

# Identifizierung und Charakterisierung sekretierter Proteine mit Bezug zur Pathogenität in *Ustilago maydis*

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Olaf Müller**  
aus Herdecke (Ruhr)

Köln 2004

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter H. Schreier (Erstgutachter)  
Prof. Dr. Wolfgang Werr (Zweitgutachter)  
Prof. Dr. Michael Melkonian (Prüfungsvorsitzender)

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2004

---

1	Einleitung.....	1
1.1	Die frühen Infektionsstadien phytopathogener Pilze.....	1
1.2	<i>Ustilago maydis</i> als Modellsystem für Phytopathogenität.....	3
1.3	Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	4
1.4	Die Paarungstyploci von <i>U. maydis</i> kontrollieren Morphologie und Pathogenität.....	6
1.5	Der sekretorische Weg in filamentösen Pilzen: ein Transportweg für Pathogenitätsfaktoren.....	6
1.6	Signalpeptidselektion.....	9
1.7	Die genomische Sequenz von <i>Ustilago maydis</i> .....	11
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Materialien und Bezugsquellen.....	13
2.1.1	Medien.....	13
2.1.2	Verwendete Kits.....	14
2.1.3	Sequenzierungen.....	14
2.1.4	Oligonukleotide.....	14
2.1.5	Plasmide.....	17
2.1.5.1	Ausgangsplasmide.....	17
2.1.5.2	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	18
2.1.6	Biologisches Material.....	18
2.1.6.1	Bakterien-Stämme.....	18
2.1.6.2	Hefe-Stämme.....	18
2.1.6.3	<i>Ustilago</i> -Stämme.....	18
2.1.7	Pflanzenmaterial.....	19
2.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden.....	19
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	19
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	19
2.2.1.2	Bestimmung der Zelldichte von <i>E. coli</i> .....	19
2.2.1.3	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	20
2.2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	20
2.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
2.2.2.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	20
2.2.2.2	Bestimmung der Zelldichte von <i>S. cerevisiae</i> .....	20
2.2.2.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	21
2.2.3	<i>Ustilago maydis</i> .....	21
2.2.3.1	Herstellung kompetenter <i>U. maydis</i> Protoplasten.....	21
2.2.3.2	Transformation von <i>U. maydis</i> .....	22

2.2.3.3	Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum .....	22
2.2.3.4	Test auf Pathogenität .....	22
2.2.3.5	Sporulation und Segregationsanalyse .....	22
2.2.3.6	Mikroskopie und Bildverarbeitung .....	23
2.3	Molekularbiologische Standardmethoden.....	23
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	23
2.3.2	Schnellpräparation von genomischer DNA aus <i>U. maydis</i> .....	23
2.3.3	Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus <i>U. maydis</i> .....	24
2.3.4	RNA-Isolation aus <i>U. maydis</i> .....	24
2.3.5	Herstellung von Gendeletionskassetten .....	25
2.3.6	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	26
2.3.7	Transfer von DNA (Southern-Blot) .....	26
2.3.8	Herstellung von Hybridisierungssonden für Southern-Analysen .....	26
2.3.9	Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren.....	26
2.3.10	PCR-Techniken.....	27
2.3.10.1	Standard PCR-Ansätze.....	27
2.3.10.2	Ganzzell-PCR aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	27
2.3.10.3	Ganzzell-PCR aus <i>S. cerevisiae</i> - und <i>U. maydis</i> -Zellen.....	27
2.4	Funktionelle Genomanalyse mittels Signalpeptidselektion „yeast signal sequence trap“	27
2.4.1	Fragmentierung genomischer DNA mittels partiellen DNase I Verdau .....	28
2.4.2	Herstellung der genomischen DNA-Fragment-Bibliothek .....	28
2.4.3	Selektion der genomischen DNA-Bibliothek in Hefe .....	28
2.4.4	Signalpeptidselektion ausgewählter Proteine .....	29
2.5	Biochemische Methoden .....	29
2.5.1	SDS-Gelelektrophorese von Proteinen .....	29
2.5.2	Transfer von Proteinen (Western-Blot) .....	29
2.5.3	Nachweis von immobilisierten Proteinen .....	30
2.5.4	Isolierung von Proteinen aus <i>U. maydis</i> .....	30
2.6	Bioinformatische Methoden.....	31
2.6.1	Sequenz- und Strukturanalysen .....	31
2.6.2	In dieser Arbeit entwickelte Programme .....	31
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Herstellung einer genomischen Bibliothek aus zufällig generierten DNA-Fragmenten	33
3.2	Signalpeptidselektion „yeast signal sequence trap“ .....	34
3.2.1	Erstselektion der Klone .....	35

---

3.2.2	Klassifizierung selektierter YSST-Klone .....	35
3.2.3	Zuordnung nicht redundanter Klone zu genkodierenden Genomabschnitten...	37
3.2.4	Bioinformatische Analyse der YSST-kodierten Peptide .....	41
3.3	Genomweite Identifizierung signalpeptidkodierender Sequenzen <i>in silico</i> .....	44
3.4	Identifizierung von Proteinen des sekretorischen Transportweges <i>in silico</i> .....	46
3.5	Charakterisierung ausgewählter Gene .....	47
3.5.1	Charakterisierung zellwandassoziiertes Proteine .....	48
3.5.1.1	UMP1, ist homolog zu Mannoproteinen aus <i>C. neoformans</i> .....	48
3.5.1.2	Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von UMP1 und UMP2.....	52
3.5.1.3	Die Einzeldelationen von <i>ump1</i> und <i>ump2</i> haben keinen Einfluß auf die Pathogenität. ....	54
3.5.1.4	Die fünf UMP1-homologen Proteine besitzen funktionelle Signalpeptide. ..	57
3.5.1.5	Sequenzanalyse von <i>ysst29</i> .....	58
3.5.1.6	YSST29 ist eine integrale Komponente der pilzlichen Zellwand. ....	59
3.5.1.7	Die Deletion von <i>ysst29</i> hat keinen Einfluß auf die Pathogenität.....	60
3.5.1.8	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der Glyoxaloxidasen aus <i>U. maydis</i> . 62	
3.5.2	Charakterisierung von Proteinen der Zelloberfläche.....	65
3.5.2.1	Sequenzanalyse von RPH1, einem sekretierten bifunktionalen Protein mit Repellent- und Hydrophobindomäne. ....	65
3.5.2.2	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von RPH1. ....	68
3.5.2.3	Herstellung und Analyse <i>rph1</i> -defizienter <i>U. maydis</i> Stämme .....	69
3.5.2.4	Die gleichzeitigen Deletionen von <i>rph1</i> und <i>rep1</i> bzw. <i>rph1</i> und <i>hum2</i> haben keinen Einfluß auf die pathogene Entwicklung. ....	70
3.5.2.5	Sequenzanalyse von RSP1, einem repetitiven, sekretorischen Protein....	71
3.5.2.6	Identifizierung von RSP2, einem weiteren repetitiven Protein mit putativem Signalpeptid und KEX2-Prozessierungsstellen. ....	72
3.5.2.7	Herstellung und Analyse <i>rsp1</i> -defizienter Stämme.....	74
3.5.2.8	Die gleichzeitige Deletion von <i>rph1</i> und <i>rsp1</i> führt zu Apathogenität.....	76
3.5.2.9	Identifizierung des <i>kex2</i> -homologen Gens in <i>U. maydis</i> .....	78
3.5.2.10	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von UMKEX2 .....	78
3.5.2.11	<i>umkex2</i> , ein essentielles Gen in <i>U. maydis</i> .....	80
4	Diskussion.....	84
4.1	Der Pathogenitätsbezug identifizierter zellwandassoziiertes Proteine .....	84
4.1.1	Die UMP Genfamilie.....	85
4.1.2	YSST29, ein integrales Zellwandprotein mit Expansindomäne.....	88

4.1.3	GLO1, eine ungewöhnliche Glyoxaloxidase mit Transmembran- und cytosolischer Domäne.....	89
4.2	Repetitive Oberflächenproteine sind für die pathogene Entwicklung essentiell.....	90
4.3	Das Endoproteinasegen <i>umkex2</i> ist in <i>U. maydis</i> essentiell.....	94
5	Zusammenfassung.....	96
6	Abstract.....	97
8	Literaturverzeichnis.....	98

## Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	µl	Mikroliter
ad	zum Endvolumen	UV	ultraviolettes Licht
AS	Aminosäuren	V	Volt
Amp	Ampicillin	WT	Wildtyp
bp	Basenpaar(e)	z. B.	zum Beispiel
C-terminal	carboxyterminal		
ca.	circa		
Cbx	Carboxin		
DIC	„differential interference contrast“		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DNase	Desoxyribonuklease		
dNTP	Desoxynukleotide		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“		
EST	„expressed sequence tag“		
fuz <sup>+</sup>	filamentöser Phänotyp		
g	Gramm		
GFP	„green fluorescent protein“		
h	Stunde		
Hyg	Hygromycin		
kb	Kilobasenpaar		
kDa	Kilodalton		
M&M	Material und Methoden		
M	molar		
min	Minute		
ml	Milliliter		
N-terminal	aminoterminal		
Nat	Nourseothricin		
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm		
ORF	„open reading frame“		
PAA	Polyacrylamid		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PC	Phenol/Chloroform		
PCR	„polymerase chain reaction“		
PD	„potato dextrose“		
PEG	Polyethylenglycol		
Pellet	Zentrifugationssediment		
RNA	Ribonucleinsäure		
RT	Raumtemperatur		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
sec	Sekunde		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat + Na <sub>2</sub> -EDTA		
TE	Tris-Cl + Na <sub>2</sub> -EDTA		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin		
Tris	Trishydroxymethylaminomethan		
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)		
Upm	Umdrehungen pro Minute		
UTR	untranslatierte Region		

# 1 Einleitung

Pilze sind kohlenstoffheterotrophe Mikroorganismen, die ihren Nährstoffbedarf in der überwiegenden Mehrzahl durch saprophytische Lebensweise decken. Eine kleine Gruppe hat sich jedoch im Laufe der Evolution zu Parasiten entwickelt von denen einige die lebende Pflanze als stete Quelle für die Nährstoffversorgung erobert haben. Während perthophytische Pflanzenparasiten ihren Wirt vor der Besiedelung abtöten, halten biotroph lebende, phytopathogene Pilze den Wirtsorganismus, einhergehend mit einer der eigenen Nährstoffversorgung dienenden Umfunktionierung des Metabolismus, am Leben. In Folge des Befalls bildet die Wirtspflanze Symptome, wie Chlorosen, Anthocyanbildung oder tumoröses Gewebe, aus, welche in ihrer Gesamtheit die Infektionskrankheit ausmachen. Als Verursacher von Infektionskrankheiten bei Nutzpflanzen nehmen phytopathogene Pilze eine dominante Stellung ein. So sind ihnen über 80 % der etwa 160 wichtigsten in Mitteleuropa auftretenden Infektionskrankheiten zuzuschreiben (Müller und Loeffler, 1992). In der Vergangenheit kam es immer wieder zu Ausbrüchen verheerender, ganze Ernten vernichtender Epidemien, die zu enormen wirtschaftlichen Schäden oder Hungersnöten führten. So entzog die 1845 in Irland um sich greifende Kartoffelfäule, ausgelöst durch den Oomyceten *Phytophthora infestanz*, großen Bevölkerungsteilen ihre Nahrungsgrundlage und zog eine Auswanderungswelle in westliche Gebiete nach sich (Hulder, 1998). Auch heute noch sind die durch Pilze verursachten Schäden in der Land- und Agrarwirtschaft beträchtlich und lassen sich auf jährliche Milliardenbeträge beziffern (Börner, 1997). Zur Kontrolle und Bekämpfung dieser Pflanzenkrankheiten ist das genaue Verständnis der pilzlichen Infektionsmechanismen auf molekularer Ebene unabdingbar.

## 1.1 Die frühen Infektionsstadien phytopathogener Pilze.

Die meisten biotrophen, phytopathogenen Pilze zeichnen sich durch hohe Wirtsspezifität aus, welche bei einigen Arten, wie etwa den Rostpilzen, je nach Entwicklungsstadium wechseln kann (Esser, 1976). Die Wechselwirkungen zwischen Pathogen und Wirtspflanze beginnen mit der Anheftung der Sporen an die Pflanzenoberfläche, gefolgt von ihrer Auskeimung und der Erkennung des kompatiblen Wirts durch den Pilz. Anschließend erfolgt die Ausbildung von speziellen Infektionsstrukturen, mit deren Hilfe der Pilz in die Pflanze eindringt.

Ein entscheidender Schritt der pathogenen Entwicklung ist die aktive Anheftung der Spore an die Pflanzenoberfläche. Ihr wirken Faktoren wie Regen, Wind und Konkurrenz mit anderen Pathogenen entgegen (Mendgen und Deising, 1993; Mendgen et al., 1996). Die Art der sekretierten, die Spore umhüllenden, adhäsiven Substanzen variiert zwischen wasserunlösli-

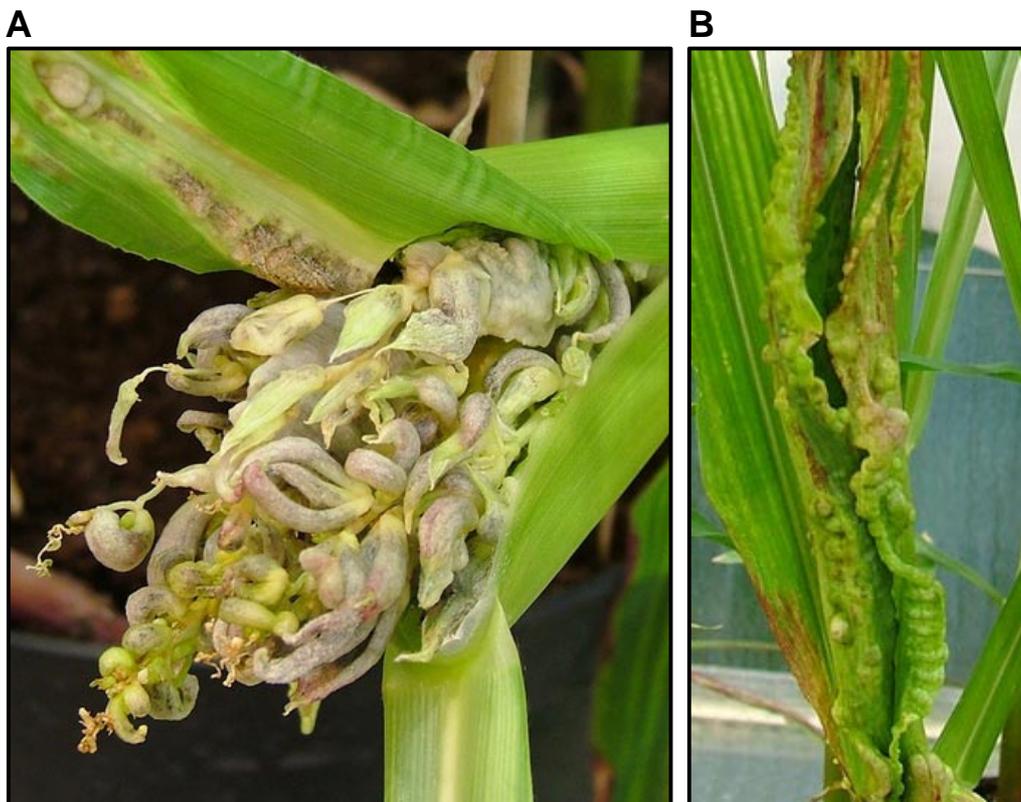
chen Glycoproteinen, Lipiden und Polysacchariden (Xiao et al, 1994; Nicholson und Epstein, 1991; Nicholson, 1996). Die Adhäsion dient jedoch nicht ausschließlich der Verankerung sondern kann auch für die Wirtserkennung und Besiedelung bedeutsam sein. Es wird vermutet, daß hydrophobe Komponenten pflanzlichen Oberfläche, welche in ihrer Gesamtheit als Wachse bezeichnet werden, als Signale in den frühen Stadien der pathogenen Entwicklung dienen (Kolattukudy et al., 1995; Podila et al., 1993). Alternativ können auch physikalische Reize, wie Oberflächentopologie und –Konsistenz, sowie hydrophobe Wechselwirkungen in die Erkennungsprozesse involviert sein. (Hamer et al., 1988; Talbot, 1996). Der erfolgreichen Sporenanhaftung folgt die Ausbildung an ihrer Spitze wachsender Keim-, bzw. Infektionshyphen (Wessels, 1993), welche auf der Pflanze, dirigiert von physiko- oder chemotaktischen Signalen, in Richtung der zu penetrierenden Oberflächenstrukturen wachsen (Read et al., 1992; Gow, 1994). Während der Fortbewegung sezernieren diese Hyphen einen Adhäsionsfilm, welcher eine Reihe von hydrolytischen Enzymen, wie z. B. Cutinasen enthält und die Anheftung an die hydrophobe Pflanzenoberfläche bewerkstelligt (Jones, 1994).

Während einige Pathogene die Pflanzeoberfläche direkt penetrieren, haben andere Arten Strategien zum Aufspüren natürlicher Öffnungen, wie Spaltöffnungen oder Lentizellen, entwickelt. So erkunden Rostpilze die Oberflächentopologie mittels thigmotroper Signale welche bei Erkennung einer Spaltöffnung die Appressorienbildung an der Spitze der Keimhyphne induzieren (Hoch und Staples, 1991). Pathogene, wie *Magnaporthe grisea*, dringen durch die Cuticula in die Pflanze ein. Auch sie bilden hierfür Appressorien aus, mit denen der Pilz unter Aufbau eines beträchtlichen Turgordrucks in der Lage ist die Cuticula zu durchstoßen (Howard et al., 1991). In Gegensatz zu diesem mechanischen Vorgang wird die Cuticula von anderen Arten auf enzymatischem Weg, durch die Sezernierung von Hydrolytischen Enzymen, vor allem Cutinasen, durchdrungen (Kolattukudy et al., 1995). Auch die Struktur der penetrierenden Hyphen kann zwischen verschiedenen Arten variieren. So kann bei *Fusarium oxysporum* oder *Ustilago maydis* keine oder nur geringe Appressorienbildung beobachtet werden (Snetselaar und Mims, 1994; Rodríguez-Gálvez und Mendgen, 1995). Nach der Penetration erfolgt die Besiedlung des Wirts durch das pilzliche Mycel. Das Hyphenwachstum kann sowohl inter- als auch intrazellulär erfolgen. Im letzteren Fall wird dabei lediglich die pflanzliche Zellwand durchbrochen, während die Plasmamembran intakt bleibt. Auf Seiten des Pilzes kommt es bei intrazellulären Hyphen vielfach zur Ausbildung von Haustorien, welche eine effiziente Aufnahme von Nährstoffen bewerkstelligen (Voegelé et al., 2001; Struck et al. 2002).

