass sowohl die Acetylgruppe als auch die Acylgruppe vorhanden sein müssen, damit Ustilaginsäure ihre Wirkung behält. Das bedeutet, dass diese beiden Modifikationen möglicherweise für das Einlagern in die Zytoplasmamembran anderer Organismen benötigt werden. Das Fehlen der  $\beta$ -Hydroxylgruppen an der kleinen Fettsäurekette, bzw. der  $\alpha$ -Hydroxylgruppe an der langen Fettsäure hat keinen Einfluss auf die Toxizität. Interessanterweise verliert Ustilaginsäure, die keine subterminale Hydroxylgruppe an der langen Fettsäure hat, vollständig ihre Wirkung. Der Grund dafür konnte bisher nicht geklärt werden. Möglicherweise verleiht diese Hydroxylgruppe dem Molekül eine gewisse Stabilität, die es für die Einlagerung in Membranen benötigt. Außerdem deutet es darauf hin, dass die toxische Wirkung nicht nur einfach auf der amphipathischen Eigenschaft der Ustilaginsäure beruht, sondern vermutlich eine spezifische Reaktion vorliegt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob *U. maydis* sich, aufgrund seiner antibiotischen Wirksamkeit, als sogenannter „Biocontrol-Organismus“, zur biologischen Schädlingsbekämpfung eignet. Darunter versteht man den Einsatz

von lebenden Mikroorganismen, um damit auf natürliche Weise Pflanzenschädlinge zu eliminieren.

Für *P. flocculosa*, einen verwandten Pilz von *U. maydis*, konnte bereits gezeigt werden, dass er Biocontrolaktivität besitzt (Mimee *et al.*, 2005). *P. flocculosa* wirkt sehr effizient gegenüber verschiedenen Mehltauarten und wird auch bereits kommerziell als Biocontrol-Organismus eingesetzt (Avis and Bélanger, 2002; Paulitz and Bélanger, 2001).

Die Interaktionsversuche mit *B. cinerea* konnten zeigen, dass sich *U. maydis* ebenfalls als solch ein Biocontrol-Organismus eignet. Um *U. maydis* aber letztendlich für einen kommerzielle Einsatz zugänglich zu machen, müsste er noch optimiert werden. So werden Glycolipide von *U. maydis* ausschließlich unter Stickstoffmangebedingungen produziert. Durch die in der Landwirtschaft eingesetzten Düngemittel herrscht aber in der Regel auf den Feldern kein Stickstoffmangel. Eine Anwendung von *U. maydis* in der Natur hätte somit keine Wirkung auf Pflanzenschädlinge. Man müsste daher *U. maydis* so verändern, dass er kontinuierlich Ustilaginsäure produziert. Es konnte bereits ein Stamm hergestellt werden, der Rua1 hinter einem konstitutiv aktiven Promotor exprimiert. Zieht man diesen Stamm in Vollmedium an, so zeigt er tatsächlich Biocontrolaktivität gegenüber *B. cinerea*, allerdings noch wesentlich schwächer als ein unter Stickstoffmangel gewachsener Wildtypstamm (Daten nicht gezeigt).

Des weiteren sollten natürlich keine Wildtypstämme benutzt werden, die noch Maispflanzen infizieren können. Man könnte deshalb Stämme benutzen, die so verändert sind, dass sie nicht mehr mit einem kompatiblen Partner kreuzen können. Es wurden bereits verschiedene Stämme hergestellt, die nicht mehr pathogen sind. Deletiert man beispielsweise den Transkriptionsfaktor, der für die Expression des Pheromon-Rezeptor-Systems verantwortlich ist, sind die Mutantenstämme, die man erhält, steril und damit nicht mehr pathogen (Hartmann *et al.*, 1996). Dasselbe gilt, wenn man die Gene, die für das Pheromon-Rezeptor-System, den sogenannten *a*- oder *b*-Lokus, ausschalten würde.

### 3.4 Ausblick

Durch die Aufklärung des Biosynthesewegs für die Ustilaginsäure und dessen Regulation können nun Stämme produziert werden, die für die Industrie von Interesse sein könnten. Man ist nun in der Lage, *U. maydis* als Biocontrol-Organismus einzusetzen, oder man könnte die verschiedenen Mutanten nutzen um bestimmte Ustilaginsäurevorstufen in großem Maßstab synthetisieren zu lassen. Des weiteren konnte die Funktion der einzelnen Enzyme aufgeklärt werden. Diese könnten, biochemisch aufgereinigt, für die Industrie von großem Interesse sein.

Möglicherweise könnte man sogar, da man die nun Funktion der einzelnen Enzyme während der Biosynthese kennt, die Ustilaginsäure so verändern, dass ihre Wirkung verstärkt oder verändert wird, mit dem Ziel ein noch größeres Schädlingsspektrum zu erreichen. Durch solch eine Veränderung wäre es denkbar, dass Ustilaginsäure doch irgendwann am Menschen als Antibiotikum anwendbar wird.

Außerdem könnte man mit Hilfe des Transkriptionsfaktors Nit1, der möglicherweise als zentraler Regulator für sämtliche Sekundärmetabolitcluster ist, versuchen, das Sekundäre Metabolom von *U. maydis* zu charakterisieren und damit möglicherweise weitere bisher noch unbekannte Naturprodukte entdecken.



## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

**Tabelle 4:** Verwendete Chemikalien

Name	Bezugsquelle
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Adenin	Sigma (Deisenhofen)
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (40:1)	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Alanin	Serva (Heidelberg)
Ammoniumacetat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumnitrat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Anisaldehyd	Sigma (Deisenhofen)
APS	Roth (Karlsruhe)
Arabinose	Merck (Darmstadt)
Arginin	Sigma (Deisenhofen)
Asparagin	Sigma (Deisenhofen)
Asparaginsäure	Serva (Heidelberg)
Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen)
Bacto-Agar	Becton, Dickinson (Frankreich)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Carboxin	Riedel-de Haen (Seelze)
Charcoal	Sigma (Deisenhofen)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth (Karlsruhe)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
1,4 Dithiothreitol	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Eisen (III)-Chlorid	Roth (Karlsruhe)

Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt)	Schmidt-GmbH (Dillenburg)
Ethanol (unvergällt)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	Sigma (Deisenhofen)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Heringssperma DNA	Sigma (Deisenhofen)
Histidin	Merck (Darmstadt)
Hygromycin B	Duchefa (Haarlem, NL)
IPTG	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Isoleucin	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumnitrat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Lamda DNA	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Leucin	Merck (Darmstadt)
Lithiumacetat	Sigma (Deisenhofen)
Lysin	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Methionin	Merck (Darmstadt)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Nutrient Broth	Difco (Detroit, US)
Orange G	Sigma (Deisenhofen)
p – Aminobenzoessäure	Sigma (Deisenhofen)
Paraffinöl	Roth (Karlsruhe)
Pepton (Bakterien)	Difco (Detroit, US)
Pepton ( <i>U. maydis</i> )	Acumedia Manufacturers, Inc. (Lansing, MI, USA)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phenylalanin	Merck (Darmstadt)
PMSF	Merck (Darmstadt)
Polyethylenglycol (PEG 4000)	Merck (Darmstadt)
Potato-Dextrose	Becton, Dickinson (Frankreich)
Prolin	Serva (Heidelberg)

Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure	Roth (Karlsruhe)
Serin	Roth (Karlsruhe)
Sorbitol	Sigma (Deisenhofen)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Toluol	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
Trypton (Bakterien)	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
Trypton ( <i>U. maydis</i> )	Acumedia Manufacturers, Inc. (Lansing, MI, USA)
Tryptophan	Merck (Darmstadt)
Tyrosin	Sigma (Deisenhofen)
Uracil	Sigma (Deisenhofen)
Valin	Merck (Darmstadt)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)
Yeast Extract	Acumedia Manufacturers, Inc. (Lansing, MI, USA)
Yeast Nitrogen Base	Difco (Detroit, US)
Zinkchlorid	Merck (Darmstadt)

### 4.1.2 Puffer und Lösungen

<b>AE-Puffer</b>	50 mM Na-Acetat, pH 5,3 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> .
<b>AE-Phenol</b>	50% AE-Puffer 50% Phenol
<b>Ampicillin-Lösung</b>	100 mg/ml Ampicillin in H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> , sterilfiltriert
<b>Carboxin-Lösung</b>	5 mg/ml Carboxin in Methanol, sterilfiltriert
<b>CCMB-Puffer</b> ( <i>E. coli</i> -Transformation) (sterilfiltriert, pH einstellen auf 6,4)	80 mM CaCl <sub>2</sub> 20 mM MnCl <sub>2</sub> 10mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM K-Acetat 10% Glycerin
<b>DNA-Auftragspuffer (10x)</b>	0,2 % (w/v) Orange G 50 % (w/v) Saccharose 1 mM EDTA

<b>dNTP-Lösung</b>	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
<b>Ligase-Puffer (10x)</b>	50 mM MgCl <sub>2</sub> 660 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM DTT 10 mM ATP
<b>LiT (Hefe-Transformation)</b>	10 mM Tris/HCl pH 7,4 100 mM Lithiumacetat
<b>LiT-PEG</b>	1g/ml PEG 3350 in LiT
<b>Lysis-Puffer</b> (DNA-Präparation aus <i>U. maydis</i> )	2,0 % (w/v) Triton X-100 1 % (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
<b>Lysozym-Lösung</b>	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
<b>MOPS-Puffer (10x)</b>	200 mM MOPS, pH 7,0 80 mM Na-Acetat 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
<b>Natriumphosphatpuffer (1 M)</b>	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0
<b>Northern-Hybridisierungspuffer</b>	50 mM PIPES, pH 6,5 100 mM NaCl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1 mM EDTA 5% (w/v) SDS
<b>Northern-Waschpuffer</b>	1x SSC (s. u.) 5% SDS
<b>Northern-Strip-Puffer</b>	0,1x SSC 0,1% SDS
<b>10x PCR-Puffer</b> ( <i>Taq</i> DNA-Polymerase)	200 mM Tris/HCl, pH 8,4 500 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub>

<b>10x PCR-Puffer</b> ( <i>Pfu</i> DNA-Polymerase)	200 mM Tris/HCl (pH 8,8) 100 mM KCl 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 mM MgSO <sub>4</sub> 1mg/ml BSA 1% Triton
<b>Phenol/Chloroform</b>	50 % (v/v) Phenol 50 % (v/v) Chloroform
<b>Probenpuffer (6x)</b> (für Proteingele)	300 mM Tris-HCl, pH 8,0 30% (v/v) Glycerin 20% (w/v) SDS 0,5 g/l Bromphenolblau 15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
<b>Proteingel-Laufpuffer</b>	25 mM Tris-HCl, pH 8,8 200 mM Glycin 1% (w/v) SDS
<b>Proteingel Entfärber</b>	45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
<b>Proteingel Färbelösung</b> (Coomasie)	0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
<b>RNA-Auftragspuffer</b>	50% (w/v) Saccharose 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF in MOPS-Puffer
<b>RNase A-Lösung</b>	10 mg/ml RNase A 15 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , 15 min. gekocht
<b>Sammelgel</b>	125 mM Tris-HCl, 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
<b>SCS-Puffer</b> (Protoplastierung)	20 mM Natriumcitrat-Puffer pH 5,8 1 M Sorbitol