## 1.2 *Ustilago maydis* als Modellsystem für Phytopathogenität.

Die Basidiomyceten haben, in der durch eine geteilte Basidie gekennzeichnete Unterklasse der Phragmobasidiomycetidae, zwei wichtige Ordnungen parasitärer Pilze hervorgebracht. Die an ihren rötlichbraunen Sporenlagern erkennbaren, etwa 5000 Arten umfassenden Vertreter der Rostpilze (Uredinales) sind obligate Endoparasiten der Gefäßpflanzen. Hierzu zählen u. a. Arten der Gattung *Puccinia* und *Uromyces*, deren Entwicklungszyklus zumeist mit einem Wirtswechsel einhergeht (Esser, 1976). Die zweite Gruppe bildet die ca. 1200 Arten umfassende Ordnung der Brandpilze (Ustilaginales), bei welchen es sich Endoparasiten der Angiospermen handelt. Befallene Pflanzenorgane, wie Sprosse, Blätter und Infloreszenzen, erscheinen zum Ende der pathogenen Entwicklung verbrannt, da sie mit großen Mengen dunkler Brandsporen überzogen sind. Wichtige Vertreter der Ustilaginales bilden Arten der Gattungen *Tilletia* und *Ustilago*.

*Ustilago maydis* ist der Erreger des Beulenbrandes der Kulturpflanze *Zea mays* und deren natürlichen Vorfahr Theosinte (*Zea mexicana*), (Banuett, 1995). Befallene Pflanzenorgane weisen zunächst Chlorosen und Anthocyanbildung auf. Nach etwa einer Woche folgt die Ausbildung von Tumoren, welche sich auf allen grünen, meist meristematischen Pflanzenorganen



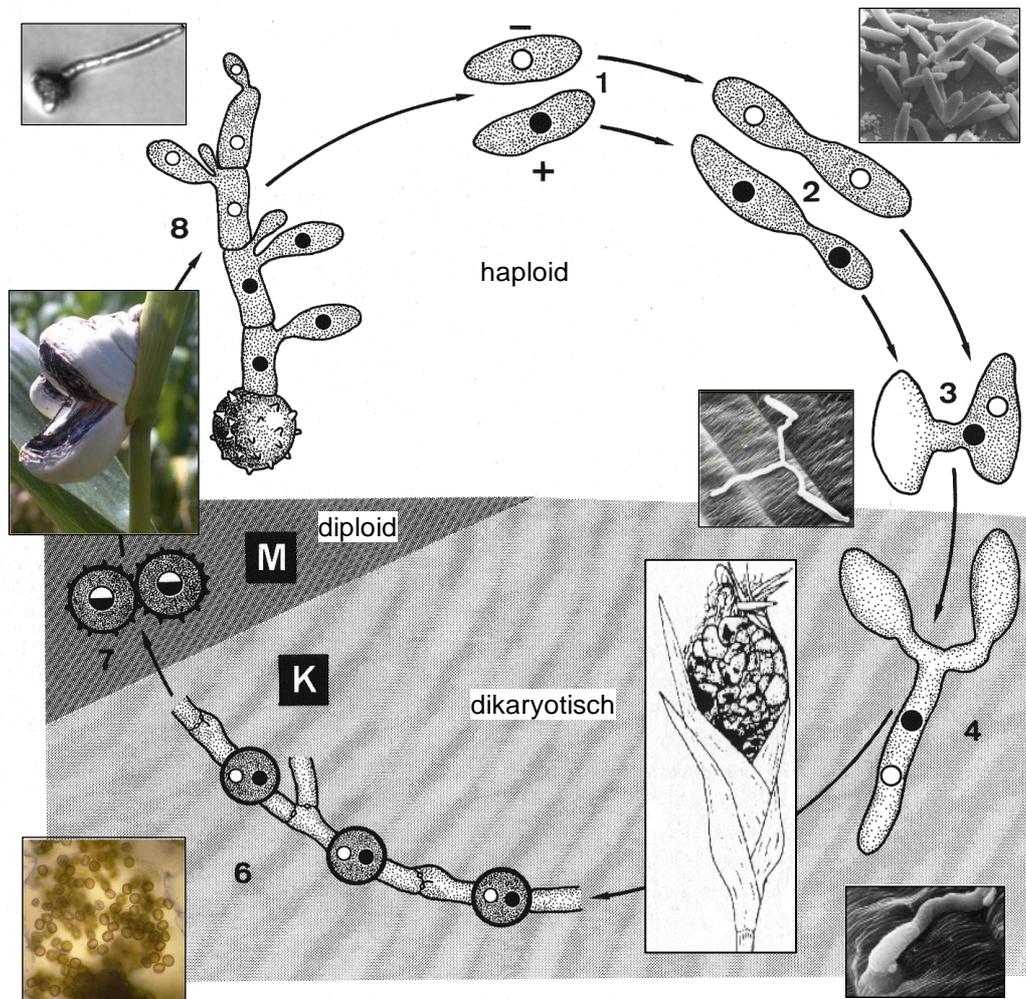
**Abb. 1.1: Tumorbildung an befallenen Pflanzenorganen.** Es handelt sich um den Befall mit den in dieser Arbeit verwendeten *U. maydis* Wildtypstämmen. **A)** Männliche Infloreszenz mit tumorösen Blütenanlagen. **B)** Stark deformiertes Blatt mit zahlreichen kleineren Tumoren und Anthocyanfärbung.

erstrecken kann (Abb. 1.1). Das pilzliche Mycel proliferiert innerhalb des tumorösen Gewebes und bringt am Ende der pathogenen Entwicklung große Mengen dunkel pigmentierter Teliosporen hervor, welche durch Wind und Regen verbreitet werden und im Boden überdauern können. *U. maydis* hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen Modellorganismus zur Untersuchung phytopathogener Pilze entwickelt. So lassen sich die saprophytisch, hefeartig wachsenden Sporidien leicht im Labor kultivieren und sind so leicht für eine Reihe von molekularbiologischen, biochemischen und mikrobiologischen Arbeiten zugänglich. Auch genetische Studien lassen sich schnell und einfach durchführen, da der sexuelle Lebenszyklus von *U. maydis* innerhalb weniger Wochen nachvollzogen werden kann. Weitere Forschungsbereiche beschäftigen sich mit der chromosomalen Reparatur und Rekombination, pilzlichen Killer-Viren, Regulation der Siderophorbiosynthese und der Fungizidresistenz. Die Wirtspflanze *Zea mays* lässt sich zudem im Gewächshaus gut kultivieren und kann bereits eine Woche nach der Aussaat für Pathogenitätsstudien herangezogen werden (Kahmann et al., 2000; Banuett, 2002).

### 1.3 Der Lebenszyklus von *U. maydis*.

*U. maydis* ist ein Haplodikaryont mit kurzer diploider Kernphase, bei welchem die morphologische Erscheinungsform eng mit der Pathogenität gekoppelt sind. Aus der auskeimenden Brandspore entwickelt sich eine quergeteilte Probasidie, deren Kompartimente sukzessiv haploide Basidiosporen, auch als Sporidien bezeichnet, abschnüren. Die saprophytisch lebenden, zigarrenförmigen Sporidien, wachsen hefeartig und können sich auf der Pflanze ein bis zweimal teilen. Treffen genetisch kompatible Zellen aufeinander, bildet eine von ihnen eine Konjugationshyphale, welche auf die Partnerzelle zuwächst und die Fusion mittels Somatogamie einleitet (Snetselaar, 1993). Die genetische Kompatibilität wird von einer tetrapolaren Inkompatibilität bestimmt (vgl. 1.4). Aus der Fusion geht ein dikaryotisches, infektiöses Filament hervor, welches mit Hilfe appressorienähnlicher Strukturen in die Pflanze eindringt. Sowohl die Fusion kompatibler Sporidien, als auch die Bildung des filamentösen Dikaryons kann unter Laborbedingungen auf aktivkohlehaltigem Festmedium nachvollzogen werden (Day und Anagnostakis, 1971; Banuett und Herskowitz, 1994), wobei die mit Luft gefüllten, septierten Filamente der dikaryotischen Hyphen weißlich erscheinen. Auf der Pflanze kann die Penetration des infektiösen Filaments über natürliche Öffnungen, wie Wundungen und Spaltöffnungen, sowie direkt durch die pflanzliche Cuticula erfolgen (Snetselaar und Mims, 1993). Die Hyphen des pilzlichen Mycels wachsen inter- und intrazellulär und bilden im letzteren Fall Haustorien aus. Obwohl mikroskopisch keine Abwehrreaktion der Pflanze zu erkennen ist (Snetselaar und Mims, 1993), können etwa drei Tage nach Infektion Anthocyanbildung und vereinzelt auch Nekrosen in den infizierten Gewebeabschnitten beobachtet

werden (Banuett und Herskowitz, 1996). Die Tumorbildung kann nach etwa fünf Tagen beobachtet werden. Innerhalb des tumorösen Gewebes findet eine starke Proliferation des verzweigten, dikaryotischen Mycels statt, welche in die Differenzierung segmentierter, sporogener Hyphen mündet. Die Karyogamie findet wahrscheinlich nach der Sporulation statt (Banuett und Herskowitz, 1996) und die dabei gebildeten, diploiden Teliosporen sind im Reifen Stadium von einer stark melanisierten, dunkelbraunen Hülle umgeben.



**Abb. 1.2: Lebenszyklus von *U. maydis*.** (1, 2) saprophytisch lebende, sich hefeartig teilende Sporidien; (3) Somatogamie zweier genetisch kompatibler Sporidien; (4) Entstehung des dikaryotischen, infektiösen Filaments; (5) Infektion der Wirtspflanze; (6) Sporulation und Karyogamie innerhalb des parasitären Mycels; (7) Innerhalb der Sporen findet die Meiose statt; (8) Auskeimung der Probasidie; M, Meiose; K Karyogamie. Verändert nach Esser (1976), weitere Erläuterungen im Text. Aufnahmen: G. Wanner (1); K. Snetselaar (3); S. Huber (8).

Reife Pflanzentumore sind mit Millionen Brandsporen angefüllt und platzen nach ihrer Austrocknung auf, wodurch die diploiden Sporen freigesetzt werden (Christensen, 1963).

## 1.4 Die Paarungstyploci von *U. maydis* kontrollieren Morphologie und Pathogenität.

Der Wechsel vom saprophytischen Wachstum der haploiden Sporidien zur pathogenen und sexuellen Entwicklung innerhalb der Wirtspflanze unterliegt der genetischen Kontrolle der beiden ungekoppelten Paarungstyploci *a* und *b*. Der *a*-Locus liegt in zwei unterschiedlichen Allelen *a1* und *a2* vor und steuert die interzelluläre Erkennung und die Zellfusion, während der multiallelische *b*-Locus für die pathogene Entwicklung verantwortlich ist. Beide Loci zusammen regulieren die Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons. (Banuett und Herskowitz, 1989; Holiday, 1961).

Die beiden Allele des *a*-Locus kodieren für Komponenten eines Pheromon/Rezeptorsystems, bei dem die membranständigen Rezeptoren (Pra1 bzw. Pra2) die sekretierten Pheromone (Mfa1 bzw. Mfa2) des jeweils anderen Kreuzungspartners erkennen (Bölker et al., 1992). Der *a2*-Locus trägt zusätzlich die Gene *LGA2* und *RGA2* deren Funktion noch nicht bekannt ist (Urban et al., 1996).

Der *b*-Locus von *U. maydis* enthält zwei divergent transkribierte Gene *bE* (*bEast*) und *bW* (*bWest*), die für Homeodomänen-Proteine kodieren (Gillissen et al., 1992). Die pathogene Entwicklung wird nur dann eingeleitet, wenn von unterschiedlichen Allelen stammende *bE* und *bW* Partner dimerisieren und zusammen als heteromere Transkriptionsfaktor die Expression weiterer Gene regulieren (Brachmann et al, 2001; Romeis et al., 2000). Somit können künstlich erzeugte haploide Stämme, wie etwa der Stamm CL13, der das Genpaar *bW2* und *bE1* enthält, die Pflanze ohne kompatiblen Kreuzungspartner infizieren und die pathogene Entwicklung durchlaufen (Bölker et al., 1995).

## 1.5 Der sekretorische Weg in filamentösen Pilzen: ein Transportweg für Pathogenitätsfaktoren.

Pathogene Pilze infizieren ihren Wirt als Folge von Entwicklungsprozessen, welche für ihren Ablauf verschiedenste pilzliche Substanzen voraussetzen. Diese Pathogenitätsfaktoren verbleiben in der Zelle, werden an die Zelloberfläche dirigiert oder sekretiert, um so in direkte physische Wechselwirkung mit dem Wirtsorganismus zu treten. Somit nimmt die Proteinsekretion eine Schlüsselposition in der pilzlichen Entwicklung und Pathogenität ein. Es werden neben Enzymen und Strukturproteinen auch Pheromone und andere Botenstoffe sekretiert. Während ein großer Teil der Strukturproteine in Membran und Zellwand eingebettet wird, sind mit den Hydrophobinen Vertreter bekannt, die mit der äußeren Schicht der Zellwand assoziiert sind oder vollständig in das umgebende Medium sezerniert werden (Wessels et

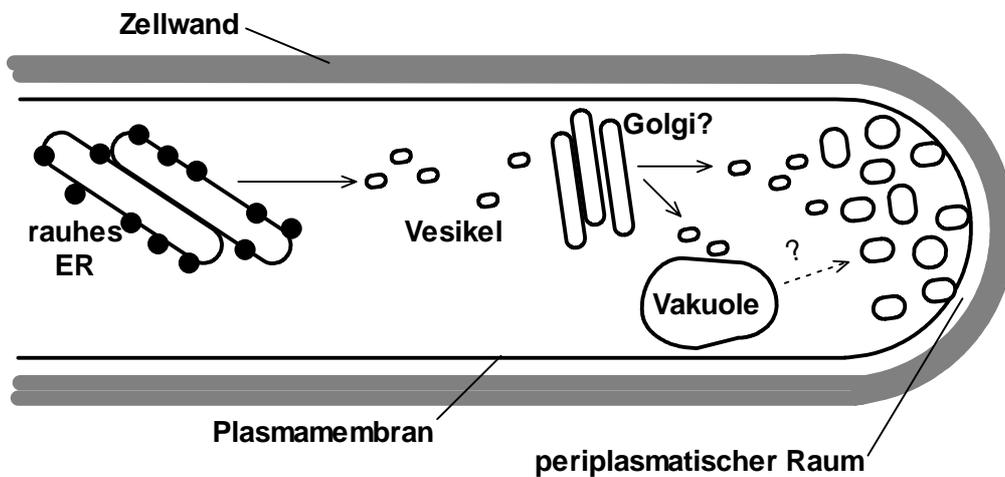
al., 1991). Hydrophobine sind kleine sekretierte, amphipathische Proteine mit 8 konservierten Cysteinen und einer Länge von ca. 100 Aminosäuren. Sie wurden bisher ausschließlich in filamentösen Pilzen nachgewiesen und erfüllen eine Reihe wichtiger biologischer Funktionen. So sind sie u. a. an der Ausbildung von an der Luft wachsenden Zellstrukturen, wie Appressorien oder Fruchtkörpern, sowie der Wechselwirkung von Hyphen mit hydrophoben Oberflächen beteiligt (Wösten, 2001, zur Übersicht). In *Magnaporthe grisea* konnte an Hand von Hydrophobinmutanten mit Pathogenitätsdefekten auch ein Bezug zur pathogenen Entwicklung filamentöser Pilze aufgezeigt werden (Talbot et al., 1993). Dagegen konnten in *U. maydis*-Stämmen, in denen das Hydrophobingen *hum2* deletiert wurde, keine Beeinträchtigungen der Pathogenität festgestellt werden (Bohlmann, 1996). Auch das Gen des Repellentproteins REP1, ist hyphenspezifisch exprimiert und übernimmt in *U. maydis* eine wichtige Funktion in der Ausbildung luftexponierter Hyphen. *Rep1* kodiert für ein Vorstufenprotein, welches aus mehreren, durch putative KEX2-Prozessierungsmotive getrennte Sequenzwiederholungen besteht. Ein Großteil der aus der Prozessierung resultierenden, amphipatischen Peptide konnten in proteinbiochemischen Analysen nachgewiesen werden. Nach erfolgter Sekretion umgeben diese sogenannten Repellents die pilzliche Zellwand mit einem hydrophoben Schutzmantel, der die Zelle gegen die Umgebungsluft abschirmt und so ein emereses Wachstum der Hyphe ermöglicht. Die Deletion von *rep1* führte zu einer dramatisch reduzierten Ausbildung von auf aktivkohlehaltigem Festmedium wachsenden Hyphen. Die Pathogenität von *U. maydis* war insgesamt jedoch nicht vermindert, da das Hyphenwachstum in wässrigem Milieu nicht beeinträchtigt war (Wösten et al. 1996).

Die in phytopathogenen Pilzen sezernierten Enzyme bilden ein Gemisch aus hydrolytischen Enzymen, wie Cutinasen, Cellulasen, Pektinasen und Proteinase (Kolattukudy et al., 1995).

Obwohl in den letzten zwei Jahrzehnten viele Erkenntnisse zusammengetragen wurden ist das Wissen über den sekretorischen Weg in Pilzen immer noch lückenhaft. Es wird jedoch allgemein davon ausgegangen, daß sich die pilzliche Sekretion nicht grundlegend von derer anderer eukaryotischer Organismen unterscheidet. Einen wichtigen Unterschied stellt jedoch das polare Spitzenwachstum der Hyphen filamentöser Pilze dar, welches in Hefe oder höheren Eukaryonten in dieser Form nicht anzutreffen ist. Darüber hinaus ist der Proteinausstoß des sekretorischen Apparats filamentöser Pilze sehr viel höher als in Hefe, was für Biotechnologische Anwendungen von großem Interesse ist (Durand et al., 1988, Finkelstein et al., 1989).

Eine Übersicht über den sekretorischen Weg filamentöser Pilze ist in Abb. 1.3 dargestellt. Der Transport sekretorischer und in der Plasmamembran verankerter Proteine beginnt mit

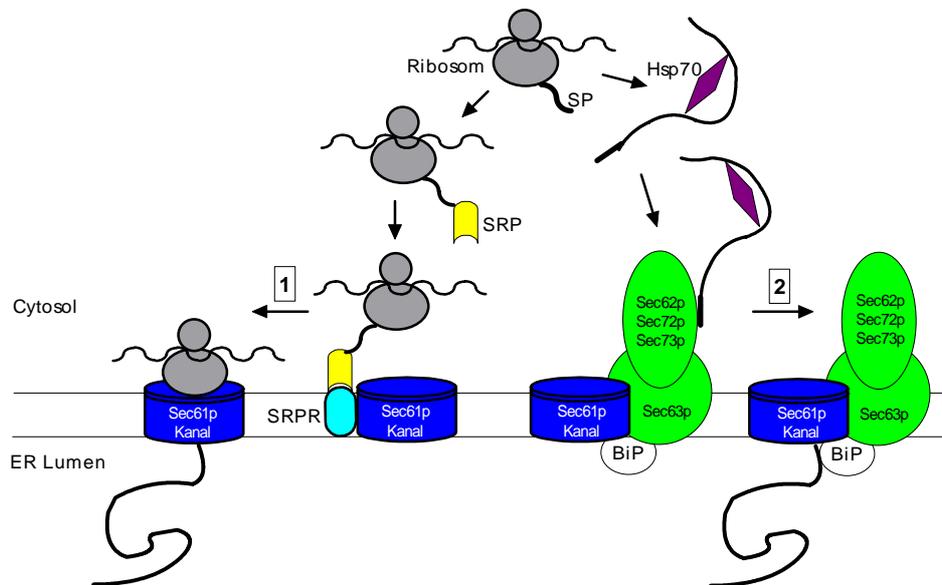
der Einschleusung der an Ribosomen neu synthetisierten Aminosäurekette in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Für Hefe wurde zwei verschiedene



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des sekretorischen Weges in filamentösen Pilzen.** Weitere Erläuterungen im Text.

Transportwege neu synthetisierter Proteine beschrieben (Abb. 1.4) In einem SRP-abhängigen Weg wird die Peptidkette cotranslational durch die ER-Membran geleitet. Dabei bindet ein als Signalerkennungspartikel (Signal Recognition Particle) bezeichnetes Protein (Walter und Johnson, 1994; zur Übersicht) an die Signalsequenz, arretiert die weitere Translation der Boten-RNA und dirigiert das freie Ribosom an die cytosolische Seite der ER-Membran. Dort wird der Peptid-Ribosom-SRP Komplex von einem integralen SRP-Rezeptor gebunden. Nach Freisetzung des SRP erfolgt die cotranslationale Translokation der Peptidkette über einen membranständigen Translokationskanal. In dem zweiten, SRP-unabhängigen Weg binden cytosolische Chaperone an das Vorstufenprotein und halten seine ungefaltete Konformation aufrecht. Der so gebildete Proteinkomplex bindet an einen alternativen integralen Rezeptorkomplex der ER-Membran. Durch Interaktion mit einem im Lumen des ER lokalisierten Chaperons (BiP), wird die ungefaltete Peptidkette, an den schon für den SRP-abhängigen Weg erwähnten Translokator weitergeleitet und in das ER-Lumen überführt. Die Art der eingeschlagenen Transportroute hängt von den hydrophoben Eigenschaften des Signalpeptids ab (Ng et al, 1996). Innerhalb des ER wird die native Konformation der Vorstufenproteine durch Chaperone und Foldasen unterstützt. Des weiteren werden in vielen Fällen eine Reihe von Prozessierungsschritten, wie Glycosilierung, Disulfidbrückenbildung, Phosphorylierung und die Assoziation mit Proteinuntereinheiten eingeleitet. Anschließend werden diese Proteine in Transportvesikel geladen und gerichtet entlang von Mikrotubuli in den Golgi-Apparat überführt, wo weitere, vornehmlich proteolytische Prozessierungen, stattfinden können. Die für den Export bestimmten Proteine werden schließlich

über Vesikel in die Apikalregion der Hyphenzelle transportiert, während vakuoläre Proteine oder Proteine, die für die Degradation bestimmt sind, durch vesikulären Transport ihrem Zielort, der Vakuole zugeführt werden (Baker et al., 1988). Experimentelle Befunde deuten darauf hin, daß die Sekretion in filamentösen Pilzen ausschließlich in der apikalen oder subapikalen Hyphenregion erfolgt (Archer und Peberdy, 1997; Lee, 1998; Gordon et al., 2000).



**Abb. 1.4: Wege des Proteintransports durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums.** Der Transport kann SRP-abhängig (1) oder -unabhängig (2) erfolgen. Die einzelnen Komponenten tragen die Bezeichnungen der in Hefe identifizierten Komponenten. SP, Signalpeptid; SRP, Signal Recognition Particle; SRPR, SRP-Rezeptor; BiP, Binding Protein. Verändert nach Sakagushi, 1997. Weitere Erklärung im Text.

## 1.6 Signalpeptidselektion

Eine große Anzahl von Proteinen werden post- oder cotranslational durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums geschleust. Dazu gehören neben sekretorischen und plasmamembranverankerten Proteinen auch Proteine, die in Vakuole, Endosomen, Lysosomen und allen Kompartimenten des sekretorischen Weges lokalisiert sind (Rapoport, 1992). Diese Proteine besitzen ein spezifisches aminoterminales Transportsignal: das Signalpeptid, auch als Signalsequenz bezeichnet (von Heijne, 1990). Obwohl die Primärsequenz von Signalpeptiden nicht konserviert ist, haben sie doch gemeinsame physikochemische Eigenschaften. Dem Initiator-methionin der 15 bis 30 Aminosäuren umfassenden Signalsequenz folgt zunächst eine kurze zumeist aus positiv geladenen Aminosäuren bestehende N-terminale Region. An diese schließt sich eine hydrophober Bereich an, welcher sich über den Großteil der Sequenz erstreckt. Diese sogenannte H-Region ist für die Funktionalität des Signalpeptids essentiell. Der C-terminale Bereich beinhaltet die Prozessierungsstelle, an

welcher das Signalpeptid nach der Translokation in das ER von der nachfolgenden Proteinsequenz abgespalten wird, wird häufig von polaren Aminosäuren gebildet (von Heijne, 1985). Eine Möglichkeit der Isolierung von Proteinen, die in den sekretorischen Weg der Zelle überführt werden, besteht in der Identifizierung spezifischer N-terminaler Transportsignale, den Signalpeptiden, die auch als Signalsequenzen bezeichnet werden. Hierzu wurden verschiedene Methoden entwickelt, in denen eine signalpeptidkodierende cDNA-Sequenz mit einem bekannten, sekretierten oder plasmamembranständigen Reporter, mit deletierter Signalsequenz, fusioniert wird. Dieser auch als Signalpeptidselektion bezeichnete Ansatz wurde 1993 von Tashiro et al. entwickelt. Dabei wurde eine cDNA-Bibliothek auf ihre Fähigkeit durchmustert, die N-terminal verkürzte  $\alpha$ -Untereinheit des menschlichen Interleukin II Rezeptors an die Oberfläche von kultivierte Säugerzellen (COS) zu dirigieren. Die exponierten Fusionsproteine wurden anschließend immunologisch nachgewiesen. In Abwandlung wurde das System auf die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, mit dem Protein Invertase ( $\beta$ -D Fruktofuranosid Fruktohydrolase, EC 3.2.1.26) als Reporter, übertragen (Klein et al., 1996). Die biologische Funktion der von *suc2* kodierten sekretierten Invertase besteht vornehmlich in der extrazellulären Aufspaltung des Zweifachzuckers Saccharose in Glucose und Fruktose (De La Fuente und Sols, 1992) und wird daher von Hefe für das Wachstum auf Medien mit Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle benötigt. In früheren Studien wurde die Invertase für Untersuchungen von Mutationseffekten in Signalsequenzen und für die Identifizierung von Peptiden, welche einen Transport in Vakuole oder Mitochondrium dirigieren, eingesetzt (Kaiser et al., 1987; Saalbach et al., 1991). Aus diesen Studien ging zum einen die hohe Sensitivität der Invertaseselektion hervor, da bereits 0,6 % der nativen Enzymaktivität für eine Detektion ausreichend sind. Zum anderen zeigte sich das Protein, in Bezug auf N-terminal fusionierte Fremdsequenzen relativ tolerant und erlaubte zu dem den Nachweis von in Hefe nur schwach funktionalen Signalsequenzen. Das von Klein et al. entwickelte System benutzt einen auf dem Phagen  $\lambda$  basierenden Expressionvektor, der die Klonierung des zu analysierenden DNA-Fragments zwischen ein 5'-mutiertes Invertasegen (*suc2* <sup>$\Delta$ MSP</sup>) und dessen nativer Promotorsequenz ermöglicht. Das Wildtyp *suc2* Gen kodiert sowohl für eine sekretierte als auch eine cytosolische Isoform der Invertase, die sich lediglich in der 20 Aminosäuren umfassenden Signalsequenz unterscheiden und somit eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen. Um eine Expression der cytosolischen Isoform zu unterbinden und so die Abhängigkeit von einer sekretierten Invertase sicher zu stellen, wurde in *SUC2* <sup>$\Delta$ MSP</sup> neben der Deletion des Signalpeptids zusätzlich das C-terminal folgende, zweite Initiator-methionin gegen ein Alanin ausgetauscht. Wird vor das so mutierte Invertasegen ein DNA-Fragment kloniert, welches für ein funktionales Signalpeptid kodiert, kann das daraus hervorgehende Fusionsprotein die Gendeletion von *suc2*-defizienten Hefestämmen supple-

mentieren und so ein Wachstum auf Medien mit Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle ermöglichen.

## 1.7 Die genomische Sequenz von *U. maydis*

In den letzten fünf Jahren wurden die Genome einiger Pilze vollständig oder teilweise sequenziert und machten diese dadurch für die molekulare Erforschung mittels genomweiter Strategien, wie Insertions- und Transposonmutagenesen oder Mikroarray-Analysen zugänglich. Neben den phytopathogenen Pilzen *U. maydis* und *Magnaporthe grisea* sind hierbei vor allem die humanpathogenen Pilze *Aspergillus fumigatus* und *Cryptococcus neoformans*, sowie die nicht parasitären *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* zu nennen.

Die Ermittlung der genomischen Sequenz des haploiden *U. maydis* Stamms Um521 wurde durch Bayer Cropscience, in Kooperation mit Lion Bioscience und der Arbeitsgruppe Kahmann, begonnen und durch das Whitehead Institut im Jahre 2003 komplettiert. Demnach umfaßt das sequenzierte, haploide Genom 23 Chromosomen mit insgesamt 19.683.350 bp. Die insgesamt 274 Contigs repräsentieren eine zehnfache Genomabdeckung. Der mittlere GC-Gehalt der genomischen Sequenz liegt mit 54 % deutlich höher als bei *Saccharomyces cerevisiae* (38 %), während der Unterschied zu *Neurospora crassa* (49,9 %), *Magnaporthe grisea* (51,6 %), *Aspergillus nidulans* (50,3 %) und *Cryptococcus neoformans* (48,2 %) geringer ausfällt. Eine erste computergestützte Annotierung des *U. maydis* Genoms wurde 2004 durch das Whitehead Institut veröffentlicht. Demnach wurden 6522 Gene annotiert, von denen 37,8 % ein oder mehrere Introns enthalten. Zusätzlich konnten 167 kurze, für Peptide von weniger als 100 AS kodierende, offene Leserahmen, bei welchen es sich um putative Gene handeln könnte, identifiziert werden.

## 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Grundlage dieser Arbeit bildete das von Bayer Cropscience (2001) zu ca. 90 % sequenzierte Genom von *U. maydis* (vgl. 1.7), welches durch funktionelle Genomanalysen nach pathogenitätsrelevanten Genen durchsucht werden sollte. Die funktionelle Eingrenzung bestand dabei in der Suche nach Genen, welche für sekretierte Proteine kodierten. Den experimentellen Zugang hierfür bildete die genomweite, von einzelnen Entwicklungsstadien der Zelle unabhängige, Identifizierung von Signalsequenzen. Dieses Ziel sollte zum einen durch die Signalpeptidselektion (vgl. 1.6) einer zu erzeugenden genomischen Bibliothek und zum anderen durch bioinformatische Analysen der Genomsequenz erreicht werden. Neben der Suche nach Signalsequenzen sollten bioinformatische Methoden die Ergebnisse der Signalpeptidselektion durch das Aufspüren sequenz- und strukturhomologer Gene ergänzen.

Schließlich sollten einige interessante, aus der Genomanalyse hervorgegangene Kandidaten weiterführenden Funktionalanalysen zugeführt werden. Diese bestanden zunächst aus der Bestimmung der subzellulären Lokalisation der Genprodukte mittels Charakterisierung von GFP-Reporterstämmen. Anschließend waren die biologische Funktion und ein evtl. vorhandener Pathogenitätsbezug, durch die Erzeugung und Analyse von Deletionsstämmen zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Bezugsquellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p. a. Qualität von den Firmen Fluka, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma bezogen. Enzyme stammten i. d. R. von Roche, New England Biolabs (NEB) und Invitrogen. Standardpuffer und -Lösungen wurden nach Ausubel (1987) und Sambrook (1989) hergestellt.

#### 2.1.1 Medien

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die folgenden Mengenangaben auf ein Volumen von 1 l in H<sub>2</sub>O. Für Festmedien wurden 15 g / l Agar (Bakterien) bzw. 20 g / l Agar (*Ustilago* und Hefe) eingesetzt. Alle Medien wurden 15 min bei 121 °C autoklaviert.

#### Medien für die Anzucht von *E. coli* (nach Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989):

**LB:** 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 5 g NaCl, pH 7,5

**dYT:** 10 g Hefeextrakt, 16 g Pepton, 5 g NaCl, pH 7,5

**SOC:** 5g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose, pH 7,0

Antibiotika wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach dem Autoklavieren in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 100 µg / ml Ampicillin, 34 mg / ml Chloramphenicol, 50 µg / ml Kanamycin.

#### Medien für die Anzucht von *S. cerevisiae*:

**YEPD:** 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Glucose, 100 mg Adenin, pH 5,8

**YEPSA:** 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Saccharose, 1 mg Antimycin A (in EtOH)

**SD (Synthetisches Dropout):** 6,7 g Yeast Nitrogen Base (Difco), 100 mg Adenin, 0,77 g DO Supplement (Clontech), 20 g Glucose, pH 5,8

#### Medien für die Anzucht von *U. maydis*:

**PD:** 24 g Potato Dextrose Broth (Difco)

**YEPS (Tsukuda *et al.*, 1988):** 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Saccharose

**YEPS<sub>L</sub> (verändert nach Tsukuda *et al.*, 1988):** 10 g Hefeextrakt, 4 g Pepton, 4 g Saccharose

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

- a) Top-Agar: 1,5 % Agar, 1 M Sorbitol, in YEPSL  
 b) Bottom-Agar: wie a) mit zweifach konzentriertem Antibiotikum

**PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium:** 24 g Potato Dextrose Broth (Difco), 20 g Agar, 10 g Aktivkohle

### 2.1.2 Verwendete Kits

PCR Purification Kit (Quiagen), Minelute (PCR Purification, Reaction Cleanup und Gel Extraction) Kit (Quiagen) zur Anreicherung von Nukleinsäuren nach PCR, enzymatischen Reaktionen und Gelelutionen. Plasmid Purification Kit (Mini, Maxi; Quiagen) zur Präparation von hochreiner Plasmid-DNA.

### 2.1.3 Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden in der zentralen Servicegruppe für automatische DNA Isolierung und Sequenzierung (ADIS) des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung durchgeführt.