<b>SCS-Novozym-Lösung</b> (Protoplastierung)	3 mg/ml (w/v) Novozym 234 in SCS-Puffer (sterilfiltriert, frisch angesetzt)
<b>SCS-Lysing Enzyme</b> (Protoplastierung)	10 mg/ml Lysing Enzyme in SCS-Puffer (sterilfiltriert, frisch angesetzt)
<b>Sol A</b> (Plasmidpräparation, alk.-Lyse)	100 mM Tris-HCl, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
<b>Sol B</b> (Plasmidpräparation, alk. Lyse)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
<b>Sol C</b> (Plasmidpräparation, alk. Lyse)	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure
<b>Southern-Denaturierungs-Puffer</b>	0,25 M HCl
<b>Southern-Hybridisierungspuffer</b>	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7% (w/v) SDS
<b>Southern-Transferlösung</b>	0,4 M NaOH
<b>Southern-Waschpuffer</b>	100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1% (w/v) SDS
<b>SSC (20x)</b>	300 mM Na-Citrat, pH 7,0 3 M NaCl
<b>STET- Puffer</b> (Kochende Lyse)	10 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA 5% (w/v) TritonX-100
<b>STC-Puffer</b> (Protoplastierung)	1 M Sorbitol 10 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>STC/PEG</b> (Transformation <i>U. maydis</i> )	40 % (w/v) Polyethylenglykol in STC (sterilfiltriert)
<b>TAE-Puffer (50x)</b>	40 mM Tris-HCl pH 8,3 20 mM Natriumacetat 2 mM EDTA
<b>TBE (5x)</b>	500 mM Tris-Borat, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA

<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
<b>Trenngel</b>	375 mM Tris-HCl, pH 8,8 6% (w/v) Acrylamid 0,27% (w/v) Bisacrylamid 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,1% (v/v) TEMED
<b>X-Gal-Lösung</b>	2,0 % (w/v) X-Gal in N,N-Dimethylformamid
<b>Z-Puffer</b>	100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 10 mM KCl 2 mM MgCl <sub>2</sub>

### 4.1.3 Medien

#### *U. maydis* Medien

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

<b>NSY-Glycerin-Medium</b>	8 g/l Nutrient Broth 5 g/l Saccharose 1 g/l Hefe-Extrakt 69,6% (v/v) Glycerin
<b>PD-Agar</b>	24 g/l Potato Dextrose Broth 2,0% (w/v) Agar
<b>PD-Charcoal-Agar</b>	24 g/l Potato Dextrose Broth 10 g/l Charcoal 2,0% (w/v) Agar
<b>Regenerations-Agar</b>	a) Top-Agar: 10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0% (w/v) Saccharose 182,2 g/l Sorbitol 1,5% (w/v) Agar b) Bottom-Agar: wie a) mit zusätzlich 400 µg/ml Hygromycin oder 4 µg/ml Carboxin

<b>YEPS-Medium</b>	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0% (w/v) Saccharose
<b>YNB- Medium</b>	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base nach dem Autoklavieren 5% C- Quelle zusetzen
<b>YNB- Medium mit Stickstoff- quelle</b>	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,5% Ammoniumsulfat nach dem Autoklavieren 5% C- Quelle zusetzen

Alle Medien wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Antibiotika wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Carboxin (2 µg/ml) und Hygromycin (200 µg/ml).

### ***E. coli* Medien**

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

<b>dYT-Medium</b>	16 g/l Trypton 10 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl
<b>dYT-Agar</b>	wie dYT-Medium 1,3 % (w/v) Agar
<b>dYT-Glycerin-Medium</b>	dYT-Medium 69,6 % (v/v) Glycerin
<b>LB-Medium</b>	10 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl
<b>SOB-Medium</b>	20 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 0,58 g/l NaCl 0,19 g/l KCl
<b>SOB-Medium mit Mg</b>	wie SOB-Medium MgCl <sub>2</sub> und MgSO <sub>4</sub> (10 M Stammlösung herstellen und davon 10 ml pro Liter SOB-Medium)

Alle Medien wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Für die Kultivierung von *E. coli* wurden Medienzusätze, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden



Konzentrationen zugesetzt: Ampicilin (100 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml).

### **S. cerevisiae Medien**

**YEPD-Medium**                      10 g/l Hefe-Extrakt  
    20 g/l Pepton

nach dem Autoklavieren 2% Glucose zugeben.

**YEPD-Agar**                              YEPD-Medium  
    20 g/l Agar

**Hefe-Selektionsmedium**            1,7 g/l YNB  
    5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
    1,81 g/l Aminosäuremix

pH-Wert auf 5,6 – 5,8 einstellen und 10 min autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 2% Glucose zusetzen. Der Aminosäuremix setzt sich zusammen aus: 2g Alanin, 2g Arginin, 2g Asparagin, 2g Asparaginsäure, 2g Cystein, 2g Glutamin, 2g Glutaminsäure, 2g Glycin, 2g Inositol, 2g Isoleucin, 2g Lysin, 0,2g para-Aminobenzoesäure, 2g Phenylalanin, 2g Prolin, 2g Serin, 2g Threonin, 2g Tyrosin, 2g Uracil und 2g Valin.

Je nach Bedarf werden außerdem 0,1 g/l Histidin, 0,2 g/l Leucin, 0,1 g/l Uracil, 0,1 g/l Tryptophan und 0,025 g/l Adenin dem Medium zugefügt.

**Hefe-Selektionsagar**                    wie Hefe-Selektionsmedium  
    20 g/l Agar

### **4.1.4 Kits**

**Tabelle 5:** Verwendete Kits

<b>Name:</b>	<b>Bezugsquelle:</b>
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Avegene (Hamburg)
High-Speed Plasmid Mini Kit	Avegene (Hamburg)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)
Megaprime DNA Labeling System	Amersham (Braunschweig)
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

### 4.1.5 Enzyme

**Tabelle 6:** Verwendete Enzyme und Proteine

<b>Name:</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Shrimp Alkalische Phosphatase	Amersham (Braunschweig)
Lysozym	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Novozym 234	Novo Nordisc (Kopenhagen, DN)
Lysing Enzymes aus <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma (Deisenhofen)
<i>Pfu</i> -Polymerase	Laborpräparation
Restriktionsendonukleasen	Amersham (Braunschweig); Fermentas (St. Leon-Rot) New England Biolabs GmbH (Schwalbach)
RNase A	Serva (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Roche (Mannheim)
<i>Taq</i> -Polymerase	Laborpräparation

### 4.1.6 Sonstiges

**Tabelle 7:** Sonstige Materialien

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Nylonfilter <sup>®</sup> Hybond N+	Amersham Pharmacia Biotec
Blottingpapier	Schleicher & Schüll
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Falcon-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Mais-Samen	Early Golden Bantam (Madison, USA)
MobiSpin Säulchen	MoBiTec (Göttingen)
Parafilm	American National Can <sup>TM</sup> (Chicago, USA)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
Röntgenfilm CEA RP New medical X-Ray Film	CEA AB (Strängnäs, Schweden)

Material	Bezugsquelle
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)

#### 4.1.7 Größenstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden  $\lambda$ -DNA *PstI*-Fragmente (Laborpräparate) als DNA Größenstandards verwendet:

$\lambda$  -DNA *PstI*-Fragmente in bp:

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

Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde der Page Ruler Prestained Protein Ladder von Fermentas als Proteinmarker verwendet.

Page Ruler Prestained Protein Ladder in kDa:

170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17, 11

#### 4.1.8 Stämme

##### Ausgangsstämme:

##### *E. coli*

Für Klonierungen ohne nähere Angaben wurde die Stämme DH5 $\alpha$  und Top10 verwendet. Bei DH5 $\alpha$  handelt es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern: F- *endA1 hsdR- hsdM+ supE44, thi-1 gyrA1 gyrA96, relA1 recA1 lacZ* $\Delta$ M15.

Bei Top10 handelt es sich um einen *dam*- Stamm mit folgenden genetischen Markern: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 deoR nupG recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL(StrR) endA1*  $\lambda$ -

Als Expressionsvektor wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21::DE3 oder der Stamm Rosetta verwendet.

Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966).

**Tabelle 8:** *U. maydis*

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett and Herskowitz, 1989)
MB215	<i>a2 b13</i>	-	Laborsammlung
FB1 $\Delta$ <i>cyp1</i>	<i>a1 b1</i>	Hygromycin	(Teichmann, 2005)
FB1 $\Delta$ <i>cyp2</i>	<i>a1 b1</i>	Hygromycin	(Teichmann, 2005)
MB215 $\Delta$ <i>cyp1</i>	<i>a2 b13</i>	Hygromycin	(Teichmann, 2005)
MB215 $\Delta$ <i>cyp2</i>	<i>a2 b13</i>	Hygromycin	(Teichmann, 2005)
MB215 $\Delta$ <i>rua1</i>	<i>a2 b13</i>	Hygromycin	(Teichmann, 2005)
MB215 $\Delta$ <i>emt1</i>	<i>a2 b13</i>	Hygromycin	(Hewald <i>et al.</i> , 2005)

**Tabelle 9:** *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Referenz
DF5 his1-1	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 his3_200/his3_200 trp1-1/trp1-1 leu2-3,112/leu2-3,112 lys2-801/lys2-801</i>	(Finley <i>et al.</i> , 1987)
YM4271	<i>MATa, ura3-52,his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, trp1-901, tyr1-501, gal4-D512, gal80-D538, ade5::hisG</i>	(Liu <i>et al.</i> , 1993; Wilson <i>et al.</i> , 1991)

**In dieser Arbeit hergestellte Stämme:****Tabelle 10:** *U. maydis*

Stamm	Genotyp	Resistenz	Plasmid, Konstrukt
FB1 $\Delta$ <i>fas2</i>	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ <i>fas2</i>
MB215 $\Delta$ <i>fas2</i>	<i>a2 b13</i>	Hyg	MB215 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ <i>fas2</i>
FB1 $\Delta$ <i>uat1</i>	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ <i>uat1</i>
FB1 $\Delta$ <i>uat2</i>	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ <i>uat2</i>
FB1 $\Delta$ <i>um06465</i>	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ <i>um06465</i>
MB215 $\Delta$ <i>um06465</i>	<i>a2 b13</i>	Hyg	MB215 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ <i>um06465</i>

Stamm	Genotyp	Resistenz	Plasmid, Konstrukt
FB1 $\Delta$ uhd1	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ uhd1
FB1 $\Delta$ ugt1	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ ugt1
FB1 $\Delta$ um06468	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ um06468
MB215 $\Delta$ um06468	<i>a2 b13</i>	Hyg	MB215 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ um06468
FB1 $\Delta$ ahd1	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ ahd1
MB215 $\Delta$ ahd1	<i>a2 b13</i>	Hyg	MB215 deletiert mit pBShhn1441 $\Delta$ ahd1
FB1 $\Delta$ uat2, $\Delta$ uhd1, $\Delta$ ahd1	<i>a1 b1</i>	Hyg, Nat	FB1 $\Delta$ ahd1 deletiert mit pMF-1n $\Delta$ uat2-uhd1
MB215 $\Delta$ uat2, $\Delta$ uhd1, $\Delta$ ahd1	<i>a2 b13</i>	Hyg, Nat	MB215 $\Delta$ ahd1deletiert mit pMF-1n $\Delta$ uat2-uhd1
BT $\Delta$ fas2, $\Delta$ emt1	?	Hyg	FB1 $\Delta$ fas2 gekreuzt mit MB215 $\Delta$ emt1
BT $\Delta$ uat1, $\Delta$ emt1	?	Hyg	FB1 $\Delta$ uat1 gekreuzt mit MB215 $\Delta$ emt1
BT $\Delta$ uat2, $\Delta$ emt1	?	Hyg	FB1 $\Delta$ uat2 gekreuzt mit MB215 $\Delta$ emt1
BT $\Delta$ uhd1, $\Delta$ emt1	?	Hyg	FB1 $\Delta$ uhd1 gekreuzt mit MB215 $\Delta$ emt1
BT $\Delta$ ugt1, $\Delta$ emt1	?	Hyg	FB1 $\Delta$ ugt1 gekreuzt mit MB215 $\Delta$ emt1
BT $\Delta$ ahd1, $\Delta$ emt1	?	Hyg	FB1 $\Delta$ ahd1 gekreuzt mit MB215 $\Delta$ emt1
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i>	<i>a1 b1</i>	Hyg	FB1 <i>rua1</i> -Promotor ersetzt durch pMF2-1h-Kassette
MB215-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i>	<i>a2 b13</i>	Hyg	MB215 <i>rua1</i> -Promotor ersetzt durch pMF2-1h-Kassette
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>cyp1</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>cyp1</sub> ::mCherry
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>cyp1(500)</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>cyp1(500)</sub> ::mCherry
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>cyp1(179)</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>cyp1(179)</sub> ::mCherry
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>cyp1(-BD)</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>cyp1(-BD)</sub> ::mCherry
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>cyp2</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>cyp2</sub> ::mCherry