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion, Sigma und MWG synthetisiert und ihre Nukleotidsequenz wird in 5' -3' Orientierung angegeben. Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

#### Adapter:

EAG\_Fwd: CTGAACTCGCTGAAGATAAC

EAG\_Rev: GGCCGTTATCTTCAGCGAGTTCAG

#### Sequenzierung:

RK18-Fwd GGATTTTCGATCCTATAATCCTTCCTCCTG

RK18-Rev GTATTGAAAGTACAGATGCCATTTGG

#### Gendeletionen:

KEX2-1b\_Fwd ACCGCAGCAACAGTCACAGTGTTCG

KEX2-1b\_Rev CACGGCCTGAGTGGCCAAGGAGCCTGTAGAGCAGAAGCGAC (*SfiI*)

KEX2-rb\_Fwd GTGGGCCATCTAGGCCTTGTAAGCGCACTCAATTGGTTCGC (*SfiI*)

KEX2-rb\_Rev TGAATTTGCTGTTCTTCTTGCTCGC

KEX2-1b\_out ACATTCAGAAGGACGGATGAAAGGC

KEX2-ORF\_Fwd ACAGCGTTGGTCTCGTATTCGTTCG

KEX2-ORF\_Rev ACCAACCCGCCAGCTACAATCACC

PLB1-1b\_Fwd GAATCGTGAATCGTGAAGCAAATCC

PLB1-1b\_Rev CACGGCCTGAGTGGCCAAGGAGCCTGTAGAGCAGAAGCGAC (*SfiI*)

PLB1-rb\_Fwd GTGGGCCATCTAGGCCTTGTAAGCGCACTCAATTGGTTCGC (*SfiI*)

PLB1-rb\_rev TTTGCCTATCAGAGCTTGGATGCG

PLB1-1b\_out GGCGAATAAGTTAAGCCAAACGTCC

REP1-lb\_Fwd TTTGCGTATTCCACCTGCAGTAGCC  
 REP1-lb\_Rev CACGGCCTGAGTGGCCAAGAGAGTGTGATTCTTGCGAGCGG (*SfiI*)  
 REP1-rb\_Fwd GTGGGCCATCTAGGCCCTGCTTGAGATCGCTATGCAGATGG (*SfiI*)  
 REP1-rb\_Rev CAACTACTGGGAAAAGTATGGAGCGG  
 REP1-lb\_out ATCAGGGCTTCTGCTACTTGCTCCC  
 REP1-ORF\_Fwd ATGCCTTCCAAGATCGCGCTTTC  
 REP1-ORF\_Rev TTGGTGAGCAGGCTCAGCTTGACC  
 UMP1-lb\_Fwd CGAATTCGTTTGCATTTCAGGATTC  
 UMP1-lb\_Rev CACGGCCTGAGTGGCCGAGTGGTATAAGCTGCTCGAATCC (*SfiI*)  
 UMP1-rb\_Fwd GTGGGCCATCTAGGCCATTGCATCCAGAGCTTGTCATTG (*SfiI*)  
 UMP1-rb\_Rev GCCAACAAGGAGAGCAAACCTTTG  
 UMP2-lb\_Fwd CCGATGATCAACAAACCAGAATGG  
 UMP2-lb\_Rev CACGGCCTGAGTGGCCCTGAACAGAGATGTTCCGGGTGTTG (*SfiI*)  
 UMP2-rb\_Fwd GTGGGCCATCTAGGCCGACCGGTTACACACCACATATCC (*SfiI*)  
 UMP2-rb\_Rev CTTGTTTCGCGCAAAGCAGTAACC  
 YSST11-lb\_Fwd ACATTCAGCAAACAGCAAATGACCC  
 YSST11-lb\_Rev CACGGCCTGAGTGGCCGCTGAAGAGCTAGAGAGTGTGGTTGG (*SfiI*)  
 YSST11-rb\_Fwd GTGGGCCATCTAGGCCGTCGTGACTGCTCGCTCTCTTTCC (*SfiI*)  
 YSST11-rb\_Rev TGACGTGCTGGCTAAGTTGTCGC  
 YSST11-lb\_out CACTCATTCAAAGCGTCCACTTGCC  
 YSST29-lb\_Fwd CTCGTCACTCGCTAACGAAACTTCG  
 YSST29-lb\_Rev CACGGCCTGAGTGGCCAGAAAGTGGTGAGGGTTGACAAGGG (*SfiI*)  
 YSST29-rb\_Fwd GTGGGCCATCTAGGCCCTTCAGCGCTTCTCATAGCCCAATC (*SfiI*)  
 YSST29-rb\_Rev AGCTAGATGGTCGTTGGGCTTGG  
 YSST29-lb\_out CCAAGCAATCACGAATCGTCTCGC  
 RPH1lb\_Fwd CGGAAAGGGATGTCTTGGTTGTTAC  
 RPH1lb\_Rev CACGGCCTGAGTGGCCAGGCAGTTGATTGGTGTGTTGGATAG (*SfiI*)  
 RPH1rb\_Fwd GTGGGCCATCTAGGCCCTTGGTTTCGATTCTGGTTTCGTC (*SfiI*)  
 RPH1rb\_Rev ATGTGAAGTACAAACTTCGGCGTGC  
 RSP1-lb\_Fwd ACCGAGGCTATGGTTCTTCTAGTCC  
 RSP1-lb\_Rev2 CACGGCCTGAGTGGCCGCTGAAGAGATGCTGCTGCGAGAGG (*SfiI*)  
 RSP1-rb\_Fwd2 GTGGGCCATCTAGGCCCTGTACGCTCTTTCTCGCTCACAACC (*SfiI*)  
 RSP1-rb\_Rev TCTACTAACCGAAGGCTCTGACCTGG  
 RSP1-lb\_out TGTGTGTGTATGAGTGATTCTCGGCG

### GFP-Fusionen:

GLO1M1-GFP\_Fwd ATGACGAGGCACCTCTCCTCATC  
 GLO1M2-GFP\_Fwd ATGACCCTCGCAACCCTTTCTCTC  
 GLO1-GFP\_Rev GCGTCGACTAGAGTAGCTTCTCTGG  
 GLO1-SP1\_Fwd GAGAGAGGATCCATGACGAGGCACCTCTCCTCATC (*BamHI*)  
 GLO1-SP1\_Rev GAGAGACCATGGACGAGGTTAGGGCGAGAGAAAGG (*NcoI*)  
 GLO1-SP2\_Fwd GAGAGAGGATCCATGACCCTCGCAACCCTTTCTCTC (*BamHI*)

GLO1-SP2\_Rev GAGAGACCATGGCGAGTGAGTTGGTGTGACAACCTC (*NcoI*)  
 GLO1d300\_Rev GAGAGACCATGGAGAAAGTGTGGTCTGGACGGCG (*NcoI*)  
 KEX2-GFP-lb\_Fwd TCCAAAGCGGTGCCGTGGAACCTC  
 KEX2-GFP-lb\_Rev CACGGCCGCGTTGGCCTTCTGTCCCGGCCAGCAAGC (*SfiI*)  
 KEX2-GFP-rb\_Fwd GTGGGCCTGAGTGGCCTTGTAAGCGCACTCAATTGGTCGC (*SfiI*)  
 UMP1-GFP\_Fwd GAGAGAGGATCCATGAAGGCTGTCTCTGCTGC (*BamHI*)  
 UMP1-GFP\_Rev GAGAGATCATGAAGAGGAGGTAAGCACCGACCG (*BspHI*)  
 UMP1-L-GFP\_Fwd GAGAGAGGATCCATGCAGTCGGTCGCTCCTTTTCAG (*BamHI*)  
 UMP2-M1-GFP\_Fwd GAGAGATGATCAATGTTCTTCTCCAAGGCTGTTTCG (*BclI*)  
 UMP2-M2-GFP\_Fwd GAGAGATGATCAATGGGCGCCACCGTCCTTG (*BclI*)  
 UMP2-GFP\_Rev GAGAGACCATGGAGAGCATCATGGCGCCAGCG (*NcoI*)  
 YSST11-GFP\_Fwd GAGAGATGATCAATGCAGTTCAAGACCATCTTCGCTAC (*BclI*)  
 YSST11-GFP\_Rev GAGAGATCATGAGGTTGATCGAGAGGGGGTGCAC (*BspHI*)  
 YSST29-GFP\_fwd GAGAGATGATCAATGGCCCCCATCGCTAAGACC (*BclI*)  
 YSST29-GFP\_rev GAGAGATCATGAGAGCCCAGTCCCCTTGATCGAGACC (*BspHI*)  
 YSST29-SP1\_rev GAGAGATCATGAGAGCAGCAGCGTGTGGGAGTTAAG (*BspHI*)  
 RPH1-GFP\_Fwd GAGAGAGGATCCATGAAGTACCTTCAGTTCCTCGCTG (*BamHI*)  
 RPH1-GFP\_Rev GAGAGACCATGGAGTTGATAGGGATCGAAGTGCAGC (*NcoI*)

### Invertase- (SUC2-) Fusionen:

GLO1-M1-SUC2\_Fwd GAGAGAGAGAGCGGCCGATGACGAGGCACCTCTCCTCATC (*NotI*)  
 GLO1-M2-SUC2\_Fwd GAGAGAGAGAGCGGCCGATGACCCTCGCAACCCTTTCTCTC (*NotI*)  
 GLO1-SUC2\_Rev GAGAGAGAGAGCGGCCGAGAAAGTGTGGTCTGGACGGCG (*NotI*)  
 GLO2-M1-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGGCGACCTTGACTCAGACG (*EagI*)  
 GLO2-M2-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGGAGGTGCGTTCCAACACG (*EagI*)  
 GLO2-SUC2\_Rev CAATCGGCCGGTGTGGAACGCACCTCCATG (*EagI*)  
 GLO3-M1-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGACAAGAAGAGATACTGCTGTTCGC (*EagI*)  
 GLO3-M2-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGGCTGCATCGTCCATGGC (*EagI*)  
 GLO3-SUC2\_Rev GTTACGGCCGGCTGTGGTGTGAAACGTGG (*EagI*)  
 KEX2-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGAAAGCCATCAAGCTATCCAGC (*EagI*)  
 KEX2-SUC2\_Rev CAATCGGCCGAGTGGTTTTGCAATTCACCTGCTC (*EagI*)  
 UMP2-M1-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGTTCTTCTCCAAGGCTGTTTCGTC (*EagI*)  
 UMP2-M2-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGGGCGCCACCGTCCTTG (*EagI*)  
 UMP2-SUC2\_Rev CAATCGGCCGGTGCAGTAGGCGACTGTGATCTCC (*EagI*)  
 UMP3-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGACCAAACCTCACGCTCACCGTAGC (*EagI*)  
 UMP3-SUC2\_Rev CAATCGGCCGGTCTGGCACTTGGAGTCTTGGTTCC (*EagI*)  
 UMP4-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGTTTACCAAGTCTGTTTTTCATCGC (*EagI*)  
 UMP4-SUC2\_Rev CAATCGGCCGATGGTGCCATCAGGGATCAGACG (*EagI*)  
 UMP5-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGCGCTTTGGAGGCTTGGCAG (*EagI*)  
 UMP5-SUC2\_Rev CAATCGGCCGACCGGGTTGATGCAGTATGACACAG (*EagI*)  
 UMP6-SUC2\_Fwd GTTACGGCCGATGACGCGTACACTTGTCTATGCTAT (*EagI*)  
 UMP6-SUC2\_Rev CAATCGGCCGTTCCGAATGAGGCGAGTACCGTAAC (*EagI*)

### 2.1.5 Plasmide

Die verwendeten Plasmide trugen zur Selektion in *E. coli* eine Ampicillin-Resistenzkassette. Alle durchgeführten Klonierungsschritte wurden per Restriktionsanalyse bzw. Sequenzierung überprüft.

#### 2.1.5.1 Ausgangsplasmide

##### **Klonierungsplasmide:**

**pBS(+)**SKII (Stratagene): allgemeiner Klonierungsvektor

**pCR2.1-TOPO** (Invitrogen): dieser Vektor wurde vornehmlich zur Zwischenklonierung von PCR-Konstrukten verwendet.

##### **Plasmide für Arbeiten mit *S. cerevisiae*:**

**pRK18** (Klein et al., 1996): Plasmid für das „yeast Signal Sequence Trap“ System. Enthält eine CEN/ARS Region zu freier Replikation in Hefe, das *URA3*-Markergen, sowie den um die Signalsequenz deletierten *suc2*-Lokus.

**p181A1NE** (Riesmeier et al., 1992): Hefe-Expressionsvektor, welcher eine  $2\mu$ -Region, das *LEU*-Markergen, sowie den *ADH1*-Promotor enthält.

##### **Plasmide für Arbeiten mit *U. maydis*:**

**pCA123** (C. Aichinger, persönliche Mitteilung): Plasmid für Lokalisationsstudien von Proteinen in *U. maydis*. Es enthält das *eGFP*-Gen (Clontech) unter der Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette zur ektopischen Integration in das *U. maydis* Genom.

**pBS-hnn** (J. Kämper, unveröffentlicht): enthält eine Hygromycin B-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment.

**pMF1-n** (Brachmann et al., 2003): enthält eine Nourseotricin-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment.

**pMF3-h** (Brachmann et al., 2003): enthält das *eGFP*-Gen (Clontech) und eine Hygromycin B Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment.

**Freireplizierende cDNA-Bank** (P. Porschewski, persönliche Mitteilung): cDNA-Bank einer Kreuzung der Stämme UM518 (a2 b2) und UM521 (a1 b1) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem PD-Medium (für 15, 24 und 48 h). Die Bank wurde für „Yeast Two Hybrid“ Analysen in pENRT4 (Invitrogen) kloniert. In dieser Arbeit diente sie zur Ermittlung von 5'-Enden ausgesuchter *U. maydis* Gene.

### 2.1.5.2 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

#### Plasmide für Arbeiten mit *S. cerevisiae*:

**Freireplizierende gDNA-Bank:** diese Bank diente zur „Yeast Signal Sequence Trap“ Analyse des *U. maydis* Genoms. gDNA-Fragmente aus dem *U. maydis* Stamm Um521 (a1 b1) wurden über *NotI* vor das deletierte 5'-Ende von *suc2*<sup>AMSP</sup> in pRK18 kloniert.

**pYSST(+1,+2,+3):** ein Set aus drei p181A1NE-Derivaten, bei denen das mutierte *suc2*-Gen aus pRK18 als *NotI* / *BglII* PCR-Fragment hinter den ADH-Promotor eingefügt wurde. Es wurden drei *NotI*-Primer entworfen, welche die *NotI* Schnittstelle in allen drei Leserahmen vor den ORF von *suc2* positionierten.

**pYSST(+1)-pho11:** bei diesem Konstrukt wurden 300 bp des 5'-Endes von *PHO11*, eines in Hefe für eine sekretierte saure Phosphatase kodierenden Gens, als *EagI* PCR-Fragment über *NotI* mit *suc2* fusioniert. Das Plasmid diente als Positivkontrolle für das „Yeast Signal Sequence Trap“ System.

**pRK18-pho11:** analog zu pYSST(+1)-pho11

### 2.1.6 Biologisches Material

#### 2.1.6.1 Bakterien-Stämme

*E. coli* DH5 $\alpha$ : F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ* .M15

#### 2.1.6.2 Hefe-Stämme

Die in dieser Arbeit für das „Yeast Signal Sequence Trap“ System verwendeten Hefen wurden von Euroscarf bezogen und wiesen folgende Genotypen auf:

*S. cerevisiae* BY4741: MATa, *his3D1*, *leu2D0*, *met15D0*, *ura3D0*, *suc2D0*

*S. cerevisiae* BY4742: MATalpha, *his3D1*, *leu2D0*, *lys2D0*, *ura3D0*, *suc2D0*

#### 2.1.6.3 *Ustilago*-Stämme

##### Ausgangsstämme:

Um518 (a2 b2)

Um521 (a1 b1)

FBD11 (a1a2 b1b2; Banuett und Herskowitz, 1989)

##### In dieser Arbeit hergestellte Stämme:

Stamm	Genotyp	Resistenz
Um518 $\Delta$ ump1	a2 b2 $\Delta$ ump1	Hyg <sup>R</sup>
Um521 $\Delta$ ump1	a1 b1 $\Delta$ ump1	Hyg <sup>R</sup>
Um518-ump1-GFP	a2 b2 <i>ump1::eGFP</i>	Cbx <sup>R</sup>

Um518-ump1-L-GFP	a2 b2 $\Delta$ 18ump1::eGFP	Cbx <sup>R</sup>
Um518 $\Delta$ ump2	a2 b2 $\Delta$ ump2	Hyg <sup>R</sup>
Um521 $\Delta$ ump2	a1 b1 $\Delta$ ump2	Hyg <sup>R</sup>
FBD11 $\Delta$ ump2	a1 a2 b1 b2 $\Delta$ ump2	Hyg <sup>R</sup>
Um18-ump2-M1-GFP	a2 b2 ump2::eGFP	Cbx <sup>R</sup>
Um18-ump2-M1-GFP	a2 b2 $\Delta$ 14ump2::eGFP	Cbx <sup>R</sup>
Um518 $\Delta$ ysst11	a2 b2 $\Delta$ ysst11	Hyg <sup>R</sup>
Um521 $\Delta$ ysst11	a1 b1 $\Delta$ ysst11	Hyg <sup>R</sup>
Um518 $\Delta$ ysst29	a2 b2 $\Delta$ ysst29	Hyg <sup>R</sup>
Um521 $\Delta$ ysst29	a1 b1 $\Delta$ ysst29	Hyg <sup>R</sup>
Um518 $\Delta$ rph1	a2 b2 $\Delta$ rph1	Hyg <sup>R</sup>
Um521 $\Delta$ rph1	a1 b1 $\Delta$ rph1	Hyg <sup>R</sup>
Um521-rph1-GFP	a1 b1 rph1::eGFP	Cbx <sup>R</sup>
Um518 $\Delta$ rph1 $\Delta$ hum2	a2 b2 $\Delta$ rph1 $\Delta$ hum2	Hyg <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>
Um521 $\Delta$ rph1 $\Delta$ hum2	a1 b1 $\Delta$ rph1 $\Delta$ hum2	Hyg <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>
Um518 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rsp1	a2 b2 $\Delta$ rph1 $\Delta$ hum2	Hyg <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>
Um521 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rsp1	a1 b1 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rsp1	Hyg <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>
Um518 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rep1	a2 b2 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rep1	Hyg <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>
Um521 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rep1	a1 b1 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rep1	Hyg <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>
FBD11 $\Delta$ kex2	a1 a2 b1 b2 $\Delta$ kex2	Hyg <sup>R</sup>
UM518 $\Delta$ plb1	a2 b2 $\Delta$ plb1	Hyg <sup>R</sup>
UM521 $\Delta$ plb1	a1 b1 $\Delta$ plb1	Hyg <sup>R</sup>

### 2.1.7 Pflanzenmaterial

Für Pathogenitätstests wurden Pflanzen der *Zea mays* Varietät „Gaspar Flint“ verwendet.

## 2.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

### 2.2.1 *Escherichia coli*

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

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

#### 2.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte von *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem SmartSpec 3000 Photometer (Biorad) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für

die Messung der  $OD_{600}$  die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die  $OD_{600}$  des jeweiligen Kulturmediums verwendet.  $OD_{600} = 1,0$  entspricht etwa  $10^9$  Zellen / ml.