Stamm	Genotyp	Resistenz	Plasmid, Konstrukt
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>cyp2(416)</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>cyp2(416)</sub> ::mCherry
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>cyp2(274)</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>cyp2(274)</sub> ::mCherry
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>atr1(667)</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>atr1(667)</sub> ::mCherry
FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> , P <sub>atr1(502)</sub> ::mCherry	<i>a1 b1</i>	Hyg, Cbx	FB1-P <sub>crg</sub> :: <i>rua1</i> transformiert mit P123-P <sub>atr1(502)</sub> ::mCherry

Sämtliche Transformanden wurden durch Southern-Analysen bestätigt.

**Tabelle 11:** *S. cerevisiae*

Stamm	Resistenz	Plasmid, Konstrukt
YM4271-pLacZi	Ura <sup>+</sup>	pLacZi
YM4271-pLacZi-P <sub>cyp2</sub>	Ura <sup>+</sup>	pLacZi-P <sub>cyp2</sub>
YM4271-pLacZi, pAD2	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pLacZi und pAD2
YM4271-pLacZi- P <sub>cyp2</sub> , pAD2	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pAD2- <i>rua1</i> und pAD2
YM4271-pLacZi, pAD2- <i>rua1</i>	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pAD2- <i>rua1</i> und pLacZi
YM4271-pLacZi-P <sub>cyp2</sub> , pAD2- <i>rua1</i>	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pAD2- <i>rua1</i> und pLacZi-P <sub>cyp2</sub>
YM4271 pLacZi-P <sub>cyp2</sub> , pAD2- <i>rua1</i> <sub>NΔ1-307</sub>	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pAD2- <i>rua1</i> <sub>NΔ1-307</sub> und pLacZi-P <sub>cyp2</sub>
YM4271 pLacZi-P <sub>cyp2</sub> , pAD2- <i>rua1</i> <sub>NΔ1-576</sub>	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pAD2- <i>rua1</i> <sub>NΔ1-576</sub> und pLacZi-P <sub>cyp2</sub>
YM4271-pLacZi-BD	Ura <sup>+</sup>	pLacZi-BD
YM4271-pLacZi-BD, pAD2	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pLacZi-BD und pAD2
YM4271-pLacZi-BD, pAD2- <i>rua1</i>	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pLacZi-BD und pAD2- <i>rua1</i>
YM4271-pLacZi-BD-UAS1*, pAD2- <i>rua1</i>	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pLacZi-BD-UAS1* und pAD2- <i>rua1</i>
YM4271-pLacZi-BD-UAS2*, pAD2- <i>rua1</i>	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pLacZi-BD-UAS2* und pAD2- <i>rua1</i>
YM4271-pLacZi-BD- UAS1*+2*, pAD2- <i>rua1</i>	Ura <sup>+</sup> /Leu <sup>+</sup>	pLacZi-BD-UAS1*+2* und pAD2- <i>rua1</i>

### 4.1.9 Plasmide

**Tabelle 12:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Resistenz/ Selektion	Herkunft	Verwendung
pBShhn	Hyg, Amp	Labor- sammlung	Ausschneiden einer 1884 bp Hygromycin Resistenzkassette [hyg <sup>R</sup> ] als <i>Sfi</i> I –Fragment.
pMF1-n	Nat, Amp	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)	Ausschneiden einer 1390 bp Nourseothricin Resistenzkassette [Nat <sup>R</sup> ] als <i>Sfi</i> I –Fragment.
pMF2-1h	Hyg, Amp	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)	Ausschneiden einer 4137 bp Hygromycin Resistenzkassette [hyg <sup>R</sup> ] und des P <sub>crp</sub> -Promotors als <i>Sfi</i> I –Fragment.
p123-mCherry	Amp, Cbx	Labor- sammlung	Expressionsvektor für <i>U. maydis</i>
pCR2.1-Topo	Amp, Kan	Invitrogen (Topo TA Cloning Kit)	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten
pLacZi	Amp, Ura3	Clontech	Hefe-One-Hybrid-System
pAD2	Amp, Leu	(Jansen <i>et al.</i> , 2005)	Hefe-One-Hybrid-System
pRS426	Amp, Ura3	(Mumberg <i>et al.</i> , 1995)	Klonierung von Konstrukten mit Hilfe des „Drag and Drop“ Systems
pJet1/blunt	Amp	Fermentas	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

**Tabelle 13:** In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Name	Resistenz/ Selektion	Anmerkung
pBShhn1441 $\Delta$ <i>fas2</i>	Hyg	Amplifikation der <i>fas2</i> Flanken durch die Primer MC343 und MC344 (linke Flanke) sowie MC339 und MC340 (rechte Flanke). Die Flanken wurden mit <i>SfiI</i> nachgeschnitten, an die Hyg-Kassette aus pBShhn1441 ligiert und in pCR2.1-Topo kloniert. Das Fragment wurde mit <i>Bam</i> HI ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.
pBShhn1441 $\Delta$ <i>uat1</i>	Hyg	Amplifikation der <i>uat1</i> Flanken durch die Primer MD469 und MC325 (linke Flanke) sowie MC326 und MD470 (rechte Flanke). Die Flanken wurden mit <i>SfiI</i> nachgeschnitten, an die Hyg-Kassette aus pBShhn1441 ligiert und in pCR2.1-Topo kloniert. Das Fragment wurde mit <i>SbfI</i> ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.
pBShhn1441 $\Delta$ <i>uat2</i>	Hyg	Amplifikation der <i>uat2</i> Flanken durch die Primer MC846 und MC847 (linke Flanke) sowie MC848 und MC849 (rechte Flanke). Die Flanken wurden mit <i>SfiI</i> nachgeschnitten, an die Hyg-Kassette aus pBShhn1441 ligiert und in pCR2.1-Topo kloniert. Das Fragment wurde mit <i>NotI</i> ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.
pBShhn1441 $\Delta$ <i>um06465</i>	Hyg	Amplifikation der <i>um06465</i> Flanken durch die Primer MC717 und MC718 (linke Flanke) sowie MC719 und MC720 (rechte Flanke). Die Flanken wurden mit <i>SfiI</i> nachgeschnitten, an die Hyg-Kassette aus pBShhn1441 ligiert und in pCR2.1-Topo kloniert. Das Fragment wurde mit <i>NotI</i> ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.



Name	Resistenz/ Selektion	Anmerkung
pBShhn1441 $\Delta$ uhd1	Hyg	Amplifikation der <i>uhd1</i> Flanken durch die Primer MC840 und MC841 (linke Flanke) sowie MC842 und MC843 (rechte Flanke). Die Flanken wurden mit <i>SfiI</i> nachgeschnitten, an die Hyg-Kassette aus pBShhn1441 ligiert und in pCR2.1-Topo kloniert. Das Fragment wurde mit <i>NotI</i> ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.
pBShhn1441 $\Delta$ ugt1	Hyg	Amplifikation der <i>ugt1</i> Flanken durch die Primer MB736 und MD802 (linke Flanke) sowie MD803 und MB739 (rechte Flanke). Die Flanken wurden mit <i>SfiI</i> nachgeschnitten, an die Hyg-Kassette aus pBShhn1441 ligiert und in pCR2.1-Topo kloniert. Das Fragment wurde mit <i>MluI</i> ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.
pBShhn1441 $\Delta$ um06468	Hyg	Amplifikation der <i>um06468</i> Flanken durch die Primer MD315 und MD316 (linke Flanke) sowie MD317 und MD318 (rechte Flanke). Die Flanken wurden mit <i>SfiI</i> nachgeschnitten, an die Hyg-Kassette aus pBShhn1441 ligiert und in pCR2.1-Topo kloniert. Das Fragment wurde mit <i>EcoRV</i> ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.
pBShhn1441 $\Delta$ uhd1	Hyg	Amplifikation der <i>uhd1</i> Flanken durch die Primer MC747 und MC748 (linke Flanke) sowie MC749 und MC750 (rechte Flanke). Die Flanken wurden mit <i>SfiI</i> nachgeschnitten, an die Hyg-Kassette aus pBShhn1441 ligiert und in pCR2.1-Topo kloniert. Das Fragment wurde mit <i>NotI</i> ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.

Name	Resistenz/ Selektion	Anmerkung
pMF-1n $\Delta$ uat2-uhd1	Nat	Amplifikation der rechten <i>uat1</i> Flanke durch die Primer ME98 und ME99 sowie der rechten <i>uhd1</i> Flanke durch die Primer ME100 und ME101. Die Flanken wurden mit Hilfe der „Drag and Drop“ Methode zusammen mit der Nat-Kassette aus pMF-1n in den Vektor pRS426 kloniert. Das Fragment wurde mit <i>SspI</i> ausgeschnitten und in <i>U. maydis</i> Protoplasten transformiert.
P123-P <sub>cyp1</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry, P <sub>etef</sub> ersetzt durch P <sub>cyp1</sub> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD798 und ME172 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>KpnI</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.
P123- P <sub>cyp1(500)</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry P <sub>etef</sub> ersetzt durch den Bereich - 492 bis Start vor <i>cyp1</i> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD800 und ME172 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>KpnI</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.
P123- P <sub>cyp1(179)</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry, P <sub>etef</sub> ersetzt durch den Bereich - 179 bis Start vor <i>cyp1</i> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer ME469 und ME172 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>KpnI</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.

Name	Resistenz/ Selektion	Anmerkung
P123- P <sub>cyp1(-BD)</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry, P <sub>etef</sub> ersetzt durch P <sub>cyp1Δ-231 bis 195</sub> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD798 und ME223 sowie ME172 und ME214 amplifiziert. Die Fragmente wurden mit <i>SbfI</i> nachgeschnitten und in den pJet1/blunt eingebracht. Das so zusammenklonierte Fragment wurde mit <i>KpnI</i> und <i>NcoI</i> ausgeschnitten und in p123-mCherry überführt.
P123-P <sub>cyp2</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry, P <sub>etef</sub> ersetzt durch P <sub>cyp2</sub> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD794 und MD797 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>HindIII</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.
P123- P <sub>cyp2(478)</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry, P <sub>etef</sub> ersetzt durch den Bereich - 478 bis Start vor <i>cyp2</i> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD795 und MD797 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>HindIII</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.
P123- P <sub>cyp2(416)</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry, P <sub>etef</sub> ersetzt durch den Bereich - 416 bis Start vor <i>cyp2</i> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD976 und MD797 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>HindIII</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.
P123- P <sub>cyp2(274)</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry, P <sub>etef</sub> ersetzt durch den Bereich - 274 bis Start vor <i>cyp2</i> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD796 und MD797 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>HindIII</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.

Name	Resistenz/ Selektion	Anmerkung
P123- P <sub>atr1(667)</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry, P <sub>etef</sub> ersetzt durch den Bereich - 667 bis Start vor <i>atr1</i> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD984 und MD986 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>HindIII</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.
P123- P <sub>atr1(502)</sub> ::mCherry	Amp, Cbx	p123-mCherry P <sub>etef</sub> ersetzt durch den Bereich - 502 bis Start vor <i>atr1</i> . Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer MD985 und MD986 amplifiziert. Das Fragment wurde mit <i>HindIII</i> und <i>NcoI</i> nachgeschnitten und in p123-mCherry eingebracht.
pLacZi-P <sub>cyp2</sub>	Amp, Ura	P <sub>cyp2</sub> kloniert in pLacZi. Amplifikation des <i>cyp2</i> Promotors durch die Primer ME1 und ME2. Das Fragment wurde mit <i>XhoI</i> nachgeschnitten und in pLacZi kloniert.
pAD2- <i>rua1</i>	Amp, Leu	Der ORF von <i>rua1</i> wurde in pAD2 kloniert. Amplifikation von <i>rua1</i> durch die Primer MD987 und MD988. Das Fragment wurde mit Hilfe des „Drag und Drop Systems“ in pAD2 kloniert.
pAD2- <i>rua1</i> <sub>N<math>\Delta</math>1-307</sub>	Amp, Leu	Der um 307 Aminosäuren N-terminal verkürzte Leserahmen von <i>rua1</i> wurde in pAD2 kloniert. Amplifikation von <i>rua1</i> <sub>N<math>\Delta</math>1-307</sub> durch die Primer ME350 und MD988. Das Fragment wurde mit Hilfe des „Drag und Drop Systems“ in pAD2 kloniert.
pAD2- <i>rua1</i> <sub>N<math>\Delta</math>1-576</sub>	Amp, Leu	Der um 576 Aminosäuren N-terminal verkürztes <i>rua1</i> Leserahmen wurde in pAD2 kloniert. Amplifikation von <i>rua1</i> <sub>N<math>\Delta</math>1-576</sub> durch die Primer ME351 und MD988. Das Fragment wurde mit Hilfe des „Drag und Drop Systems“ in pAD2 kloniert.

Name	Resistenz/ Selektion	Anmerkung
pLacZi-BD	Amp, Leu	Amplifikation des Promotorbereichs -667 bis -481 vor dem ORF von <i>atr1</i> durch die Primer MD982 und MD984. Das Fragment wurde mit <i>HindIII</i> nachgeschnitten und in pLacZi kloniert.
pLacZi-BD-UAS1*	Amp, Leu	Direkte Mutagenese der ersten UAS. Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer ME368 und MD984 sowie ME369 und MD982 amplifiziert. Über die Primer ME368 und ME369 wird die Mutation in Form einer <i>BssHII</i> Schnittstelle eingeführt. Das über <i>BssHII</i> im pJet1/blunt zusammenklonierte Fragment wurde mit <i>HindIII</i> ausgeschnitten und in pLacZi überführt.
pLacZi-BD-UAS2*	Amp, Leu	Direkte Mutagenese der zweiten UAS. Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer ME370 und MD984 sowie ME371 und MD982 amplifiziert. Über die Primer ME368 und ME369 wird die Mutation in Form einer <i>MluI</i> Schnittstelle eingeführt. Das über <i>MluI</i> im pJet1/blunt zusammenklonierte Fragment wurde mit <i>HindIII</i> ausgeschnitten und in pLacZi überführt.
pLacZi-BD-UAS1*+2*	Amp, Leu	Direkte Mutagenese beider UAS. Das Promotorfragment wurde unter Verwendung der Primer ME370 und MD984 sowie ME371 und MD982 amplifiziert. Als template-DNA dient der Vektor pLacZi-BD-UAS1*. Über die Primer ME368 und ME369 wird die Mutation in Form einer <i>MluI</i> Schnittstelle eingeführt. Das über <i>MluI</i> im pJet1/blunt zusammenklonierte Fragment wurde mit <i>HindIII</i> ausgeschnitten und in pLacZi überführt.

### 4.1.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide werden in der folgenden Tabelle aufgelistet. Sie wurden von den Firmen Biomers bzw. Sigma-Aldrich synthetisiert, die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben.

**Tabelle 14:** Verwendete Primer

<b>Primernummer:</b>	<b>Sequenz:</b>
MC343_250_100L1	gcgctgtggtcagccacgtg
MC344_250_100L2	cacggcctgagtggccgactgcgacgggatggtgattg
MC345_250_100R1	gtgggccatctaggccgcaagaagtgtctctcataac
MC346_250_100R2	gcgttgagccagaatggtcgccc
MD469_250_120L1neu	gcgctgcaggtcagcaatgcttttgc
MC325_250_120L2	cacggcctgagtggcctgatattgcagggtggtgctc
MC326_250_120R1	gtgggccatctaggcccgctgctaccgacgtaaaag
MD470_250_120R2neu	gcgctgcaggtcagcaatgacagagacgtg
MC846_250_140L1	gtatgcgccgcttctccggcgagagcac
MC847_250_140L2	cacggcctgagtggccgatcaggagtgtctgcttgatg
MC848_250_140R1	gtgggccatctaggccccacattgaaaaatttggctgacatgg
MC849_250_140R2	cacagcggccgacctgcccctgaagtgtg
MC717_250_150L1	gtatgcgccgcttctcagagctccatccacg
MC718_250_150L2	cacggcctgagtggcctgtgtagactgtatgtgtatac
MC719_250_150R1	gtgggccatctaggcctagtctgtcctagtcacac
MC720_250_150R2	cacagcggccgctctgggtggggcgttctg
MC840_250_160L1	gtatgcgccgctccacacacagtggaggg
MC841_250_160L2	cacggcctgagtggcctgtgagcagttgtacatgg
MC842_250_160R1	gtgggccatctaggcctgatagcaacggatgaaattcgtg
MC843_250_160R2	cacagcggccccaagaatgatgcttgcggg
MB736_WIgL1	ccagcgatgtcagcgcgtgcc
MD802_250_170L2	cacggcctgagtggcctgtgtgtaggagatggtcgtg
MD803250_170R1	gtgggccatctaggccttctgccaataccttcttgc
MB739_WIgR2	gtccaggtcaaggataccaggc
MD315_250_180L1	cacgatatcgcgctgccttgccaatttgc
MD316_250_180L2	cacggcctgagtggcctgtcggtcggcaccgtgagc
MD317_250_180R1	gtgggccatctaggccaccgcaatccaagtatttagc
MD318_250_180R2	gtggatatcggccgacctcgagaagcttgc
MC747_250_190L1	gtatgcgccgctccgtgcagttgattcgg
MC748_250_190L2	cacggcctgagtggccgctgaacgctatcaaagtg
MC749_250_190R1	gtgggccatctaggccagccgctcctcctgatcc
MC750_250_190R2	cacagcggccgctcctggacctgttggc
ME98_KO-140/160 PrL1	gtaacgccagggtttcccagtcacgacgaatattcttgataagcatgcagaag
ME99_KO-140/160 PrL2	ggtgcgccgcaattgtcagccatggtggccatctaggccctttagtctcaattg
ME100_KO-140/160 PrR1	gctgtaggagtgcggccgcatataggcctgagtggccctcagctctcaagctgccg
ME101_KO-140/160 PrR2	gcgataacaatttcacacaggaacagcaatatttctgagggttagcttgg
MD794_cyp2-PromL1	ggcaagcttgaagaagttgcttctctc
MD795_cyp2-PromL2	ggcaagcttctgctgaagcaatcgtgaagg
MD796_cyp2-PromL3	ggcaagcttgacagcggcatgcaagtgttg
MD976_cyp2-PromL4	ggcaagcttctgcttctcaagcgaagc
MD797_cyp2-PromR1-neu	gcgccatggcttggcggcggagggtggag
MD798_cyp1-PromL1	ggcggtagccacattgaaaaatttggctgac
MD800_cyp1-PromL3	ggcggtagcccccgaatcacgaatacc

ME172_cyp1PrR2	gcgccatgggtacgagaaaagcaggccac
ME469_cyp1-PromL4	ggcggtagcgcggctggcatgctggcctcc
ME214_cyp1-PrL4	ggccctgcaggcggatcacatcttcagcgg
ME223_cyp1PrR6	ggccctgcaggattgccgtttccagctcag
MD984_atr1-PromL1	ggcaagcttggcgtcgaatcgtgaatgcg
MD985_atr1-PromL2	ggcaagcttcgagcgcattgttacaactg
MD986_atr1-PromR	gcgccatggcttgggttttttttagttgac
MD982_fas2-PromL2	ggcaagcttcagttgtaacaatggcgcctcg
MD987_rua-pAD2-rec1	gaattcgatatcaagcttatcgataccgtcgacaatgccgatctctgctaccatagac
MD988_rua-pAD2-rec2	gcgtgacataactaattacatgactcgaggctcgacctatatgggacagcccgtgct
ME350_rua1-350N	gaattcgatatcaagcttatcgataccgtcgacaatggacgggacaggcgatttc
ME351_rua1-570N	gaattcgatatcaagcttatcgataccgtcgacaatgagcggatcggaacgcgagc
ME368_BD1mut-L	agaagcgcgcatagcattcatcgcc
ME369_BD1mut-R	ctatgcgcgcttctctcagtagctg
ME370_BD2mut-L	ctatacgcgttctgtatttccctgaatac
ME371_BD2mut-R	acagaacgcgtatagatcgaatac

## 4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 *E. coli*

#### **Anzucht von *E. coli* Zellen**

Zur Anzucht von *E. coli* in Flüssigkulturen wurden diese, soweit nicht anders erwähnt, in autoklaviertem LB-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37°C angezogen. Dem Medium wurde, wenn nötig, Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin mit einer Endkonzentration von 40 µg/ml zugesetzt.

Zur Kultivierung auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, wenn nötig, mit oben genannter Konzentration an Ampicillin oder Kanamycin. Zum Nachweis von β-Galaktosidase-Aktivität im Blau-Weiß-Screening wurde X-Gal mit einer Endkonzentration von 0,02% (w/v) zugegeben.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden Übernachtskulturen mit dYT-Glycerin-Medium in Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

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

Zur Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen wurde diese photometrisch mit dem Ultrospec 1000 Photometer der Fa. Pharmacia Biotech bei 600 nm gemessen. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden die Kulturen für die Messung der Optischen Dichte durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine OD<sub>600</sub> = 1,0 entsprechen etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### **Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen**

25 ml einer *E. coli* Übernachtskultur (DH5α) wurden in LB-Medium angeimpft. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zu 250 ml LB-Medium gegeben und weiter bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 0,5 wachsen gelassen. Dann wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend in 5 x 50 ml Falcon Röhrchen abzentrifugiert (5 Minuten, 4000 rpm, 0°C, Heraeus-Zentrifuge). Das Pellet wurde in 250 ml eiskaltem, sterilen Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert (5 Minuten, 4000 rpm, 0°C, Heraeus-Zentrifuge). Dieser Schritt wurde mit 50 ml eiskaltem, sterilen Wasser wiederholt. Dann wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem, 10%igem Glycerin aufgenommen und erneut wie oben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 2,5 ml eiskaltem, 10%igem Glycerin wiederholt. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl



eiskaltem, 10%igen Glycerin aufgenommen zu je 50  $\mu$ l in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und für den späteren Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen durch Elektroporation**

Für die Elektroporation wurden zwischen 10 und 100 ng DNA eingesetzt. DNA und Elektroporationsküvetten wurden auf Eis vorgekühlt und die elektrokompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Die DNA wurde zu den elektrokompetenten Zellen gegeben und eine Minute auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette gegeben und bei 125  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$  und 2,5 kV elektroporiert (Gene Pulser, Fa. Biorad). Es wurde darauf geachtet, dass der ausgegebene Wert für  $\tau$  bei 4,5 bis 4,7 ms liegt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 1 ml  $37^{\circ}\text{C}$  warmem SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert.