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

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 250 ml dYT-Medium mit einer *E. coli*-Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 – 0,8 im Inkubationsschüttler angezogen. Die Kultur wurde anschließend für 30 min auf Eis inkubiert und danach bei 4000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 ml eiskaltem sterilem Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert. Diese Wäsche wurde mit 100 ml eiskaltem sterilem Wasser wiederholt und im Anschluß wurden die Zellen in 4 ml 10% Glycerin resuspendiert und bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert. Danach wurden die sedimentierten Bakterien in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

### 2.2.1.4 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

50 µl elektrokompetente Zellen wurden mit 1 µl Plasmidlösung (1–5 ng Plasmid) gemischt und in sterile, eiskalte Elektroporationsküvetten überführt. Der Transfer der plasmidären Fremd-DNA erfolgte durch einen elektrischen Impuls ( $U = 1,6$  kV,  $C = 25$  µF,  $R = 200$  Ω). Die erreichten Zeitkonstanten betragen 4,7 - 5,2 msec. Der Transformationsansatz wurde in 1 ml SOC Medium aufgenommen, 50 min bei 37 °C inkubiert, anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.2.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 30°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Bei -80°C gelagerte Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

### 2.2.2.2 Bestimmung der Zelldichte von *S. cerevisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde wie für *E. coli* beschrieben bestimmt. Eine  $OD_{600}$  von 1.0 entspricht etwa  $1-5 \times 10^7$  Zellen / ml. Alternativ wurden die Zellen mit einem Haemocytometer ausgezählt.

### 2.2.2.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Eine in 5 ml YEPD-Medium über Nacht bei 30°C und 200 Upm angezogene Vorkultur wurde 1:50 in 50 ml YEPD-Medium verdünnt und 4-5 h bei 30°C und 200 Upm bis zu einer Zelldichte von  $3 \times 10^7$  Zellen / ml inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 50 ml ein Reaktionsgefäß (Falcon) gegeben und 5 min bei 5000 Upm in einer Heraeus-Zentrifuge bei RT sedimentiert. Die Zellen wurden mit 25 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, das Sediment in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach 15 s Zentrifugation bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen, die Zellen in ca. 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Dies entsprach einer Zelldichte von ca.  $1 \times 10^9$  Zellen / ml. Die Zellsuspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt, diese 15 sec sedimentiert und jeweils durch Zugabe von 360 µl Transformationsansatz, welcher 0,1-1 µg Plasmid-DNA enthielt, durch 1 min vortexen gelöst. Die Transformationsansätze wurden danach für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, ehe für 30 Minuten bei 42 °C ein Hitzeschock folgte. Die Zellen wurden dann ein letztes mal sedimentiert (15 s, 7.000 Upm), in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen.

#### Transformationsansatz

240 µl PEG (50% w / v)  
 36 µl 1.0 M LiAc  
 50 µl SS-DNA (2.0 mg / ml)  
 X µl Plasmid DNA (0.1 - 10 µg)  
 34-X µl H<sub>2</sub>O  
 360 µl ges. Volumen

### 2.2.3 *Ustilago maydis*

#### 2.2.3.1 Herstellung kompetenter *U. maydis* Protoplasten

Die Transformation wurde in abgeänderter Form nach dem Protokoll von Schulz et al. (1990) durchgeführt. Eine bei 28 °C in 50 ml YEPSL angezogene Übernachtskultur wurde bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,8 und 1,0 geerntet. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 1250 g (RT) wurden die Zellen in 25 ml SCS (20 mM Na-Citrat, pH 5,8; 1 M Sorbitol) gewaschen und erneut zentrifugiert (s.o.). Das Sediment wurde in 2 ml SCS, in welchem 2,5 mg / ml Novozym 234 (Novo Nordisc) gelöst waren, resuspendiert. Die Protoplastierung wurde bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von maximal 25 min durchgeführt. Dabei wurde die Protoplastierung, bei der die Zigarrenförmigen Zellen durch den Abbau der Zellwand zu einer Kugelform übergehen, unter dem Lichtmikroskop ca. alle 5 min kontrolliert. Nach dem Verdau wurden 10 ml SCS hinzugefügt und die Protoplasten durch Zentrifugation bei 800 g und 4 °C sedimentiert. Zur Entfernung des Novozyms wurden zwei weitere Waschschrte mit 10 ml SCS und ab-

schließlich mit STC (10 mM Tris-Cl, pH 7.5; 100 mM CaCl<sub>2</sub> 1 M Sorbitol) vorgenommen. Die Protoplasten wurden in 0,5 ml eiskaltem STC resuspendiert und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots konnten direkt für die Transformation verwendet, bzw. für eine spätere Transformation bei -80 °C gelagert werden.

### **2.2.3.2 Transformation von *U. maydis***

5 µg eines linearisierten Plasmids oder einer Gendeletionskassette, deren Maximalvolumina 7 µl betragen, wurden mit 1,5 µl einer 15 mg / ml Heparin-Lösung versetzt und zu 50 µl kompetenten Protoplasten hinzugefügt. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 500 µl 4 °C kaltem STC/PEG4000 (10 g PEG4000 / 15 ml STC) versetzt und für weitere 15 bis 30 min auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurden frische Selektionsplatten aus Regenerationsagar hergestellt. Dazu wurden mit 10 ml Bottom-Agar (zweifach konzentriertes Antibiotikum) vergossene Platten mit 10 ml 60 °C warmen Top-Agar überschichtet. Nach dem Aushärten wurde auf diese Gradientenplatten das gesamte Transformationsgemisch ausgebracht und für vier (Hygromycin B-, Carboxin-Selektion) bzw. sieben Tage (NAT-Selektion) bei 28 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden daraufhin auf PD-Selektionsplatten überführt und vereinzelt.

### **2.2.3.3 Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum**

*U. maydis*-Stämme wurden bei 28 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 angezogen, geerntet (Zentrifugation bei 3.500 Upm für 5 min bei RT; Heraeus Varifuge 3.0R) und anschließend in H<sub>2</sub>O auf eine Zelldichte mit einer OD<sub>600</sub> von 3,0 eingestellt. Bei Kreuzungen wurde gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einer Mikrotiterplatte miteinander gemischt und von diesen Ansätzen je 3 µl auf eine aktivkohlehaltige PD-Festmedienplatte getropft. Die Platte wurde für 48 h bei RT unter Luftabschluß inkubiert.

### **2.2.3.4 Test auf Pathogenität**

0,7-1 ml einer Pilzsuspension aus genetisch kompatiblen Zellen (in H<sub>2</sub>O, OD<sub>600</sub> = 3,0) wurden in das Innere des Blattwirtels 2 Wochen alter Maispflanzen der Sorte Gaspar Flint getropft. Die Stämme wurden vorher über Nacht in YEPS-Flüssigkultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen, geerntet (Zentrifugation bei 3.500 Upm für 10 min bei RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und in H<sub>2</sub>O auf eine OD<sub>600</sub> von 3,0 eingestellt. Die Bonitur der infizierten Pflanzen erfolgte etwa 14 Tage nach der Infektion.

### **2.2.3.5 Sporulation und Segregationsanalyse**

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5 %igen CuSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschlie-

ßend mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf PD-Festmedium ausplattiert. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden zweimal vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen Um521 (a1 b1), UM518 (a2 b2) bestimmt.

### 2.2.3.6 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axio-phot, ZEISS) mittels DIC-Optik und Fluoreszenz-Mikroskopie. 7 µl der entsprechenden Kultur wurden zur Analyse auf Objektträger getropft, mit 7 µl einer 2 % wässrigem Low-Melting-Agarose-Lösung (37°C; Sigma) vermischt, und mit einem Deckgläschen bedeckt. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie von GFP-Reporterstämmen wurde ein Filter mit einem Anregungs- und Emissionsspektrum von 450-490 nm eingesetzt. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm Image Pro Plus (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) und als TIFF-Dateien abgespeichert.

## 2.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie die Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind in Ausubel et al. (1987) und Sambrook et al. (1989) ausführlich beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht OD<sub>260</sub> von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub>. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 bzw. 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem UV-Spektralphotometer (SmartSpec 3000, Biorad).

### 2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von hochreiner Plasmid-DNA erfolgte je nach gewünschtem Maßstab mit den Plasmid Purification Kits der Firma Quiagen, nach den Angaben des Herstellers.

### 2.3.2 Schnellpräparation von genomischer DNA aus *U. maydis*

Für die DNA-Präparation für Southern-Analysen wurde eine nach Hoffmann und Winston (1987) modifizierte Protokoll verwendet. 4 ml einer Übernachtskultur wurden resuspendiert, der Überstand abgegossen und das Sediment in der restlichen Flüssigkeit gelöst. Es wurden 200 µl *Ustilago*-Lysispuffer, 400 µl Phenol/Chloroform und 0,2 g Glasperlen zugegeben. Die Proben wurden für 4 min gevortext. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 Upm. 200 µl des Überstands wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl Etha-

nol gefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm wurde der Überstand abgenommen, das DNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und nach 5 min Trocknung bei RT in 30 µl TE + 3 µl RNase A (10 mg/ml) bei 50 °C unter Schütteln resuspendiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20°C.

*Ustilago*-Lysispuffer: 50 mM Tris-Cl, pH 7,5  
50 mM EDTA  
1 % (w/v) SDS

### 2.3.3 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus *U. maydis*

Zellen des *U. maydis* Stammes Um521 wurden in 200 ml YEPS<sub>L</sub>-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen und sedimentiert (3.500 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R). Anschließend wurde das Zellsediment in 25 ml SCS-Puffer gewaschen und in 25 ml 5 mg/ml Novozym/SCS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden darin bis zur vollständigen Abrundung protoplastiert und wiederum sedimentiert (2.300 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Sediment wurde in 1 ml SCS-Puffer aufgenommen und mit 9 ml NDS-Puffer, mit 0,5 mg/ml Proteinase K versetzt. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluß wurde das Gemisch mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (10.000 Upm, 10 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge). Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, ehe eine Extraktion mit Chloroform erfolgte. Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (10.000 Upm, 10 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die wäßrige Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol gefällt (30 min bei 4°C). Nach Zentrifugation (10.000 Upm, 30 min, RT, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, 5 min bei RT getrocknet und in 500 µl 10 mM Tris-Cl, pH 7,6 aufgenommen.

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

NDS-Puffer: 20 mM Tris-Cl, pH 9,5  
0,5 M EDTA  
1 % Sarcosyl  
in H<sub>2</sub>O

### 2.3.4 RNA-Isolation aus *U. maydis*

Die Methode von Timberlake et al. (1986) diente zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die für 48 h auf PD-Charcoal-Festmedien gewachsen waren. Dazu wurde das Pilzmaterial von 3 Platten abgekratzt, in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Das gefrorene Pulver wurde mit 5 ml RNA-Lysepuffer durchmischt und durch Zugabe von flüssigem Stickstoff erneut eingefroren. Die Mischung wurde zu einem feinen Pulver gemörsert, in 10 ml TE-Phenol überführt, in diesem bei RT aufgetaut und anschlie-

ßend mit 0,5 ml Glasperlen für 4 min in 30 ml Reaktionsgefäßen heftig geschüttelt. Dem Ansatz wurden 10 ml Chloroform zugesetzt, nach Zentrifugation (15 min, 10.000 Upm, 4°C, Beckman Avanti 30 Zentrifuge) und Phasentrennung die wäßrige Phase in neue Gefäße überführt, dreimal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, die RNA anschließend durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Li-Acetat für 4 h bei 0° C gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 10.000 Upm, 4°C, Beckman Avanti 30 Zentrifuge) sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal in RNA-Waschpuffer gewaschen, nach Trocknung in H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1%-igen TAE-Agarosegel analysiert.

Lysepuffer (RNA):	Lösung 1	250 mM EGTA 1,25 M NaCl 1 M Tris-Cl, pH 8,5 in H <sub>2</sub> O
	Lösung 2	12% (w/v) Natrium-p-Aminosalicylsäure in H <sub>2</sub> O, frisch ansetzen
	Lösung 3	2% (w/v) tri-iso-Propylnaphthalensulfonat in H <sub>2</sub> O, frisch ansetzen

Herstellung des RNA-Lysepuffers: Unter ständigem Rühren wurden 40 ml Lösung 2 langsam in 40 ml Lösung 3 getropft und dann 20 ml Lösung 1 zugeben. Der pH wurde mit NaOH auf 8,9 eingestellt. Der Puffer war auf Eis für einen Tag haltbar.

RNA-Waschpuffer: 0,3 M Na-Acetat, pH 5,3  
70% (v/v) Ethanol  
in H<sub>2</sub>O

### 2.3.5 Herstellung von Gendeletionskassetten

Aus den Plasmiden pBS-hnn, pMF1-n und pMF3-h wurde die Selektionskassette mit *Sfi*I herausgeschnitten und aus einem 0,6 % Agarosegel eluiert (Minelute Gelextraction Kit, Quiagen). An die *Sfi*I-Schnittstellen dieser Kassetten wurden zwei ca. 1 kb große, das zu deletierende Gen flankierende, genomische DNA-Abschnitte ligiert. Die gDNA-Flanken wurden jeweils mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert, wobei an die an das auszutauschende Gen grenzenden Primer eine *Sfi*I-Schnittstelle angefügt war. Nach Restriktion mit *Sfi*I wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe des Minelute Reaction Cleanup Kit (Quiagen) aufgereinigt. Ein typischer Ligationsansatz (T4-Ligase, Invitrogen) enthielt in 50 µl Gesamtvolumen 0,5-1 µg der Resistenzkassette, sowie ca. 200 ng pro gDNA-Flanke und wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wurde über ein 0,6 % Agarosegel aufgetrennt und die Gendeletionskassette eluiert (Minelute Gelextraction Kit, Quiagen). Es folgte eine weitere

PCR-Amplifikation (Taq Polymerase, Takara) der zuvor in 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 1:50 verdünnten Kasette.

### **2.3.6 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren**

#### **2.3.7 Transfer von DNA (Southern-Blot)**

Die Methode wurde nach Southern (1975) modifiziert. Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wurde die Transfer-Lösung (20 x SSC) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel aufliegenden Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente wurden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und banden an die darüberliegende positiv geladene Nylonmembran (Roche). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten und so den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte für 2 h oder über Nacht.

DENAT-Lösung:     1,5 M NaCl  
                  0,4 N NaOH

#### **2.3.8 Herstellung von Hybridisierungssonden für Southern-Analysen**

Doppelsträngige DNA-Hybridisierungssonden wurden mit Dig-dUTP markiert. Dazu wurde einem Standard-PCR Ansatz von 50 µl (vgl. 2.3.10.1) statt 10 mM dTTP 0,5 mM Dig-dUTP (Roche) und 9,5 mM dTTP zugesetzt. Ein Kontrollansatz enthielt dagegen kein Dig-dUTP. Nach erfolgter PCR wurde der Dig-dUTP-Einbau im Vergleich zu unmarkierter DNA durch Auftrag von 1 µl Aliquots auf ein Agarosegel kontrolliert. Dabei verlief die markierte Sonde stets oberhalb des unmarkierten Amplifikats.

#### **2.3.9 Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren**

Die Nylonmembranfilter wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Dig-Easy-Hyb Hybridisierungspuffer (Roche) für 30 min bei 45 °C vorhybridisiert. Nach Wechsel des Hybridisierungspuffers wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte Dig-markierte Hybridisierungssonde zugegeben (Endkonzentration etwa 25 ng/ml). Die spezifische Hybridisierung erfolgte bei 45°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 5 min bei RT mit 2 x SSC/ 0,1 % SDS und je 15 min mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS gewaschen. Es folgte ein immunologischer Nachweis der Dig-markierten DNA-Sonde mit Hilfe eines Dig-spezifischen Antikörpers (Roche) nach den Angaben des Herstellers. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und auf chemoluminiszenzsensitivem Film (Roche) für 20 min – 1h exponiert.

### 2.3.10 PCR-Techniken

#### 2.3.10.1 Standard PCR-Ansätze

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 5-100 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$ , dNTPs in einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  (d.h. je 200  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1 U Taq Polymerase (Quiagen) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus: 95 °C/5 min - 94 °C/1 min - [94°C/1 min – 55 °C/1 min – 72 °C/1 min] x 35 – 72 °C/7 min. Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate mußten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepaßt werden.

#### 2.3.10.2 Ganzzell-PCR aus *E. coli*-Zellen

Einzelne Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pipetierspitze gepickt und unter kurzem Umrühren in 25  $\mu\text{l}$  vorgelegtem PCR-Reaktionsansatz resuspendiert. Der PCR-Reaktion ging ein einleitender Inkubationsschritt von 95 °C für 10 min voraus, wodurch die Zellen aufplatzen und die Template-DNA in den Reaktionspuffer diffundierte.

#### 2.3.10.3 Ganzzell-PCR aus *S. cerevisiae*- und *U. maydis*-Zellen

Für die PCR aus *S. cerevisiae*-Zellen wurden einzelne kleinere Kolonien von maximal 1 mm Durchmesser mit einer sterilen Pipetierspitze gepickt, unter kurzem Umrühren in 20  $\mu\text{l}$  vorgelegter 0,02 N NaOH-Lösung resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Die NaOH bewirkte eine Lyse der Zellen und eine Freisetzung ausreichender Mengen an DNA-Template. Von den Lysaten wurden je 2  $\mu\text{l}$  /50  $\mu\text{l}$  PCR-Reaktionsansatz eingesetzt, während der Rest bei –20 °C aufbewahrt wurde. Die *U. maydis*-Ganzzell-PCR wurde in Abwandlung analog zu *S. cerevisiae* durchgeführt. Zur Verbesserung der PCR-Effizienz ging der NaOH-Lyse jedoch ein Novozym-Verdau voraus. Dazu wurden die Zellen in 50  $\mu\text{l}$  Novozym-Lösung (2,5 mg Novozym/2ml H<sub>2</sub>O) resuspendiert, 1 h bei RT inkubiert und dem Verdau anschließend 50  $\mu\text{l}$  0,04 N NaOH (Endkonzentration 0,02 N) zugegeben. Die weitere PCR erfolgte wie für Hefe beschrieben.

## 2.4 Funktionelle Genomanalyse mittels Signalpeptidselektion

### „yeast signal sequence trap“

Die Signalpeptidselektion wurde nach Klein et al. (1996) durchgeführt und für die Durchmusterung einer genomischen DNA-Bibliothek modifiziert.