### **Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen**

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach einem Protokoll von (Hanahan *et al.*, 1991). 3 ml einer Übernachtskultur wurden in SOB-Medium angezogen und dann am nächsten Tag in etwa ein Liter SOB-Medium mit  $\text{Mg}^{2+}$  überimpft. Diese Kultur wurde bei RT solange schüttelnd inkubiert, bis eine  $\text{OD}_{600} = 0,3$  erreicht war. Die Zellen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (3000 rpm, 10 Minuten,  $0^{\circ}\text{C}$ , Heraeus-Zentrifuge), der Überstand abgegossen und in 1/3 Volumen CCMB-Puffer aufgenommen. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 20 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (700 rpm, 10 Minuten,  $0^{\circ}\text{C}$ , Heraeus-Zentrifuge) und das Pellet in 1/12 Volumen CCMB-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 50  $\mu$ l in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und für den späteren Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Transformation chemokompetenter *E. coli* Zellen**

Zur Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in chemokompetente *E. coli* Zellen wurden 10  $\mu$ l des Ligationsansatzes mit 50  $\mu$ l chemokompetenten Zellen versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für eine Minute auf  $42^{\circ}\text{C}$  gebracht und anschließend sofort mit 800  $\mu$ l dYT-Medium versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler bei 150 rpm. Anschließend wurden zwischen 100 und 200  $\mu$ l des Ansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

## 4.2.2 *U. maydis*

### **Anzucht von *U. maydis***

Zur Anzucht von *U. maydis* in Flüssigkulturen wurden diese in YEPS-Medium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Mediums geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Wenn nötig, wurde Hygromycin B (Endkonzentration 400 µg/ml), Nourseothricin (Endkonzentration 150 µg/ml) oder Carboxin (Endkonzentration 4 µg/ml) zugesetzt. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht bei 30°C.

Die Kultivierung auf Festmedium geschah auf PD-Agar, falls erforderlich mit oben genannter AB-Konzentration.

Für Dauerkulturen wurden Übernachtskulturen mit NSY-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

### **Protoplastierung von *U. maydis***

Aus einer *U. maydis* Vorkultur wurden 50 ml Hauptkultur in YEPS-Medium angeimpft und 24 Stunden bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,7$  wachsen gelassen. Die Kultur wurde abzentrifugiert (10 Minuten, 4000 rpm, 4°C, Heraeus-Zentrifuge), das Pellet in 10 ml SCS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml SCS und 1 ml SCS/Novozym (3 mg/ml) bzw. 1 ml SCS/Lysing Enzymes (10 mg/ml) aufgenommen und ca. 30 Minuten protoplastiert (Mikroskopische Kontrolle!). Anschließend wurden 10 ml SCS zugesetzt um die Protoplastierung zu stoppen und der Ansatz zentrifugiert (10 Minuten, 2300 rpm, 4°C, Heraeus-Zentrifuge). Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml SCS, dann einmal mit 10 ml STC gewaschen und in 500 µl STC aufgenommen und zu je 50 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und für den späteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

### **Transformation von *U. maydis* Protoplasten**

Für die Transformation von *U. maydis* wurden die Protoplasten auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA (~500 ng) versetzt. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 4°C inkubiert und dann mit 500 µl STC/PEG gemischt. Durch die Zugabe von PEG wurden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel und diese kann in die Protoplasten aufgenommen werden. Nach erneuter Inkubation 15 Minuten bei 4°C wurden die Zellen auf Regenerationsagarplatten mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz ausgestrichen. Die Platten enthalten als untere Schicht 10 ml Regenerationsagar mit einer zweifachen Antibiotika-Konzentration und darüber 10 ml

Regenerationsagar ohne Antibiotikum. Es kommt zur Diffusion des Antibiotikums durch den Agar und mit der Zeit stellt sich die übliche Konzentration an Antibiotikum ein, so dass bis dahin die Resistenz in den transformierten Protoplasten zur Ausprägung kommen kann. Die Platten wurden dann mehrere Tage bei 30°C inkubiert und gebildete Kolonien auf PD-Agar mit Antibiotikum vereinzelt.

### **Test auf Toxizität**

Ustilaginsäure wirkt als Antibiotikum gegenüber anderen Mikroorganismen, wie z.B. Hefen. Um zu testen, ob die hergestellten *U. maydis* Stämme noch toxisch gegenüber anderen Organismen sind, werden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen dem Überstand bzw. den Glycolipiden einer *U. maydis* Kultur ausgesetzt. Der Überstand enthält die extrazellulären Glycolipide, die von *U. maydis* produziert wurden. Dazu wurden 100 µl einer in YEPS gewachsenen *U. maydis*-Vorkultur in 9 ml YNB Medium mit 5% Glucose angeimpft und drei Tage bei 30°C schüttelnd inkubiert. Dann wurden die Zellen 15 Minuten bei 60°C abgetötet und abzentrifugiert (4300 rpm, 15 Minuten, RT, Heraeus-Zentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen. 5 ml des Überstandes wurden mit 4 ml frischem YNB, 5% Glucose und 0,2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gemischt. Die jeweiligen Ansätze wurden mit 100 µl einer frischen Hefekultur, OD<sub>600</sub> = 0,800, beimpft. Die Hefen wurden bei 30°C schüttelnd inkubiert und nach einer Stunde wurden Proben genommen. Es wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt mit den Verdünnungsschritten: unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000. 10 µl der verdünnten Hefekulturen wurden auf YEPD Platten getropft und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Test auf Hefenwachstum ausgewertet.

### **Mikroskopie**

Um *U. maydis* Zellen zellmorphologisch beurteilen zu können, und um Glycolipidbildung erkennen zu können, wurde ein Lichtmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung der Firma Zeiss verwendet. Die Glycolipide lassen sich hierbei im Fall der Ustilaginsäure als lange lichtbrechende Nadeln und im Fall der Mannosylerytritollipide als Öltropfen beobachten.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop der Fa. Zeiss (Axiophot 2). Für die Mikroskopie wurden 5 µl einer frischen Übernachtskultur auf einen, mit 1,5%iger Agarose beschichteten Objektträger aufgetropft und dieser mit einem Deckglas versehen. Die Mikroskopie erfolgte unter DIC-Belichtung oder mittels Epifluoreszenz. Hierbei wurde der Rhodamin Farbfilter (Anregung: 546 nm, Farbteiler: 580 nm, Emission: >590 nm)

verwendet. Aufnahmen wurden mit einer hoch auflösenden CCD-Kamera (Typ Mega Fire, INTAS) und der Software MagnaFire 2.0 erstellt.

### **Infektion von Maispflanzen und Isolierung haploider *U. maydis* Nachkommen**

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurde Stämme benutzt, die keine MELs mehr produzierten. Dazu wurden Doppeldeletionsstämme hergestellt, indem die verschiedenen UA-Mutantenstämme mit einem  $\Delta emt$ -Stamm gekreuzt wurden. Für die Kreuzung der verschiedenen Stämme für die Produktion von Nachkommen mit Doppeldeletionen wurden Maispflanzen mit *U. maydis* infiziert. Dafür wurden Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam angepflanzt und bis zu einer Höhe von ca. 10 cm wachsen gelassen. Für die Infektion mit *U. maydis* Zellen wurden diese aus einer Vorkultur in 20 ml YEPS-Medium angeimpft und bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,8$  angezogen. Die Kulturen wurden 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und anschließend auf etwa ein Zehntel konzentriert. Die entsprechenden Kreuzungspartner wurden miteinander im Verhältnis 1:1 gemischt und je 200  $\mu$ l in den Stängel einer Pflanze injiziert. Als Anzeichen für Pathogenität zeigten sich nach 1 bis 2 Wochen Chlorose, Anthocyan- und Tumorbildung an den grünen Teilen der Pflanze. Für die Isolierung von Nachkommen wurden die Tumore so lange wachsen gelassen, bis sie sich schwärzlich verfärbten. Dann wurden die Tumore abgeschnitten und die Sporenmasse aus den Tumoren auf 2%igem Wasseragar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und mehrere Tage bei 30°C inkubiert. Die auskeimenden Sporen wurden unter dem Mikroskop gepickt und zweimal auf PD Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum vereinzelt. Die Identifizierung der Doppelmutanten erfolgte mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie.

### **4.2.3 *S. cerevisiae***

#### **Anzucht von *S. cerevisiae***

Zur Anzucht von *S. cerevisiae* in Flüssigkulturen wurden diese in YEPD-Medium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Medium geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Stämme, die einen Selektionsmarker auf einem externen Plasmid tragen, wurden in Hefe-Selektionsmedium angezogen, das sämtliche Aminosäuren enthält, mit Ausnahme derjenigen, auf die selektioniert werden sollte.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht bei 30°C. Die Kultivierung auf Festmedium geschah auf YEPD-Agar oder Selektionsagar.

Für Dauerkulturen wurden Übernachtskulturen mit NSY-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

### **Transformation von *S. cerevisiae***

Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurde der zu transformierende Stamm in 50 ml YEPD oder Selektionsmedium über Nacht bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 1,5 angezogen. Die Kultur wurde abzentrifugiert (3000 rpm, 3 Minuten, Heraeus-Zentrifuge), das Zellpellet in einem der Anzahl der Transformationen angepassten Volumen LiT aufgenommen (100 µl ≈ 1 Transformation) und in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Zu dem Ansatz werden 5 µl (10 mg/ml) denaturierte (5 min auf 95°C erhitzt, dann auf Eis abgekühlt) Heringssperma-DNA, sowie etwa 1 µg Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wird mit 500 µl LiT-PEG gemischt und für etwa 1 Stunde bei RT rollend inkubiert. Anschließend werden 50 µl DMSO dazugegeben und es erfolgt eine Hitzeschockbehandlung für 15 Minuten bei 42°C. Der Ansatz wird abzentrifugiert (30 Sekunden, 3000 rpm, Tischzentrifuge), die Zellen in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, auf Selektivagarplatten ausplattiert und für mehrere Tage bei 30°C inkubiert.

## **4.3 Molekularbiologische Standardmethoden**

### **4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch kochende Lyse (nach: (Sambrook et al., 1989))**

1,5 ml einer gut gewachsenen Bakterienkultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß eine Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet, das Zellpellet in 350 µl STET-Puffer und 25 µl Lysozym aufgenommen und 10 Minuten bei RT auf dem Schüttler resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz genau 40 Sekunden bei 95°C erhitzt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Minuten wurde das Pellet mit einem Zahnstocher entfernt. Durch Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat und 400 µl Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und anschließend durch Zentrifugation (10 Minuten bei 13000 rpm) gefällt.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 30  $\mu$ l TE-Puffer mit 20  $\mu$ g/ml RNase A aufgenommen und gelöst.

### **Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* durch alkalische Lyse**

Diese Methode wird für Low-copy-Plasmide, Cosmide und Endonuclease A produzierende Stämme verwendet und erfolgt nach einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach J. Sambrook (Sambrook et al., 1989).