### 2.4.1 Fragmentierung genomischer DNA mittels partiellen DNase I Verdau

20 µg hochmolekulare, genomische DNA des *Ustilago*-Stamms Um521 wurden ad 179 µl in H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 20 µl frisch angesetzten 10 x DNase I-Reaktionspuffer versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl der 1:1000 verdünnten DNase I (Roche) gestartet und dem Reaktionsansatz in Abständen von jeweils 1 min 10 µl Aliquots, welche schnellstmöglich in 1,5 µl Eppendorfgefäße mit 1 µl vorgelegtem 10 x Stoppuffer überführt wurden, entnommen. Der MnCl<sub>2</sub>-haltige Reaktionspuffer gewährleistete eine überwiegende „blunt end“ Restriktion der DNA durch DNase I. Die abgestoppten Reaktionsaliquots wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und so die mittlere nach einer bestimmten Reaktionszeit auftretende Größenfragmentierung bestimmt. Die Reaktionszeiten weiterer DNase I Verdau, zur Herstellung von DNA-Fragmenten mit einer mittleren Länge von 300 bp in größerem Maßstab, wurden entsprechend der zuvor ermittelten Zeitkinetik gewählt. Die fragmentierte gDNA wurde aufgereinigt (PCR Purification Kit, Quiagen) und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

### 2.4.2 Herstellung der genomischen DNA-Fragment-Bibliothek

An genomische DNA-Fragmente mit einer mittleren Fragmentgröße von 300 bp wurden mit DNA-Adapter mit *EagI/NotI* kompatiblen Überhängen, bestehend aus den Oligonukleotiden *Eag\_Fwd* und *Eag\_Rev*, nach den Vorgaben des Herstellers ligiert (T4-Ligase, Polynukleotidkinase; Invitrogen). Die mit Adaptern versehenen Fragmente wurden aufgereinigt (PCR Purification Kit, Quiagen) und in den zuvor mit *NotI* geschnittenen und dephosphorylierten Invertasevektor pRK18 ligiert. Das für eine maximale Ligationseffizienz und Transformantenzahl optimale Verhältnis von DNA-Fragmenten und Vektor wurde zuvor in Testligationen, bzw. –Transformationen ermittelt. Schließlich wurden für die Ligation 4 µl DNA-Fragmente und 60 ng Vektor in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde aufgereinigt (Minelute Reaction Cleanup Kit, Quiagen), in 10 µl H<sub>2</sub>O eluiert und jeweils 1 µl in elektrokompente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Vor dem Ausplattieren auf ampicillinhaltiges LB-Festmedium wurden die insgesamt 10 Transformationsansätze vereinigt, ein 10 µl Aliquot entnommen und dieses, zur Bestimmung der Transformantenzahl, in Verdünnungsreihen separat ausgestrichen. Die Bakterienkolonien wurden nach 16 h Inkubation bei 37 °C mit flüssigem LB-Amp Medium von den von den Agarplatten abgewaschen, die Plasmid-DNA isoliert (Maxi Plasmid Purification Kit, Quiagen) und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (SmartSpec 3000, Biorad).

### 2.4.3 Selektion der genomischen DNA-Bibliothek in Hefe

Pro Selektionsrunde wurden insgesamt 1 x 10<sup>6</sup> Hefezellen mit der genomischen Plasmid-Bibliothek transformiert. Dazu wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem zehnfachen Transformationsansatz in den *suc2*-defizienten Hefestamm BY4742 transformiert, auf SD<sup>URA</sup>-

Festmedium ausgestrichen (40.000 Kolonien / 12 cm<sup>2</sup> Selektionsagarplatte) und für 2 d bei 30 °C inkubiert. Die Kolonien wurden mit Samttüchern auf YEPSA-Festmedium überstempelt, bei 30 °C wachsende Kolonien über einen Zeitraum von 3-10 Tagen gepickt und auf SD<sup>-URA</sup>-Festmedium gesammelt. Die in pRK18 enthaltenen genomischen DNA-Insertionen gesammelter Hefekolonien wurden mittels Ganzzell-PCR mit den Primern RK18\_Fwd und RK18\_Rev amplifiziert und sequenziert.

#### 2.4.4 Signalpeptidselektion ausgewählter Proteine

Neben der funktionellen Genomanalyse wurde die Signalpeptidselektion zur gezielten Analyse einzelner Proteinsequenzen eingesetzt. Dazu wurden ca. 300 bp des 5'-Endes eines ORFs mit Primern, in welche *EagI*- oder *NotI*-Schnittstellen eingefügt waren, amplifiziert und in die Invertasevektoren pRK18, bzw. pYSST kloniert. Die weitere Selektion in Hefe erfolgte wie unter 2.4.3 beschrieben.

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte in einer Mini Protean II Apparatur (Biorad).

SDS-PAGE-Probenpuffer (6x):	300 mM Tris-Cl, pH 8,0 30 % (v/v) Glycerin 20 % (w/v) SDS 0,5 g/l Bromphenolblau 15 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugeben)
-----------------------------	---

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

Sammelgel:	125 mM Tris-Cl, pH 6,8	Trenngel:	375 mM Tris-Cl, pH 8,8
	5 % (w/v) Acrylamid		10 % bzw. 15 % (w/v) Acrylamid
	0,13 % (w/v) Bisacrylamid		0,27 % (w/v) Bisacrylamid
	0,1 % (w/v) SDS		0,1 % (w/v) SDS
	0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat		0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
	0,1 % (v/v) TEMED		0,1 % (v/v) TEMED

### 2.5.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektro-Blot (Biorad XCell Kammer) in Western-Blot-Puffer auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P von Millipore) transferiert. Das Gel wurde zuvor kurz in Western-Blot-Puffer äquilibriert und die Membran für 5 min in Methanol

aktiviert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): Schwamm, ein Whatman-Papier, Polyacrylamidgel, PVDF-Membran, ein Whatman-Papier. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 1 mA/cm<sup>2</sup>) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

### 2.5.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die PVDF-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst über Nacht mit 5 % Magermilchpulver und 3 % BSA in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran für 5 min mit TBST gewaschen und für 4 - 5 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST 1 % Magermilchpulver, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 1 % Magermilchpulver, inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Es wurde folgenden primärer Antikörper verwendet: monoklonaler Maus-a-GFP (1 µg/µl, Roche, in einer Verdünnung von 1:5.000). Und als sekundärer Antikörper der HRP-gekoppelte Ziege-a-Maus von Amersham (in einer Verdünnung von 1:10.000). Zur Detektion wurden das ECL-Kit der Firma Amersham verwendet. Die Lösungen ECL I und ECL II wurden im dunkeln zu gleichen Teilen gemischt, auf der Membran verteilt, diese nach 2 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 5 min Exposition deutliche Banden zu erkennen.

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

### 2.5.4 Isolierung von Proteinen aus *U. maydis*

*U. maydis*-Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 in 30 ml YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium angezogen, das Volumenäquivalent zu 3 optischen Dichten geerntet (3.500 Upm, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R), einmal in PBS gewaschen, in 300 µl PBS + Proteaseinhibitor (Complete, Roche) aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden mit 200 µl Gasperlen versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Zellaufschluß erfolgte durch schütteln in einem Virax-Schüttler (4°C, 20 min, höchste Stufe). Der Zellüberstand der geernteten Zellen wurde in 10 % TCA gefällt und nach Aufnahme in 300 µl PBS + Proteaseinhibitor in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die aufgeschlossenen Zellen und der Zellüberstand wurden mit je 50 µl 6 x SDS-Page Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und die Zelltrümmer anschließend in der Tischzentrifuge (13.000 Upm, 5 min, RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Prote-

inkonzentration nach der Methode von Bradford (BioRad) bestimmt. Üblicherweise wurden 50 µg Gesamtprotein in der SDS-PAGE-Analyse eingesetzt.

## 2.6 Bioinformatische Methoden

### 2.6.1 Sequenz- und Strukturanalysen

Es wurden die folgenden Analyseprogramme eingesetzt; Programme die ausschließlich über das Internet verfügbar waren sind mit der zugehörigen URL gekennzeichnet. Andere Programme wurden auf einem lokalen PC-System unter Windows XP, bzw. Linux (Debian „woody“) genutzt:

- Blast2 (Altschul et al., 1990): Identifikation homologer Protein- oder DNA-Sequenzen
- ClustalW (Eddy, 1995) und ClustalX (Heringa, 1999): Vergleich von homologen oder ähnlichen Sequenzen
- DGPI (Kronegg und Buloz, 1999: Identifikation von GPI-verankerten Proteinen
- iPSORT (Bannai et al., 2002): Identifikation N-terminaler Sortierungssequenzen
- NetOGlyc (Julenius et al.; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>): Vorhersage von O-Glycosylierungsmotiven in Proteinen
- NetNGlyc (Gupta et al., 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>): Vorhersage von N-Glycosylierungsmotiven in Proteinen
- SMART (Schultz et al. 2000): Identifikation homologer, konservierter Proteindomänen
- TargetP (Emanuelsson et al., 2000; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>): s. iPSORT
- TMHMM2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>): Identifizierung von Transmembrandomänen
- WinPep (Hennig, 1999): Proteinsequenzanalyse, (Hydrophathie, Molekulargewicht)

### 2.6.2 In dieser Arbeit entwickelte Programme

Zur Bearbeitung, Formatierung und Analyse von Sequenzen in größerem Maßstab wurden folgende Programme in der Skriptsprache Perl unter den Betriebssystemen Windows und Linux entwickelt.

- PS-1: genomweite Identifizierung von Signalsequenzen. Das Skript schneidet aus der genomische Sequenz in beiden Orientierungen alle Teilsequenzen, die mit einem ATG beginnen und auf einer Länge von 90 bp nicht durch ein Stop-Kodon unterbrochen werden, aus. Die Teilsequenzen werden in AS übersetzt, an das Programm iPSORT übergeben, anschließend an Hand der iPSORT-Ergebnisse in die Kategorien Signalpeptid (SP), mitochondriales Transitpeptid (MTP) oder andere Lokalisierung

(O), wie Cytoplasma oder Zellkern, eingeteilt und in einer Datenbankdatei tabellarisch gespeichert .

- PS-2: genomweite Identifizierung von Proteinsequenzen mit internen, durch putative KEX2-Prozessierungsmotive getrennte Wiederholungen. Das Skript übersetzt alle sechs Leserahmen der genomischen Sequenz in Proteinsequenzen und durchmüsst diese nach mindestens drei KR-Dipeptiden welche in nahezu gleichen Abstand ( $\pm 5$  AS) zueinander auftreten. Durch diese Strategie erfolgt die Erkennung unabhängig von zwischen den KR-motiven liegenden Aminosäuresequenzen.

### 3 Ergebnisse

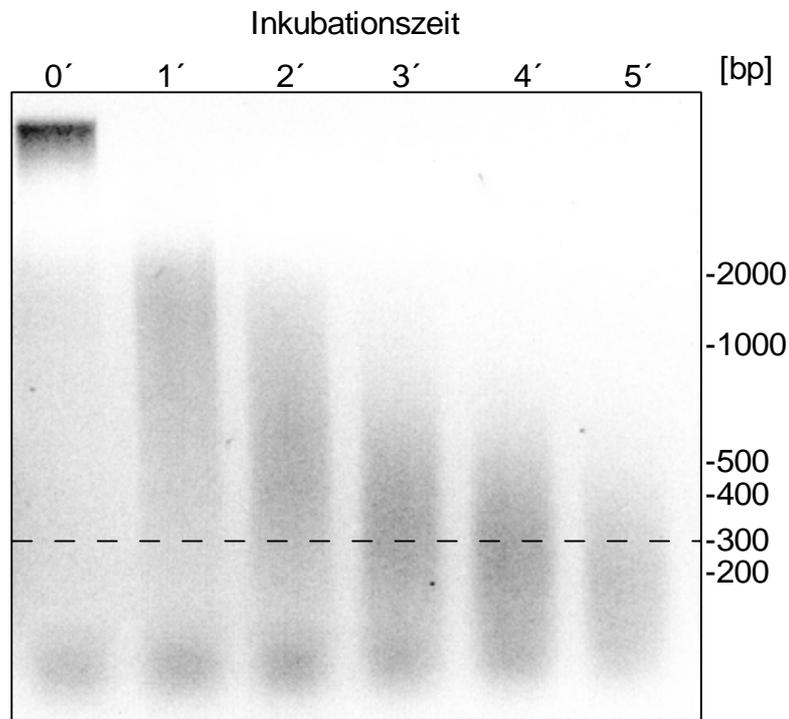
Für die genomweite Identifizierung sekretorischer und in der Plasmamembran lokalisierter Proteine wurde eine Bibliothek aus genomischer DNA erstellt. Auf diese Weise konnten Einschränkungen, denen cDNA-Bibliotheken vor allem auf Grund verschiedener, entwicklungsstadienabhängiger Expressionsmuster einzelner Gene unterliegen, umgangen werden.

Eine zweite, *in silico* durchgeführte funktionelle Analyse bildeten Sequenzanalysen aller mit einem Startmethionin beginnenden DNA-Fragmente des *U. maydis* Genoms. Weiterführende Funktionalanalysen interessanter Kandidaten, welche aus beiden Ansätzen hervorgegangen waren, bestanden aus Pathogenitätstests entsprechender Gendeletionsstämme, sowie Lokalisationsstudien von GFP-Fusionsproteinen.

#### 3.1 Herstellung einer genomischen Bibliothek aus zufällig generierten DNA-Fragmenten

Für die Herstellung der Bibliothek wurde genomische DNA des haploiden Wildtypstamms Um521 mittels DNase I Verdau fragmentiert. In früheren Anwendungen der Signalpeptidselektion stellte sich heraus, daß 5'-untranslatierte Bereiche heterologer Sequenzen den Nachweis von Signalpeptiden in Hefe verhindern konnten (Galliciotti et al., 2001). Des Weiteren könnten Fragmente, die an ihren 3'-Enden in intronische Sequenzabschnitte mündeten die Expression des chimären Reporters stören oder durch enthaltene Stop-Kodons ganz verhindern. Somit wurden für die Herstellung der Bibliothek Fragmente mit möglichst kurzen, die Signalsequenz flankierenden DNA-Abschnitten angestrebt. Da Signalpeptide eine Länge von 15 bis 35 Aminosäuren, bzw. 45 bis 105 Nukleotide auf DNA-kodierender Ebene besitzen, wurden für die mittlere Gesamtlänge der zu durchmusternden DNA-Fragmente 300 bp veranschlagt. Somit betrug das Schnittfenster vor und hinter der möglichen Signalsequenz 100 bp. Die genomische DNA wurde aus dem haploiden *U. maydis* Wildtypstamm Um521 isoliert und mittels partiellen DNase I Verdau fragmentiert. Die Reaktionszeit des Verdau wurde entsprechend der angestrebten Fragmentlängen von ca. 300 bp gewählt und in einem unmittelbar zuvor durchgeführten Testverdau ermittelt. Dabei stellte sich eine mittlere Häufigkeitsverteilung von 300 bp nach 4 minütiger Inkubationszeit ein (Abb. 3.1), welche in einem unmittelbar danach durchgeführten Reaktionsansatz größeren Maßstabs gewählt wurde. Nach Abstoppen der Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt und bezüglich der Fragmentlängen auf Übereinstimmung mit der zuvor erstellten DNase I Zeitkinetik überprüft. Die erhaltenen genomischen Fragmente wurden ungerichtet in den Invertasevektor pRK18 kloniert (vgl. M&M). Die Zahl der klonierten Fragmente wurde durch Verdünnungsausstriche des *E. coli* Transformantenpools, sowie durch Ganzzell-PCRs

auf 50 ausgewählten Transformanten ermittelt. Demnach umfaßte die für die Signalpeptidselektion eingesetzte Bibliothek ca.  $1,1 \cdot 10^6$  zufällig generierte genomische Fragmente.



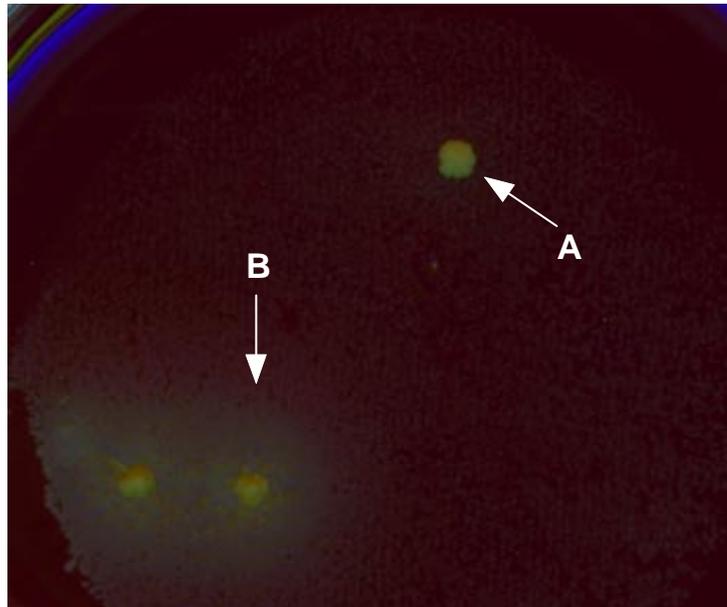
**Abb. 3.1: Bestimmung der optimalen DNaseI-Inkubationszeit zur Generierung von genomischen DNA-Fragmenten mit einer mittleren Länge von 300 bp.** Die Auftrennung der zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppten Reaktionsansätze erfolgte über ein 2 % Agarosegel. Eine mittlere Häufigkeitsverteilung von ca. 300 bp stellte sich nach 4 minütiger Inkubationszeit ein. Die Bilddatei wurde zur besseren Kenntlichmachung invertiert.

### 3.2 Signalpeptidselektion „yeast signal sequence trap“

Die Signalpeptidselektion (vgl. M&M) diente der Detektion für sekretorische, Membran- oder Zellwandlokalisierter Proteine kodierende Gene. Während diese Methode bisher ausschließlich unter Einsatz von cDNA-Bibliotheken zur Anwendung kam (Klein et al., 1996; Goo et al., 1999; Surpili et al. 2002; Taft et al., 2002), wurde in dieser Arbeit eine genomische Bibliothek eingesetzt.

### 3.2.1 Erstselektion der Klone

In zwei unabhängigen Selektionsrunden wurden je  $5 \cdot 10^5$  Transformanten des Invertase 2 (*suc2*) deletierten *S. cerevisiae* Stamms BY4742 auf ihre Fähigkeit hin selektioniert, auf Medium mit Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dabei wurden insgesamt 192 Hefekolonien über einem Zeitraum von 3 bis 11 Tagen isoliert (Abb. 3.2). Die Kolonien



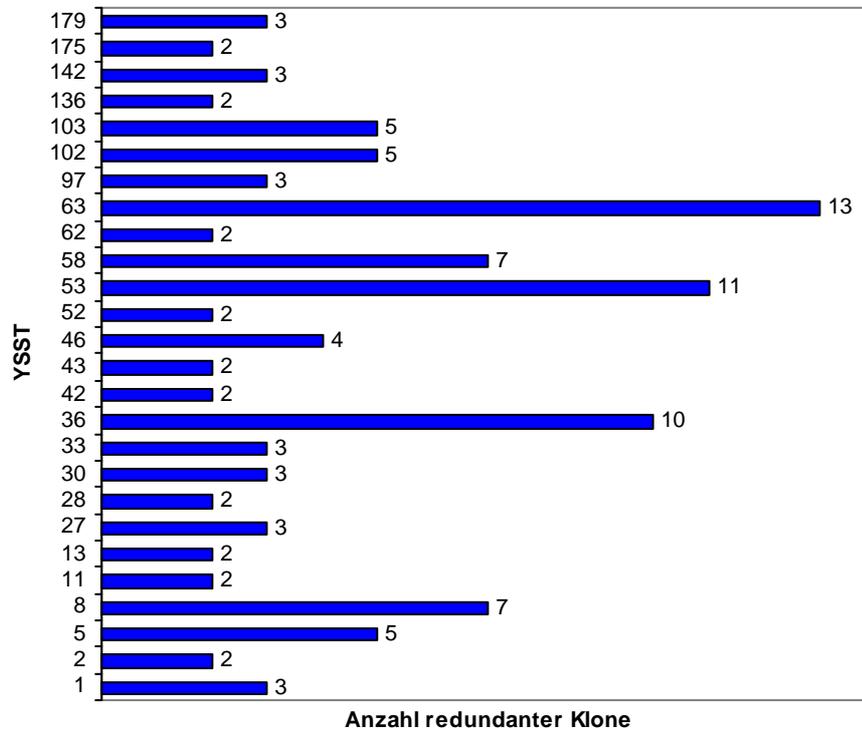
**Abb. 3.2: Erscheinungsbild der nach Übertragung auf Saccharose Medium (YEPSA) wachsenden Hefekolonien. A)** einzelne Kolonie ohne erkennbaren Hof. **B)** zwei dicht nebeneinander liegende, behofte Kolonien. Die bei der Replikplattierung mit überstempelten, nicht wachstumsfähigen Hefeklone treten als schwach erkennbarer Hintergrund in Erscheinung. Das Medium wurde zur Erleichterung der Selektion mit dem Farbindikator Bromkresolpurpur versetzt.

waren in vielen Fällen von Satelliten aus Invertase defizienten Hefen umgeben, deren Wachstum sich durch die mit der Zeit im Medium frei diffundierenden Einfachzucker Glucose und Fructose erklären ließ. Vereinzelt traten auch kleinere Kolonien ohne Satelliten auf, bei denen die C-terminal mit *suc2*<sup>MSP</sup> fusionierte *U. maydis* Sequenz wahrscheinlich nur ein sehr schwaches Sekretionssignal vermittelte und zu einer stark verminderten extrazellulären Invertaseaktivität führte. Die Kolonien wurden gesammelt, in aufsteigender Folge nummeriert und mit dem Präfix YSST ("yeast signal sequence trap") versehen.

### 3.2.2 Klassifizierung selektierter YSST-Klone

Die Plasmidinsertionen der gesammelten Hefekolonien wurden mittels Ganzzell-PCR durch, im Promotor bzw. kodierenden Bereich von *suc2*<sup>MSP</sup> bindenden Primern, amplifiziert. Dabei konnten die DNA-Insertionen von 141 Klonen amplifiziert werden. Diese wurden aufgereinigt und sequenziert. Bei 52 Klonen konnte dagegen auch nach mehrmalig durchgeführter PCR kein Produkt erhalten werden, oder es wurden in wenigen Fällen zwei oder mehr DNA-

Banden amplifiziert, welche eine Sequenzierung verhinderten. Für die Einordnung der YSST-Sequenzen in den genomischen Kontext wurde das Genom des Wildtypstamms Um521 herangezogen.



**Abb. 3.3: Redundanz der YSST-Klone**

Nach dem Ergebnis der computergestützten Sequenzanalysen (Tab. 3.1), mittels blastn (Altschul et al., 1990), gingen 52 nicht redundante YSST-DNA-Fragmente aus den zwei Selektionsrunden hervor (Tab. 3.2). Zu diesen waren insgesamt 80 weitere, sequenzierte Klone redundant (Abb. 3.3). Hierbei handelte es sich fast ausschließlich um identische Klone und in einem Fall (YSST46, -51) um zwei überlappende Genom-Abschnitte. Schließlich traten bei 7 YSST-Klonen Probleme bei der Sequenzierung auf, woraufhin diese der genomischen Sequenz nicht zugeordnet werden konnten.

Klassifizierung	Anzahl
nicht redundant	52 (35 %)
redundant	80 (56 %)
nicht zuordbar	7 (0,5 %)

**Tab. 3.1: Klassifizierung der 141 sequenzierten YSST-Klone**

YSST	[bp]	Contig	Position	Strang	YSST	[bp]	Contig	Position	Strang
1	268	1.189	74441 - 74678	(-)	58	157	1.71	127800 - 128082	(-)
2	303	1.88	102370 - 102672	(+)	62	377	1.42	9617 - 9991	(+)
11	146	1.185	61977 - 62122	(+)	63	544	1.103	146785 - 147327	(-)
13	286	1.234	2228 - 2513	(+)	64	109	1.164	76294 - 76402	(-)
14	582	1.80	114123 - 114708	(+)	65	272	1.189	31957 - 32228	(+)
16	148	1.174	13871 - 14018	(+)	67	312	1.36	19075 - 19386	(+)
17	345	1.108	26816 - 27160	(+)	73	201	1.43	107989 - 108189	(-)
23	272	1.246	20799 - 21070	(+)	74	208	1.236	33526 - 33733	(+)
24	305	1.2	126095 - 126399	(+)	77	385	1.135	32536 - 32920	(-)
27	204	1.191	146957 - 147160	(+)	79	171	1.246	16479 - 16649	(+)
28	1000	1.230	?	(+)	83	246	1.70	114 - 359	(-)
29	339	1.56	30643 - 30981	(-)	97	317	1.246	29561 - 29735	(+)
30	339	1.115	3818 - 4156	(-)	101	271	1.135	40826 - 41096	(+)
31	283	1.140	85189 - 85471	(-)	102	252	1.103	89841 - 90092	(-)
33	291	1.204	4147 - 4437	(+)	103	174	1.186	128773 - 128946	(+)
34	223	1.42	121077 - 121299	(-)	113	232	1.198	43200 - 43432	(+)
35	187	1.246	13995 - 14181	(+)	(124)	364	1.204	4272 - 4635	(+)
36	466	1.28	12533 - 12998	(+)	130	316	1.106	7132 - 7447	(-)
42	359	1.177	14901 - 15259	(+)	131	209	1.148	122062 - 122270	(+)
43	228	1.246	35089 - 35316	(-)	136	276	1.23	80781 - 80956	(+)
46	156	1.157	145064 - 145219	(-)	142	187	1.230	45664 - 45850	(+)
(51)	322	1.157	145106 - 145427	(-)	145	317	1.236	37736 - 38052	(-)
52	300	1.34	123174 - 123473	(+)	162	129	1.30	65071 - 65197	(-)
53	142	1.221	22702 - 22843	(+)	169	312	1.72	56221 - 56532	(+)
56	283	1.5	127800 - 128082	(-)	175	194	1.246	22346 - 22539	(+)

**Tab. 3.2: Auflistung aller nicht redundanten YSST-Klone.** Angegeben sind die Basenlänge, sowie die Position auf den jeweiligen „contigs“ des vom Whitehead Institut sequenzierten Genoms. Das contig 1.246 umfaßt das Mitochondriengenom von *U. maydis*.

### 3.2.3 Zuordnung nicht redundanter Klone zu genkodierenden Genomabschnitten.

Neben der Sequenz des *U. maydis* Genoms wurden zusätzlich zwei EST-Bibliotheken aus keimenden Brandsporen (Sacadura und Saville, 2003), sowie aus dem diploiden *U. maydis* Stamm FBD12 (Kimberly et al., 2003) für den Sequenzabgleich herangezogen. Für die Ableitung der Peptidsequenzen der 52 nicht redundanten Klone wurde jeweils das erste, auf den *suc2*-Promotor folgende, ATG der kodierenden YSST-Sequenz gewählt, welche sich im selben Leserahmen mit dem 3' fusionierten Invertasegen *suc2*<sup>MSP</sup> befand. Demnach kodierten 29 genomische Klone für die wahrscheinlichen N-Termini annotierter oder bereits identifizierter Gene und wurden daher als positiv gewertet (Tab. 3.3). Zu dieser Gruppe zählten u. a. die Klone YSST101 und YSST11, welche mit den *U. maydis* Genen *rep1* (Wösten et al., 1996), bzw. *hum2* (Bohlmann, 1994) identisch waren. Beide Genprodukte wurde experimentell als extrazelluläre Proteine in *U. maydis* nachgewiesen. YSST83 befand sich im Endbereich eines Contigs, auf welchem der zugehörige offene Leserahmen nicht mehr vollständig enthalten war. Daher lag für diesen Genombereich bisher keine Annotierung vor. Statt dessen konnte der zugehörige ORF mit Hilfe der EST-Bibliothek aus Teliosporen weitgehend identifiziert und seine Fortsetzung auf dem benachbarten Contig festgestellt werden. Die

Gene von 16 zugehörigen YSSTs waren ganz oder in Teildomänen zu Einträgen aus verschiedenen Gendatenbanken homolog, während 10 YSST-Gene keine Homologien aufwiesen (Tab. 3.4).

Als „falsch positiv“ wurden hingegen jene Klone eingestuft, aus deren Basensequenz sich ein mögliches Signalpeptid ableiten ließ, bei welchem es sich jedoch nicht um den N-Terminus eines kernkodierten Proteins handeln konnte. Als Besonderheit traten in dieser Gruppe drei Sequenzen auf, die jeweils den N-Terminus, von mitochondrialen Genen repräsentierten. Der Umstand, daß N-terminale Sequenzabschnitte prokaryotischer Proteine in der „yeast signal sequence trap“ positiv selektiert werden können, war bereits zuvor beschrieben worden (Stracke, 1998). Die peptidkodierenden DNA-Abschnitte von neun genomischen Klonen und drei Klonen mitochondrialen Ursprungs befanden sich -in beiden Orientierungen- innerhalb vorhergesagter, annotierter Gene (Tab. 3.5). Ein Teil dieser Klone lag *in frame* mit Genabschnitten, welche für mögliche Transmembran- oder andere hydrophobe Domänen kodierten. Die abgeleiteten Peptide von drei weiteren Klonen befanden sich in unmittelbar angrenzenden, untranslatierten Bereichen annotierter Gene. Schließlich wurden zwei YSST-Klone als Systemartefakte klassifiziert, da sie kein Start-ATG *in frame* aufwiesen und darüber hinaus der Leserahmen in beiden Klonen zusätzlich durch ein Stop-Kodon unterbrochen wurde.

Zuordnung des YSST-Klons	Anzahl / %
N-terminal (positiv)	29 (59 %)
nicht N-terminal (falsch positiv)	18 (37 %)
Artefakte	2 (< 0,1 %)
Gesamt	49 (100 %)

**Tab. 3.3: Ergebnis der Signalpeptidselektion.** Zuordnung der einmaligen YSST-Klone in das *U. maydis* Genom.

YSST	Acc.	Homologie zu bekannten Genen	LoK.	EST_D	EST_S
13	UM06162.1	Macrofae Activating Glycoprotein [ <i>C. neoformans</i> ]	CW	CF639578.1	-
63	UM03065.1	Streptococcus pneumoniae strain 3496 surface protein (PspC)	CW	-	-
52	UM01014.1	Thioredoxin domain containing protein precursor (TXN5) [ <i>Homo sapiens</i> ]	ER	CF645645.1	-
36	UM00876.1	Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor [ <i>Candida albicans</i> ]	S	(CF641790.1)	-
62	UM01165.1	Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor (EC 3.2.1.58) [ <i>Candida albicans</i> ]	-	-	-
67	UM01035.1	Lysophospholipase precursor (Phospholipase B) PLB1_PENCH	S	(CF644172.1)	-
162	UM00904.1	OXR_P_RAT 150 kDa oxygen-regulated protein precursor (Orp150)	-	-	-
101	UM03924.1	Repellent Protein (REP1) [ <i>Ustilago maydis</i> ]	S	CF644102.1	-
142	UM06112.1	keine	S	-	-
46	UM04433.1	Repellent Protein, Hydrophobin	S	-	-
11	UM05010.1	Hydrophobin (HUM2) [ <i>Ustilago maydis</i> ]	S	-	-
29	UM01513.1	Hypothetical protein [ <i>Agaricus bisporus</i> ]	CW	CF642968.1	-
30	UM03392.1	Neurogenic locus Notch protein precursor NOTC_DROME	-	CF645139.1	-
33	UM05622.1	Oryza sativa cDNA clone	-	CF644693.1	-
56	UM00310.1	Similar to WD-repeat protein 18 [ <i>Homo sapiens</i> ]	-	-	-
74	UM06218.1	Lytic Transglycosylase [ <i>Oceanobacillus thelyensis</i> ]	-	CF639981.1	CD490017.1
77	UM03923.1	Hypothetical protein [ <i>Schizophyllum commune</i> ]	-	(CF644528.1)	-
83 -		Hypothetical serine-rich protein (YA9A) [ <i>S. pombe</i> ]	-	(CF640554.1)	CD488380.1
1	UM05222.1	gij37182050 gb AAQ88828.1  ERO1L [ <i>Homo sapiens</i> ]	S	CF645251.1	CD488462.1
2	UM02648.1	keine	-	-	-
14	UM02295.1	keine	-	-	-
17	UM03138.1	keine	-	-	-
27	UM05295.1	keine	-	-	-
31	UM04035.1	keine	-	-	-
34	UM01202.1	keine	-	-	-
53	UM05953.1	keine	-	CF644075.1	-
102	UM03046.1	keine	-	-	-
169	UM01976.1	keine	-	-	CD489780.1
73	UM01238.1	keine	-	-	-

**Tab. 3.4: Positive YSST-Klone welche N-Termini von Genen enthalten.** Acc: Accession-Nr. des vom Whitehead Institut veröffentlichten Proteoms., Lok: zelluläre Lokalisation des homologen Genprodukts (falls bekannt), EST\_D (FBD12) und EST\_S (Teliospore): Acc.-Nr. der EST-Klone, unklammerte Einträge kennzeichnen ESTs welche den N-Terminus nicht mit einschließen.

YSST Zuordnung	Homologie des einschließenden Gens, bzw. Position des peptidkodierenden DNA-Fragments		AS-Position	EST_D	EST_S
	<b>Klone mit mitochondrialen N-terminalen, signalpeptidähnlichen Sequenzen</b>				
23 1.246, Mito.	Cytochrome c oxidase polypeptide III COX3_EMENI	1 -	-	-	-
35 1.246, Mito.	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Chain 4 NU4M_MARPO	1 -	-	-	-
43 1.246, Mito.	ATP synthase protein 9 ATP9_TRIRU	1 -	-	-	-
	<b>Klone innerhalb annotierter Gene, in frame zu kodierenden Bereichen</b>				
42 UM04857.1	hypothetical protein MG04705.4 [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	604 - 719	-	-	-
79 1.246, Mito.	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Chain 1	146 - 194	-	-	-
97 1.246, Mito.	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Chain 5	42 - 88	-	-	-
103 UM05057.1	putative esterase [Bordetella bronchiseptica]	439 - 490	-	-	-
113 UM05514.1	hypothetical protein MG03627.4 [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	177 - 242	CF642266.1	-	-
175 1.246, Mito.	Cytochrome b	29 - 71	-	-	-
	<b>Klone innerhalb annotierter Gene, in entgegengesetzter Orientierung oder nicht in frame zu kodierenden Bereichen</b>				
24 1.2	3'-UTR bis 3'-Ende von UM00067.1, (-) Orientierung	-	-	-	-
58 1.71	3'-UTR bis 3'-Ende von UM01952, (-) Orientierung	-	-	-	-
130 (UM03125.1)	(-) Orientierung	-	-	-	-
131 (UM04176.1)	(-) Orientierung	-	-	-	-
136 (UM00772.1)	nicht in frame	-	-	-	-
145 1.236	Intron bis 1. Exon eines neu annotierten Gens, (-) Orientierung	-	(CF642499.1) (CD489406.1)	(CF638494.1) (CD490098.1)	-
	<b>Klone außerhalb annotierter genomischer Bereiche</b>				
16 1.174	3'UTR von UM04774.1	-	-	-	-
64 1.164	Promotor- oder 5'-UTR-Bereich von UM04584.1, (-) Orientierung	-	-	-	-
65 1.189	Promotor- oder 5'-UTR-Bereich von UM05206.1	-	-	-	-

**Tab. 3.5: Liste der falsch positiven Klone.** Die Homologien der einschließenden Gene sind nur angegeben, wenn sich die abgeleiteten Peptide mit diesen *in frame* befinden. Als Zuordnung dienen gDNA contigs, bzw. Proteomnotation des Whitehead Instituts. Zusätzlich sind Übereinstimmungen mit EST-Klonen (vgl. Beschreibung Tab. 3.4) aufgeführt. Zu umklammerten Einträgen befand sich der YSST-Klon nicht *in frame* oder in entgegengesetzter Orientierung.