1,5 ml gut gewachsene Bakterienkultur werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (13000 rpm, 1 Minute, RT, Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttelt und das Zellpellet in 100  $\mu$ l Sol A resuspendiert. 200  $\mu$ l Sol B werden zugesetzt und der Ansatz wird vorsichtig gemischt. Anschließend werden 150  $\mu$ l eiskalte Sol C zugegeben, gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, RT, Tischzentrifuge) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 400  $\mu$ l Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, RT, Tischzentrifuge). Die obere Phase wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zugabe von 1 ml 96% igem Ethanol wird die DNA im anschließenden Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 15 min, 4°C, Tischzentrifuge) gefällt. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wird in 30  $\mu$ l TE-Puffer mit 20  $\mu$ g/ml Rnase A aufgenommen und gelöst.

### **Präparation chromosomaler DNA aus *U. maydis***

30 ml Übernachtskultur wurden bis zu einer  $OD_{600} < 1$  wachsen gelassen. Die Kultur wurde in 15 ml Falcon-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (4000 rpm, 10 Minuten, RT, Heraeus-Zentrifuge), das Pellet in 400  $\mu$ l Lysispuffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Ansatz wurden 0,3 g Glasperlen ( $\varnothing 600 \mu$ m) gegeben, gemischt und mit 400  $\mu$ l Phenol : Chloroform (1:1) überschichtet. Durch 5 minütiges vortexen wurden die Zellen aufgebrochen und anschließend die Zelltrümmer abzentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, RT, Tischzentrifuge). Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 400  $\mu$ l Phenol : Chloroform (1:1) sowie mit 5,5  $\mu$ l 7,5 M Ammoniumacetat überschichtet. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 10 Minuten, RT, Tischzentrifuge) wurde die obere Phase abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml 96%igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C, Tischzentrifuge) wurde die DNA gefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und

anschließend in 50 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml Rnase A aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

### **Präparation von RNA aus *U. maydis***

10 ml Kultur wurden abzentrifugiert, in 400 µl AE aufgenommen und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch schnelle Zugabe von 40 µl 10%igem SDS und 440 µl 65°C heißem Phenol : AE (1:1) wurden die RNAsen zerstört und die RNA extrahiert. Der Ansatz wurde zunächst 10 Minuten bei 65°C schüttelnd inkubiert, dann 5 Minuten bei -80°C tiefgefroren und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 400 µl Phenol : Chlorophorm (1:1) und anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C, Tischzentrifuge) wurde die RNA weiter gereinigt. Der Überstand wurde erneut abgenommen. Die RNA wurde nun durch Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat pH 5,3 und 1 ml 96%igem Ethanol mit anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C, Tischzentrifuge) gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen und dann in 20 µl sterilem Wasser aufgenommen. Die RNA wird bei -80°C für späteren Gebrauch gelagert.

### **Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wird das High-Speed Plasmid Mini Kit der Fa. Avestra verändert verwendet. Von einer dicht bewachsenen Petrischale wird etwa eine halbe Platte abgekratzt, in 1 ml Wasser gelöst und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (13000 rpm, 1 Minute, RT, Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, das Pellet in 200 µl PD1 Puffer gelöst und mit etwa 0,3 g Glasperlen (Ø600 µm) versetzt. Der Ansatz wird 15 Minuten bei 1200rpm geschüttelt. Anschließend wird der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl PD2 versetzt, vorsichtig gemischt, 2 Minuten inkubiert und dann mit 300 µl PD3 gemischt. Anschließend erfolgt ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt. Der Überstand wird auf eine Säule gegeben und abzentrifugiert. Die Säule wird mit 600 µl Waschpuffer gewaschen und die DNA anschließend mit etwa 30 µl Elutionspuffer eluiert.

### 4.3.2 Analyse, Modifikation und Klonierung von Nukleinsäuren

#### **In vitro-Modifikationen von DNA**

In vitro Standard-Modifikationen wie die Restriktion von DNA, Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach J. Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) und nach Anleitung der Hersteller durchgeführt.

#### **Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese**

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden in der Regel 1%ige Agarosegele gefahren. Die Agarose wird in 1xTAE Puffer aufgenommen und durch aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Wenn das Gel auf etwa 60°C abgekühlt ist wurde zum Färben der DNA Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugesetzt und das Gel in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde das Gel in eine Gelkammer mit 1xTAE Puffer gegeben. Die DNA Proben wurden mit 10xDNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gefüllt. Als Größen-Standard diente mit *Pst*I vollständig geschnittene λ-DNA (siehe Kapitel 4.1.7). Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 120 V etwa 20 Minuten je nach Größe der DNA Fragmente. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (304 nm) mit einem Geldokumentationssystem (Biotec-Fischer) detektiert und auf Thermopapier photographisch dokumentiert.

#### **Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach der Gelelektrophorese konnten einzelne Banden aus den Agarosegelen ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert werden. Hierzu wurde das Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit der Firma Avegene bzw. das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit der Firma Promega nach Herstellerangaben verwendet.

#### **Denaturierende Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese von RNA**

Bei dieser Methode wurde die RNA vor der Auftrennung mit Glyoxal und DMSO versetzt, was zur Denaturierung und zum Auflösen von Sekundärstrukturen der RNA führt. 2,5 µg der RNA Probe wurden hierbei mit 5 µl 10x MOPS-Puffer, 5 µl 8 M Glyoxal, 10 µl DMSO gemischt und eine Stunde bei 50°C denaturiert. Anschließend wurde die Probe mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1% MOPS Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 90 V etwa zwei Stunden. Alle halbe Stunde wurde dabei das Gel umgedreht und die



Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten.

### **Bestimmung der DNA-Konzentration durch gelelektrophoretische Auftrennung**

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurden verschiedene Verdünnungen auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen. Als Mengen-Referenz diente  $\lambda$ -DNA (10 und 30 ng). Nach kurzer Gelelektrophorese konnte die Konzentration anhand der Bandenintensität im Vergleich zur  $\lambda$ -DNA ermittelt werden.

### **Transfer und Detektion von DNA auf Membranen**

Zur Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten bestimmter Größen wurde die Southern-Blotting-Methode durchgeführt (Southern, 1975). Hierbei wurde die DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und die Fragmente mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA wurde denaturiert und vom Gel auf eine Nylon Transfer-Membran übertragen. Die DNA wurde anschließend auf der Membran fixiert und konnte dann mittels Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

### **Transfer von DNA (Southern-Blotting)**

Für die Detektion von DNA mittels Southern-Blotting wurde die DNA etwa 5 Stunden mit einem geeigneten Restriktionsenzym in einem Volumen von 200  $\mu$ l verdaut. Durch eine Isopropanolfällung wurde der Ansatz konzentriert und in 20  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. Der Restriktionsansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel (90 mV, 2h) aufgetrennt. Vor dem Blotten wurde das Gel 15 Minuten in 0,25 M HCl geschwenkt. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten in 0,5 M NaOH geschwenkt, welche gleichzeitig als Transferpuffer für den folgenden Transfer auf eine positiv geladene Nylontransfermembran diente. Für den Transfer wurde das Gel in eine aufwärtsgerichtete Blotapparatur eingespannt. Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran 30 Minuten getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm<sup>2</sup>) im Stratalinker 2400 (Stratagene) kovalent mit der Membran verknüpft. Die Membran wurde eingeschweißt und bis zur Behandlung mit einer Sonde bei 4°C gelagert.

### **Southern Hybridisierung: Spezifischer Nachweis von Membran gebundener DNA**

Zum Nachweis der DNA auf der Nylonmembran wurde diese mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Dazu wurde die Membran bei 65°C eine Stunde mit

etwa 20 ml Southern-Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer gewechselt und die radioaktiv markierte Sonde in die Hybridisierungsröhre zur Membran dazugegeben (Endkonzentration etwa  $10^6$  cpm/ml). Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte bei 65°C über Nacht. Danach wurde die Membran zweimal mit Southern Waschpuffer für 20 Minuten gewaschen, getrocknet, eingeschweißt und in einer Phosphoimager Kassette exponiert. Die Detektion der radioaktiven Signale wurde dann mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, der Firma Amersham, Braunschweig) ausgewertet.

### **Transfer von RNA (Northern-Blotting)**

Für die Detektion isolierter RNA wurde diese mittels einer denaturierenden Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese in einem 1%igen Mops-Gel, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, aufgetrennt. Das Gel, das deutlich die 18S- und 28S-rRNA-Banden zeigt, wurde zur Dokumentation fotografiert und anschließend 15 Minuten in 20x SSC geschwenkt. Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot wie bei der Methode des Southern-Blots beschrieben. Als Transferpuffer diente 20x SSC, das Blotten erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm<sup>2</sup>) im Stratalinker 2400 (Stratagene) kovalent mit der Membran verknüpft. Die Membran wurde eingeschweißt und bis zur Behandlung mit einer Sonde bei 4°C gelagert.

### **Northern-Hybridisierung: Spezifischer Nachweis immobilisierter RNA im Northern-Blot**

Zum Nachweis der RNA auf der Nylonmembran wurde diese mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Dazu wurde die Membran bei 65°C eine Stunde mit etwa 20 ml Northern-Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer gewechselt und die radioaktiv markierte Sonde in die Hybridisierungsröhre zur Membran dazugegeben (Endkonzentration etwa  $10^6$  cpm/ml). Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte bei 65°C über Nacht. Danach wurde die Membran zweimal mit Northern Waschpuffer für 20 Minuten gewaschen, getrocknet, eingeschweißt und in einer Phosphoimager Kassette exponiert. Die Detektion der radioaktiven Signale wurde dann mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, der Fa. Amersham, Braunschweig) ausgewertet.

### Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern- und Southern-Analysen

Radioaktiv markierte Sonden wurden mit Hilfe des Megaprime™ DNA Labelling system Kit (Amersham Biosciences) hergestellt. Dazu wurde ein Reaktionsansatz angesetzt, der 25 ng Sonden-DNA mit einer Länge von etwa 500 bp, 5 µl Primer, eine Lösung die aus Hexanucleotiden mit Zufallssequenzen besteht, und soviel destilliertes Wasser enthält, dass das Endvolumen 50 µl beträgt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 95°C gekocht und kurz auf Eis gestellt. Dazu wurden 10 µl Reaktionspuffer der neben Puffersubstanzen dATP, dGTP und dTTP enthält, 5 µl α<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol) und 2 µl Klenow Polymerase gegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, und anschließend wurde die Reaktion mit 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Der Ansatz wurde mit Hilfe einer Mobitec S-200 Säule durch Zentrifugation aufgereinigt, um nicht eingebaute Nucleotide zu entfernen. Durch 5 minütiges Kochen bei 95°C wurde die doppelsträngige Sonde denaturiert. Anschließend erfolgte eine kurze Inkubation auf Eis. Dann wurde die Sonde zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht.

### DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung einer DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide nach Sanger (Sanger et al., 1977) gewählt. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA dient hierbei während einer Polymerase-Kettenreaktion als Matrize. Die Didesoxyribonucleotide, die zum Kettenabbruch führen, sind mit verschiedenen Fluoreszenzträgern markiert. Es wurden 5 pmol Primer und ca. 400 ng gelöste DNA je Reaktion eingesetzt. Diese Komponenten wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl BigDye Terminator v3.1 Cycle Mix und 3 µl Reaktionspuffer versetzt und einer PCR mit folgenden Parametern unterworfen:

	1 min,	99°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt	
25x	{	10 s,	96°C	Denaturierung
		30 s,	50°C	Anlagerung der Primer
	{	4 min,	60°C	Elongation

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 10 µl 125 mM EDTA, 9 µl 3 M Natriumacetat, 80 µl Wasser und 400 µl Ethanol (96%) gefällt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge. Anschließend wurde zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen

und jeweils für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl Formamid-Mix resuspendiert und zur Sequenzierung abgegeben.

### 4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Als Polymerase wurde die hitzestabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, welche ebenfalls hitzestabil ist und außerdem eine 3'-5' Exonukleasefunktion besitzt, verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock (Biometra) oder einem Personal Cycler (Biometra) durchgeführt.

#### Ein typischer PCR-Ansatz enthält:

20-50 ng DNA  
 1,5 µl Primer 1 (25 pmol/µl)  
 1,5 µl Primer 2 (25 pmol/µl)  
 1,5 µl dNTPs (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)  
 1 µl DNA-Polymerase (1 U/µl)  
 5 µl 10x PCR-Puffer  
 in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
 (überschichtet mit ca. 50 µl Paraffin).

#### PCR-Programm:

	4 min,	95°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt	
30-35x	}	1 min,	94°C	Denaturierung
		1 min,	40-70°C	Anlagerung der Primer, Temperatur abhängig vom Primer
		1 min je 1 kb,	72°C	Elongation
	10 min,	72°C	finale Polymerisation	

Die Wahl der Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Diese ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der Primer mit DNA gepaart, die andere Hälfte aber ungebunden vorliegt. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5°C niedriger als die Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur gewählt.

Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 Reinigung und Nachweis von Glycolipiden

#### **Glycolipid-Isolierung aus *U. maydis***

*U. maydis* produziert unter Stickstoffmangelbedingungen Glycolipide wie Ustilaginsäure. Als Medium wurde daher YNB-Medium mit 5% Glukose verwendet. YNB-Medium enthält keine Stickstoffquelle, so dass innerhalb kurzer Zeit sehr viele Glycolipide produziert werden können. Falls nicht anders angegeben, wurde aus einer YEPS-Flüssigkultur 1:100 angeimpft.

100 µl gut gewachsene Kultur wurden mit 9 ml YNB-Medium und 1 ml 50%iger Glucose gemischt und 2-3 Tage bei 30°C schüttelnd inkubiert. Von der Kultur wurden 0,5 ml abgenommen und mit 0,5 ml Ethylacetat gemischt. Der Ansatz wurde gevortext und 10 Minuten auf einem Mixer der Fa. Eppendorf geschüttelt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 Minuten, RT, Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und die Flüssigkeit bei 70°C und 600 rpm eingedampft.

#### **Nachweis der gereinigten Glycolipide mittels Dünnschichtchromatographie (DC)**

Der Nachweis der gereinigten Glycolipide erfolgte über DC. Die eingedampften Glycolipide wurden in 15 µl Methanol gelöst und auf eine DC-Aluminium-Platte mit Kieselgel als Trägermaterial (Merck) aufgetropft und 5 Minuten bei RT getrocknet. Als Laufmittel diente ein Chloroform : Methanol : H<sub>2</sub>O (65:25:4) Gemisch, in dem die Glycolipide soweit aufgetrennt wurden, dass die einzelnen Modifikationen sichtbar wurden. Die DC erfolgte für 25 Minuten bei RT, bis die Lauffront das Ende der Platte erreichte. Die Platte wurde für ca. 10 min an der Luft bei RT getrocknet. Zur Detektion der Glycolipide wurde die DC-Platte mit einem Gemisch aus Eisessig : Schwefelsäure : Anisaldehyd (50:1:0,5) besprüht. Nach 15 min Trocknen an der Luft wurde die DC-Platte für 2 min bei 150°C gebacken, bis die Glycolipide als Banden sichtbar wurden.

## 4.4.2 Promotorbindestudien

### **β-Galactosidasetest (Filtermethode)**

Eine gut gewachsene Hefekolonie wurde auf einen Nitrocellulosefilter überführt. Dieser wurde für etwa 10 Minuten in flüssigem Stickstoff inkubiert, kurz an der Luft getrocknet und dann in eine Petrischale auf ein Whatmanpapier gelegt. Der Filter wurde mit 3 ml Z-Puffer, dem 40 µl X-Gal und 10 µl β-Mercaptoethanol zugesetzt worden waren, überschichtet. Es erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bis über Nacht.

### **β-Galactosidasetest (Flüssigtest)**

Von den gewachsenen Hefekulturen wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die Zellen sollten alle im gleichen linearen Bereich liegen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (1200 rpm, 5 Minuten, RT, Tischzentrifuge), das Pellet in 1 ml Z-Puffer aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Z-Puffer aufgenommen und 100 µl wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Kontrolle wurden außerdem 100 µl Z-Puffer in ein Reaktionsgefäß getan. Die Ansätze wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend wieder aufgetaut. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Zu den Zellen wurden dann 700 µl Z-Puffer, dem 20 µl β-Mercaptoethanol zugesetzt worden war, sowie 160 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer), gegeben. Ab jetzt wurde die Zeit gestoppt, bis die Positivkontrolle deutlich gelb gefärbt war. Dann wurde die Reaktion mit 400 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt und die OD<sub>420</sub> bestimmt. Die Miller-Units wurden wie folgt berechnet:

$$\frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{V \times \text{OD}_{600}}$$

## 4.5 Massenspektrometrische Untersuchungen

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die zu messenden, eingedampften Proben in 100 µl 50 %igem Methanol aufgenommen und über HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) aufgereinigt (1100, Agilent, Germany). Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten über ein 1100 MSD-A ESI-Quadrupol Massenspektrometer (Agilent, Germany). Die Proben (jeweils 95 µl) wurden über eine 250/3-Nucleosil-C8-Säule mit einer Partikelgröße von 3 mm (Macherey-Nagel, Germany) gegeben. Der Gradient von Solvent A (Wasser mit 0,05% Ameisensäure) und Solvent B (Methanol mit 0,045% Ameisensäure) sah wie folgt aus:

linear von 60% B zu 95% B in 30 Minuten, ansteigend dann 10 Minuten auf 95% B gehalten. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min und die Säulentemperatur betrug 45°C. Die UV-Detektion erfolgte bei 215 nm.

Die ESI (electrospray ionization)-MS<sup>n</sup> Massenspektrometrie für die hochaufgelösten Massenspektren und Strukturaufklärung wurden mit dem LTQ-FT Finnigan (Thermo, Electron, Bremen) durchgeführt, ausgestattet mit einer statischen Nanosprayquelle. Exakte Massen und chemische Formeln wurden mit Hilfe des FT Massenanalyser, der mit einer Auflösung von 100000 arbeitet, ermittelt. Die fragmentierten Ionen wurden wahlweise mit dem LTQ oder dem FT Massenanalyser gemessen.

## 5. Literaturverzeichnis

- Avis, T.J., and Bélanger, R.R. (2002) Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. *FEMS Yeast Res* **2**: 5-8.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1989) Different *a* alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5878-5882.
- Banuett, F. (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., and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976.
- Bard, M., Bruner, D.A., Pierson, C.A., Lees, N.D., Biermann, B., Frye, L., Koegel, C., and Barbuch, R. (1996) Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 186-190.
- Bélanger, R.R., Dik, A.J., and Menzies, J.G. (1998) Powdery mildews: recent advances toward integrated control. *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*: 89-109.
- Bellamacina, C.R. (1996) The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *Faseb J* **10**: 1257-1269.
- Bok, J.W., and Keller, N.P. (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* **3**: 527-535.
- Bok, J.W., Hoffmeister, D., Maggio-Hall, L.A., Murillo, R., Glasner, J.D., and Keller, N.P. (2006a) Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol* **13**: 31-37.
- Bok, J.W., Noordermeer, D., Kale, S.P., and Keller, N.P. (2006b) Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**: 1636-1645.
- Boss, P.K., Davies, C., and Robinson, S.P. (1996a) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol Biol* **32**: 565-569.
- Boss, P.K., Davies, C., and Robinson, S.P. (1996b) Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation. *Plant Physiol* **111**: 1059-1066.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., and Feldbrugge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**: 216-226.
- Breithaupt, T.B., and Light, R.J. (1982) Affinity chromatography and further characterization of the glucosyltransferases involved in hydroxydocosanoic acid sophoroside production in *Candida bogoriensis*. *J Biol Chem* **257**: 9622-9628.
- Brown, D.W., Adams, T.H., and Keller, N.P. (1996a) *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14873-14877.
- Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H., and Leonard, T.J. (1996b) Twenty-five coregulated transcripts



- define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1418-1422.
- Budde, A.D., and Leong, S.A. (1989) Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* **108**: 125-133.
- Cajan, J.C. (2008) Molekulare Charakterisierung der primären Fettsäuresynthese in *Ustilago maydis*. *Bachelorarbeit*.
- Caliaro, M. (2006) Analyse von Genen des Ustilaginsäure- und Mannosylerythritollipid-Stoffwechsels bei *Ustilago maydis*. *Diplomarbeit*.
- Cheng, Y., McNally, D.J., Labbe, C., Voyer, N., Belzile, F., and Belanger, R.R. (2003) Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2595-2602.
- Choo, Y. (1998) End effects in DNA recognition by zinc finger arrays. *Nucleic Acids Res* **26**: 554-557.
- Damiani, I., Morreel, K., Danoun, S., Goeminne, G., Yahiaoui, N., Marque, C., Kopka, J., Messens, E., Goffner, D., Boerjan, W., Boudet, A.M., and Rochange, S. (2005) Metabolite profiling reveals a role for atypical cinnamyl alcohol dehydrogenase CAD1 in the synthesis of coniferyl alcohol in tobacco xylem. *Plant Mol Biol* **59**: 753-769.
- Darnet, S., Bard, M., and Rahier, A. (2001) Functional identification of sterol-4alpha-methyl oxidase cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by complementation of a yeast *erg25* mutant lacking sterol-4alpha-methyl oxidation. *FEBS Lett* **508**: 39-43.
- Darnet, S., and Rahier, A. (2004) Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4alpha-methyl oxidases. *Biochem J* **378**: 889-898.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J., and Hartman, P.E. (1966) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* **54**: 61-76.
- Desai, J.D., and Banat, I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 47-64.
- Diez, B., Gutierrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H., and Martin, J.F. (1990) The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J Biol Chem* **265**: 16358-16365.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Bhatnagar, D., and Cleveland, T.E. (1998) Alteration of different domains in AFLR affects aflatoxin pathway metabolism in *Aspergillus parasiticus* transformants. *Fungal Genet Biol* **23**: 279-287.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kamper, J., Muller, P., and Kahmann, R. (2006) A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**: 3332-3345.
- Elrod-Erickson, M., Rould, M.A., Nekludova, L., and Pabo, C.O. (1996) Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Structure* **4**: 1171-1180.
- Fernandes, M., Keller, N.P., and Adams, T.H. (1998) Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol Microbiol* **28**: 1355-1365.
- Finley, D., Ozkaynak, E., and Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**: 1035-1046.
- Fluharty, A.L., and O'Brien, J.S. (1969) A mannose- and erythritol-containing glycolipid from *Ustilago maydis*. *Biochemistry* **8**: 2627-2632.

- Fujii, K., Kurata, H., Odashima, S., and Hatsuda, Y. (1976) Tumor induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystin in newborn mice. *Cancer Res* **36**: 1615-1618.
- Guillen, P., Guis, M., Martinez-Reina, G., Colrat, S., Dalmayrac, S., Deswarte, C., Bouzayen, M., Roustan, J.P., Fallot, J., Pech, J.C., and Latche, A. (1998) A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Vigna radiata* confers resistance to the grapevine fungal toxin eutypine. *Plant J* **16**: 335-343.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F.R. (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**: 63-113.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R., and Bölker, M. (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Embo J* **15**: 1632-1641.
- Haskins, R.H. (1950) Biochemistry of the ustilaginales. I. Preliminary cultural studies of *ustilago zaeae*. *Can J Res* **28**: 213-223.
- Haskins, R.H., and Thorn, J.A. (1951) Biochemistry of the ustilaginales. VII. Antibiotic activity of ustilagic acid. *Can J Bot* **29**: 585-592.
- Haskins, R.H., Thorn, J.A., and Boothroyd, B. (1955) Biochemistry of the Ustilaginales. XI. Metabolic products of *Ustilago zaeae* in submerged culture. *Can J Microbiol* **1**: 749-756.
- Hewald, S., Josephs, K., and Bölker, M. (2005) Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3033-3040.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M.A., Kämper, J., and Bölker, M. (2006) Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5469-5477.
- Hohn, T.M., McCormick, S.P., and Desjardins, A.E. (1993) Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr Genet* **24**: 291-295.
- Hölzl, G., Leipelt, M., Ott, C., Zahringer, U., Lindner, B., Warnecke, D., and Heinz, E. (2005) Processive lipid galactosyl/glucosyltransferases from *Agrobacterium tumefaciens* and *Mesorhizobium loti* display multiple specificities. *Glycobiology* **15**: 874-886.
- Iuchi, S. (2001) Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**: 625-635.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2005) Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* **344**: 43-51.
- Jorasch, P., Wolter, F.P., Zahringer, U., and Heinz, E. (1998) A UDP glucosyltransferase from *Bacillus subtilis* successively transfers up to four glucose residues to 1,2-diacylglycerol: expression of ypfP in *Escherichia coli* and structural analysis of its reaction products. *Mol Microbiol* **29**: 419-430.
- Kadonaga, J.T. (2002) The DPE, a core Promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* **34**: 259-264.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., and Kämper, J. (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. *Fungal Pathology. Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands*.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Muller, O., Perlin, M.H., Wosten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A.,

- Greilinger, D., Munch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B.W. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97-101.
- Keller, N.P., and Hohn, T.M. (1997) Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genet Biol* **21**: 17-29.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Ding, C.K., Yakushiji, H., and Goto, N. (2001) Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci* **160**: 543-550.
- Kulakovskaya, T.V., Kulakovskaya, E.V., and Golubev, W.I. (2003) ATP leakage from yeast cells treated by extracellular glycolipids of *Pseudozyma fusiformata*. *FEMS Yeast Res* **3**: 401-404.
- Kulakovskaya, T.V., Shashkov, A.S., Kulakovskaya, E.V., and Golubev, W.I. (2005) Ustilagic acid secretion by *Pseudozyma fusiformata* strains. *FEMS Yeast Res* **5**: 919-923.
- Lamba, J.K., Lin, Y.S., Schuetz, E.G., and Thummel, K.E. (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* **54**: 1271-1294.
- Le Bouquin, R., Pinot, F., Benveniste, I., Salaun, J.P., and Durst, F. (1999) Cloning and functional characterization of CYP94A2, a medium chain fatty acid hydroxylase from *Vicia sativa*. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 156-162.
- Leibundgut, M., Jenni, S., Frick, C., and Ban, N. (2007) Structural basis for substrate delivery by acyl carrier protein in the yeast fatty acid synthase. *Science* **316**: 288-290.
- Lemieux, R.U. (1953) Biochemistry of the Ustilaginales: VIII. The structures and configurations of the ustilic acids. *Can J Chem* **29**: 415-425.
- Liu, J., Wilson, T.E., Milbrandt, J., and Johnston, M. (1993) Identifying DNA-binding sites and analysing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **5**: 125-137.
- Liu, L. (2007) Untersuchungen zur stickstoffabhängigen Regulation der Glykolipidbiosynthese in *Ustilago maydis*. *Diplomarbeit*.
- Ma, X., Koepke, J., Panjekar, S., Fritzsche, G., and Stockigt, J. (2005) Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J Biol Chem* **280**: 13576-13583.
- Mathison, L., Soliday, C., Stepan, T., Aldrich, T., and Rambosek, J. (1993) Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase. *Curr Genet* **23**: 33-41.
- Mayser, P., Wille, G., Imkamp, A., Thoma, W., Arnold, N., and Monsees, T. (1998) Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* **41**: 265-271.
- Mimee, B., Labbe, C., Pelletier, R., and Belanger, R.R. (2005) Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1597-1599.

- Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122.
- Neilands, J.B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**: 26723-26726.
- Novina, C.D., and Roy, A.L. (1996) Core Promoters and transcriptional control. *Trends Genet* **12**: 351-355.
- Nussinov, R., Owens, J., and Maizel, J.V., Jr. (1986) Sequence signals in eukaryotic upstream regions. *Biochim Biophys Acta* **866**: 109-119.
- Odenbach, D., Breth, B., Thines, E., Weber, R.W., Anke, H., and Foster, A.J. (2007) The transcription factor Con7p is a central regulator of infection-related morphogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Microbiol* **64**: 293-307.
- Paulitz, T.C., and Bélanger, R.R. (2001) Biological control in greenhouse systems. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 103-133.
- Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**: 809-817.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., and Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 553-563.
- Pinot, F., Benveniste, I., Salaun, J.P., Loreau, O., Noel, J.P., Schreiber, L., and Durst, F. (1999) Production in vitro by the cytochrome P450 CYP94A1 of major C18 cutin monomers and potential messengers in plant-pathogen interactions: enantioselectivity studies. *Biochem J* **342** ( Pt 1): 27-32.
- Puchkov, E.O., Wiese, A., Seydel, U., and Kulakovskaya, T.V. (2001) Cytoplasmic membrane of a sensitive yeast is a primary target for *Cryptococcus humicola* mycocidal compound (microcin). *Biochim Biophys Acta* **1512**: 239-250.
- Puchkov, E.O., Zahringer, U., Lindner, B., Kulakovskaya, T.V., Seydel, U., and Wiese, A. (2002) The mycocidal, membrane-active complex of *Cryptococcus humicola* is a new type of cellobiose lipid with detergent features. *Biochim Biophys Acta* **1558**: 161-170.
- Ron, E.Z., and Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* **3**: 229-236.
- Rosenberg, E., and Ron, E.Z. (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 154-162.
- Rossmann, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**: 194-199.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanders-Loehr, J., Wheeler, W.D., Shiemke, A.K., Averill, B.A., and Loehr, T.M. (1989) Electronic and raman spectroscopic properties of oxo-bridged dinuclear iron centers in proteins and model compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 8084-8093.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Schweizer, E., and Hofmann, J. (2004) Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 501-517.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent

- proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**: 1567-1572.
- Shanklin, J., Whittle, E., and Fox, B.G. (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33**: 12787-12794.
- Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (2006) Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* **45**: 9639-9647.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., and Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* **20**: 299-312.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Stewart, C., Jr., Kang, B.C., Liu, K., Mazourek, M., Moore, S.L., Yoo, E.Y., Kim, B.D., Paran, I., and Jahn, M.M. (2005) The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J* **42**: 675-688.
- Stewart, C., Jr., Mazourek, M., Stellari, G.M., O'Connell, M., and Jahn, M. (2007) Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *J Exp Bot* **58**: 979-991.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.M., and De Luca, V. (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J* **14**: 703-713.
- Teichmann, B. (2005) Identifizierung der für die Ustilaginsäureproduktion zuständigen Cytochrom P450 Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 in *Ustilago maydis*. *Diplomarbeit*.
- Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M.A., and Bölker, M. (2007) A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **66**: 525-533.
- Walton, J.D. (2000) Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal Genet Biol* **30**: 167-171.
- Watanabe, C.M., Wilson, D., Linz, J.E., and Townsend, C.A. (1996) Demonstration of the catalytic roles and evidence for the physical association of type I fatty acid synthases and a polyketide synthase in the biosynthesis of aflatoxin B1. *Chem Biol* **3**: 463-469.
- Watanabe, T., Miyashita, K., Saito, T.T., Yoneki, T., Kakihara, Y., Nabeshima, K., Kishi, Y.A., Shimoda, C., and Nojima, H. (2001) Comprehensive isolation of meiosis-specific genes identifies novel proteins and unusual non-coding transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **29**: 2327-2337.
- Williams, J.A., Ring, B.J., Cantrell, V.E., Jones, D.R., Eckstein, J., Ruterbories, K., Hamman, M.A., Hall, S.D., and Wrighton, S.A. (2002) Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* **30**: 883-891.
- Wilson, T.E., Fahrner, T.J., Johnston, M., and Milbrandt, J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**: 1296-1300.
- Winterberg, B. (2008) Siderophore in *Ustilago maydis*: Synthese, Transport, Funktion und Regulation. *Dissertation*.
- Wogan, G.N. (1992) Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res* **52**: 2114s-2118s.

- Wolfe, S.A., Nekludova, L., and Pabo, C.O. (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**: 183-212.
- Woloshuk, C.P., Foutz, K.R., Brewer, J.F., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., and Payne, G.A. (1994) Molecular characterization of aflR, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2408-2414.
- Yabe, K., and Nakajima, H. (2004) Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**: 745-755.
- Yokono, M., Saegusa, N., Matsushita, K., and Sugiura, Y. (1998) Unique DNA binding mode of the N-terminal zinc finger of transcription factor Sp1. *Biochemistry* **37**: 6824-6832.
- Yu, J., Chang, P.K., Cary, J.W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., and Linz, J.E. (1995) Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2365-2371.
- Yu, J.H., Butchko, R.A., Fernandes, M., Keller, N.P., Leonard, T.J., and Adams, T.H. (1996) Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr Genet* **29**: 549-555.
- Zuther, K., Mayser, P., Hettwer, U., Wu, W., Spiteller, P., Kindler, B.L., Karlovsky, P., Basse, C.W., and Schirawski, J. (2008) The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **68**: 152-172.



# Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Bölker bedanken, dass er es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen, sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen und Ideen, die zur Entwicklung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch möchte ich mich bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen, sowie bei Prof. Dr. Mohamed Marahiel und Prof. Dr. Erhard Bremer für ihre Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Ein ganz besonderer Dank geht natürlich an die Mitglieder und ehemaligen Mitglieder meine Arbeitsgruppe, Annette Bauer, Kay Schink, Andrea Hlubek, Sonja Frieser, Britta Tillmann, Michael Mahler, Florian Rosenthal, Lidan Liu, Marisa Piscator, Björn Sandrock, Sandra Hewald, Christan Böhmer, Ute Kämper, Johannes Freitag, Sabrina Patzak, Stefan Arens, Julia Cajan und Julia Engel für die hervorragende Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und nicht zu vergessen die vielen Kaffee- und Schokopausen, die für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Auch der gesamten AG Mösch möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen lustigen Stunden, die wir zusammen verbracht haben, danken.

Besonders möchte ich mich bei Kay für wissenschaftliche und technische Unterstützung sowie zahlreiche Hilfe in Computerfragen bedanken, außerdem Annette, Björn und Johannes für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an Uwe Linne, für die massenspektrometrischen Analysen.

Frau Heide-Barbara Böttner und Frau Hanne Steinebach möchte ich für die Unterstützung bei Verwaltungsfragen danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Jutta, Sabrina, Micha, Annette, Annette, Andrea, Katrin und Konstanze für die wunderschöne Zeit, die wir zusammen in Marburg hatten, danken, und dass sie mir auch in schwierigen Zeiten immer zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während der ganzen Zeit finanziell unterstützt haben.

Dem SFB395, der DFG und dem GK1216 möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, die dieser Arbeit zu Grunde lag.