### 3.2.4 Bioinformatische Analyse der YSST-kodierten Peptide

Die abgeleiteten, mit einem Initiator-methionin beginnenden Peptide aller nicht redundanten YSST-Klone, wurden mit Hilfe des Computerprogramms iPSORT (Bannai et al., 2002) auf das Vorhandensein N-terminaler Signalsequenzen durchmustert. Übereinstimmungen zwischen Signalpeptid Selektion und Computeranalyse ergaben so weitere Hinweise dafür, daß die erfolgte Selektion auf ein in Hefe funktionales Signalpeptid zurückzuführen war. Obwohl das jeweils erste, auf den Invertasepromotor folgende und mit *suc2<sup>MSP</sup> in frame* fusionierte, ATG eines YSST-Fragments mit hoher Wahrscheinlichkeit für das *in vivo* translatierte Initiator-methionin kodierte, wurde jede nach einem weiteren Methionin folgende Teilsequenz, die eine Mindestlänge von 15 Aminosäuren besaß, analysiert. In den Fällen, wo das erste Methionin keinem vorhergesagten Signalpeptid voranstand, ergaben sich so Anhaltspunkte *in silico*, daß ein weiter stromabwärts gelegenes ATG auch oder ausschließlich als Translationsstart *in vivo* genutzt wurde.

Das Programm iPSORT beruht auf zwei regelbasierten Algorithmen, welche nach den von Emanuelsson et al. (2000) zusammengestellten Datensätzen von Proteinen mit experimentell bestimmter Lokalisation, trainiert wurden. Eine Komponente des Regelsystems basiert auf einem Aminosäureindex, welcher in einer Datenbank aus verschiedensten experimentell und theoretisch ermittelten Charakteristika von Aminosäuren zusammengefaßt ist (Kawahima und Kanehisa, 2000) und auf die Aminosäuren der zu analysierenden Peptide angewandt wird. In der Standardeinstellung werden die Hydrophobizitätsindizes einzelner Aminosäuren aus definierten Sequenzfenstern addiert und die Summe mit einem empirisch bestimmten Schwellenwert für Signalpeptide verglichen. Die zweite Komponente besteht aus einem alphabetischen Index (Shimozono, 1999), bei dem einzelne Aminosäuren auf Zahlen, welche das Vorhandensein bestimmter bio- oder physikochemischer Eigenschaften beschreiben, abgebildet werden. Im Falle der Hydrophobizität wird beispielsweise jede Aminosäure durch eine 0 oder 1 repräsentiert. Das sich daraus ergebende spezifische Muster einer Sequenz wird mit Hilfe eines Fehlertoleranten Suchalgorithmus (Wu und Manber, 1992) mit den Mustern bekannter Peptidsequenzen verglichen. Durch Kombination beider Regelwerke macht iPSORT für nicht pflanzliche Peptidsequenzen die Vorhersage, ob es sich um Signalpeptide (SP), mitochondriale Transitpeptide (MTP) oder andere, z. B. cytosolische oder kernlokalisierte Peptide (OP), handelt. Dabei berücksichtigt das Programm maximal die ersten 30 Aminosäuren einer Sequenz und war dadurch sowohl für die Analyse der YSST-Peptide, als auch des *U. maydis* Genoms sehr gut geeignet.

YSST	Peptidsequenz	Met.	AS	Erg.
<b>1</b>	<b>MKLSINSVLLVSAAL</b>	<b>M1</b>	15	<b>SP</b>
<b>2</b>	<b>MLSATFCANVRSM TGSYLCAILLICVSFAF...</b>	<b>M1</b>	81	<b>MTP</b>
2b	MTGSYLCAILLICVSFAFAFALPVTSP PQQ...	M13	69	SP
<b>11</b>	<b>MQFKTIFATLAAFAAVASALPTSSSEQNGN...</b>	<b>M1</b>	42	<b>SP</b>
<b>13</b>	<b>MKAVSAAALVALVAGVSAQSVAPFSYGTPS...</b>	<b>M1</b>	81	<b>SP</b>
<b>14</b>	<b>MLSFTRSFCTFFCFLQASQVLYGAGLPLGD...</b>	<b>M1</b>	151	<b>MTP</b>
14b	MPAASSSASPISRTGEDKREVSP PQERM PG...	M119	33	MTP
<b>17</b>	<b>MVLFTHSLKALAAFALFALPFCIDAHPI SA...</b>	<b>M1</b>	49	<b>SP</b>
<b>27</b>	<b>MRS PALLLLLLLFAIEVIATGGSGEPSGAQG...</b>	<b>M1</b>	51	<b>SP</b>
<b>29</b>	<b>MAPIAKTVCVASRFS P S PLSAFSLLVLISL...</b>	<b>M1</b>	93	<b>MTP</b>
29b	MIPSPFPQAQV V W P L L L L L T E M V P R P R P S L V Q...	M59	35	SP
29c	MVPRPRPSLVQALSVA	M78	16	MTP
<b>30</b>	<b>MKFTILSIMALAAAVSVSALPSDSA AVRAR...</b>	<b>M1</b>	96	<b>SP</b>
30b	MALAAAVSVSALPSDSA AVRAREVDPMAQF...	M9	88	OP
30c	MAQFASLHMLERRGLSNGKKCKEDSQ C D S D...	M35	62	OP
30d	MLERRGLSNGKKCKEDSQ C D S D F C K N P G W F...	M43	54	OP
<b>31</b>	<b>MKTVTIAFLALASLALILGSQASAAPPQHL...</b>	<b>M1</b>	50	<b>SP</b>
<b>33</b>	<b>MTASVRGFITLLPFLLLLLLAAS</b>	<b>M1</b>	22	<b>SP</b>
<b>34</b>	<b>MILRILGPLVFTMAVAGVLC SAAPNPTGAT...</b>	<b>M1</b>	59	<b>SP</b>
34b	MAVAGVLC SAAPNPTGATI AW R K V S A G P T T...	M13	47	OP
<b>36</b>	<b>MKITSFGLAAIALALMADNTEALPAIRNY</b>	<b>M1</b>	29	<b>SP</b>
<b>46</b>	<b>MKYLQFLAAVA AVS A F S G P V L A G S S V E N T N...</b>	<b>M1</b>	42	<b>SP</b>
<b>52</b>	<b>MLASTRWICALLPLLIATLIVVAGPLPSYD...</b>	<b>M1</b>	39	<b>SP</b>
<b>53</b>	<b>MVSTKTCTASVLALTLVACVDASLHRRDGS...</b>	<b>M1</b>	37	<b>SP</b>
<b>56</b>	<b>MASSSSAASLFATECLLYSTASSSTLVGSM...</b>	<b>M1</b>	66	<b>OP</b>
56b	MGLTTVAAPSSTSALFTFKGVSDPAFHSVT...	M30	37	OP
<b>62</b>	<b>MRLLP R D T S L N A V A S A L S L A T A N Y K P I P Q L...</b>	<b>M1</b>	91	<b>OP</b>
<b>63</b>	<b>MRFSSLLLLILAAITATNAASVDESAAKPI...</b>	<b>M1</b>	128	<b>SP</b>
<b>67</b>	<b>MKLSIIT T L L G L V L T A S S A V Q A T P A I P S Q L...</b>	<b>M1</b>	35	<b>SP</b>
<b>73</b>	<b>MLRILSSMLKLC LNFTFFGLMLTSVNAAPP...</b>	<b>M1</b>	56	<b>SP</b>
73b	MLKLC LNFTFFGLMLTSVNAAPP T S Q L N D I...	M8	49	SP
73c	MLTSVNAAPP T S Q L N D I G E A L R P Q D S I S T E...	M22	35	OP
<b>74</b>	<b>MKLLSLVAATLALVATTASADPSVEALNLP...</b>	<b>M1</b>	47	<b>SP</b>
74b	MSKHPLSMQRREAMLN	M32	16	MTP
<b>77</b>	<b>MQLSSLLLTASLLVSSVVCAPA AVS A F G T S...</b>	<b>M1</b>	119	<b>SP</b>
77b	MLKRQYENTNWDNVMLGRDTMEELEKRIVY...	M36	84	OP
77c	MLGRDTMEELEKRIVYNPHITSPTAATVWT...	M50	70	OP
77d	MEELEKRIVYNPHITSPTAATVWTAGQTYT...	M56	64	OP
<b>83</b>	<b>MLLLNHKLILLAFVLV L A L F L N A A D S V E A</b>	<b>M1</b>	28	<b>SP</b>
<b>101</b>	<b>MPSKIALSISVLTAALGMVSAAPHY E Y K S Y...</b>	<b>M1</b>	72	<b>SP</b>
101b	MVSAAPHY E Y K S Y N A G H N V E S V V E N K L V D A...	M18	55	OP
<b>102</b>	<b>MYNLFSLFALCLAVAATVHASSQCDSGLSK...</b>	<b>M1</b>	54	<b>SP</b>
<b>142</b>	<b>MKLSFTIVATAALVASCTFAAPTASSKLA...</b>	<b>M1</b>	60	<b>SP</b>
<b>162</b>	<b>MRFSTATGFRARIGSASSMLLV L A L L A V T L...</b>	<b>M1</b>	38	<b>MTP</b>
162b	MLLV L A L L A V T L L S T P V T A M	M19	20	SP
<b>169</b>	<b>MRPTVFTVASLAVLSVLG</b>	<b>M1</b>	18	<b>SP</b>

**Tab. 3.6: Auflistung der mit iPSORT analysierten Peptidsequenzen positiver YSST-Klone.** Die Analyseergebnisse der Peptide, welche ab dem erst möglichen ATG beginnen, sind fett gedruckt. Folgende Peptide bekamen den Anhang a, b, c, usw. Met. = Methioninposition, AS = Aminosäuren, Erg. = Ergebnis.

YSST	Peptidsequenz	Met.	AS	Erg.
<b>23</b>	MNTQLSRTQFQFQPFHLVTPSPWPLLLTSFA...	<b>M1</b>	39	<b>SP</b>
<b>35</b>	MLTLLLI I PLVGALMLAPMQGNTRQSESQM...	<b>M1</b>	45	<b>SP</b>
35b	MLAPMQGNTRQSESQMKRLALGTSLINFVL...	M15	31	OP
35c	MQGNTRQSESQMKRLALGTSLINFVLS	M19	27	OP
35d	MKRLALGTSLINFVLS	M30	16	SP
<b>43</b>	MLAAAKYIGSGVAALGLIGAGIGVGIVFAA...	<b>M1</b>	51	<b>SP</b>
<b>42</b>	MI IYTIMSNTLLLLTVLISLLSNTFQVVAMN...	<b>M1</b>	117	<b>SP</b>
42b	MSNTLLLLTVLISLLSNTFQVVAMNANEEAM...	M7	111	SP
42c	MNANEEAMFQFAVKTMSGITTD AIFS YQPP...	M29	89	OP
42d	MPLSFLVSPRWLHKINVFLIRSTSFHVLLI...	M68	50	OP
<b>79</b>	MISYELIYSAAVLAVILLCGTFNITEIIES...	<b>M1</b>	48	<b>SP</b>
<b>97</b>	MGYLFMACGLSQYNVALFHLVNHAFKALL...	<b>M1</b>	47	<b>OP</b>
97b	MACGLSQYNVALFHLVNHAFKALLFLAAG...	M6	42	OP
<b>103</b>	MLYLHGGGFSLGSVAFYAEALIRIVTKICA...	<b>M1</b>	52	<b>MTP</b>
<b>113</b>	MAYHRGSEFEIGSRYPRLSRSFSRPLQV	<b>M1</b>	66	<b>MTP</b>
113b	MVTVI FWSVLSGPTSLADPYSI	M45	22	MTP
<b>175</b>	MWNFGSLLGVCLIIQILTG VFLAMHYTPS...	<b>M1</b>	43	<b>SP</b>
175b	MHYTPSVDLAFISVEHIMRD	M24	20	OP
<b>24</b>	MLERLPATLVHGSLNLSRNNIRHAMAPYLL...	<b>M1</b>	42	<b>OP</b>
24b	MAPYLLAQLVVPLLMQLL	M25	18	SP
<b>58</b>	MALYRSDCSLFGYISLFFLLRLTPAASAEI...	<b>M1</b>	32	<b>SP</b>
<b>130</b>	MLSLTAFGITFFAAVVAISTVIT	<b>M1</b>	24	<b>SP</b>
<b>131</b>	MSASLLIGRGAATVLVAGNVLGRLSKPNAT...	<b>M1</b>	53	<b>SP</b>
131b	MRS HSCRISGRVGGTSTMS	M35	19	
<b>136</b>	MRLGRARHHNVKNTGIFAHTLLFLFAGLDY...	<b>M1</b>	54	<b>OP</b>
<b>145</b>	MLAQVPIKMCFAWGVLLTLVCDGTAAAVID...	<b>M1</b>	93	<b>SP</b>
145b	MCFAWGVLLTLVCDGTAAAVIDACL LQRYL...	M9	85	SP
<b>16</b>	MIPAMLYQGSLCKGLFLAWLTLGWVFFSL...	<b>M1</b>	38	<b>SP</b>
16b	MLYQGSLCKGLFLAWLTLGWVFFSLFIFG...	M5	34	SP
<b>64</b>	MVRPTEKQAVPYLTMVAYLQLEKVAVQQR...	<b>M1</b>	33	<b>OP</b>
64b	MVAYLQLEKVAVQQR YAAE	M14	20	OP
<b>65</b>	MRS LHFATLLLLTSAPLLSPSSP	<b>M1</b>	22	<b>SP</b>

**Tab. 3.7: Auflistung der mit iPSORT analysierten Peptidsequenzen falsch positiver YSST-Klone.** Die Analyseergebnisse der Peptide, welche ab dem erst möglichen ATG beginnen, sind fett gedruckt. Folgende Peptide bekamen den Anhang a, b, c, usw. Met. = Methioninposition, AS = Aminosäuren, Erg. = Ergebnis.

Das Ergebnis der Signalpeptidanalysen zeigte, daß sowohl in positiv (Tab. 3.7), als auch falsch positiv klassifizierten YSST-Klonen, zum überwiegenden Teil Signalpeptide identifiziert wurden (Tab. 3.8). Demnach kodierten bei 79 % der positiven Klone die jeweils auf das erst mögliche ATG folgenden Basen für Signalpeptide. Weitere 11 % besaßen statt dessen stromabwärtsgelegene, signalpeptidkodierende Sequenzabschnitte *in frame* zu *suc2<sup>MSP</sup>* bei denen ebenfalls eine mögliche Nutzung als Translationsstartpunkt *in vivo* in Frage kam. Für falsch positiv selektierte Kandidaten war der Anteil identifizierten Signalpeptide mit 67 % ab

dem ersten ATG, bzw. bei einem weiteren Klon (5 %) an anderen Sequenzabschnitten, geringer.

Vorhersage	positive Klone			
	1. ATG		andere ATGs	
	Anzahl	%	Anzahl	%
Signal Peptid	23	79	26	90
mitochondr. Transitpeptid	4	14	-	-
anderes Peptid	2	7	-	-
insgesamt	29	100	29	100

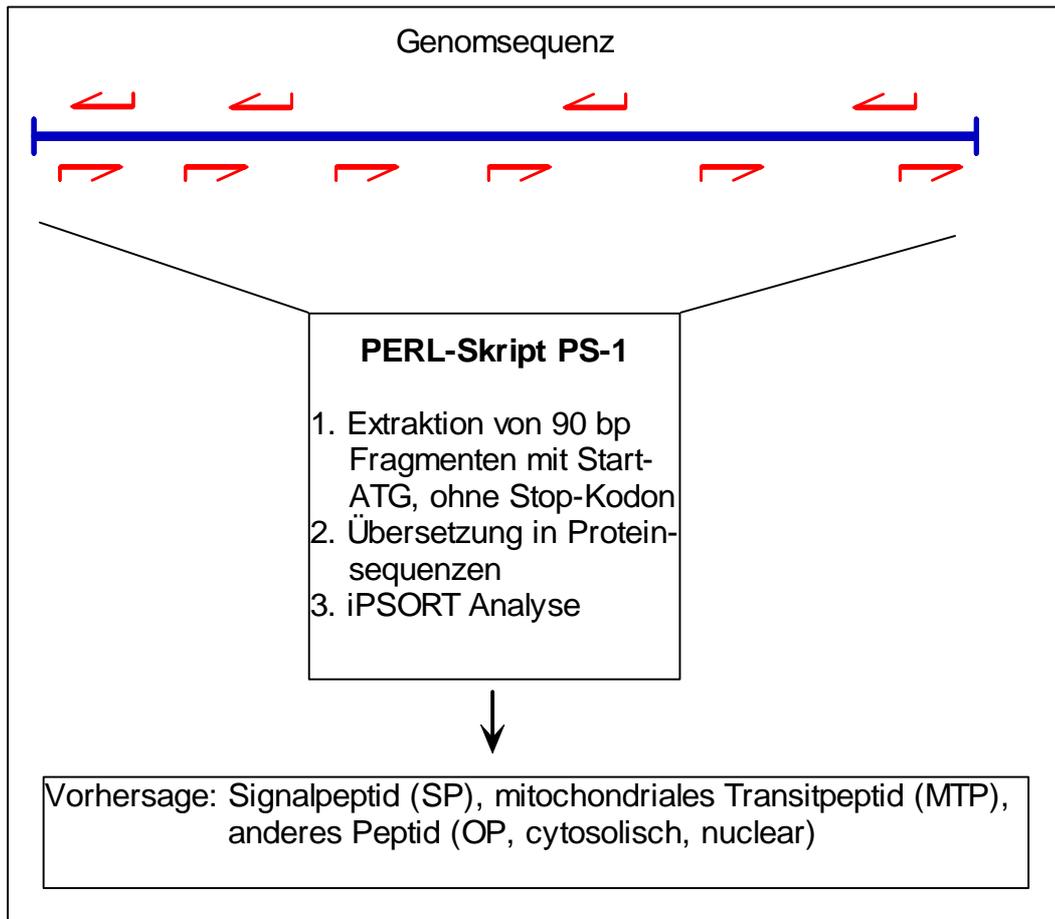
  

Vorhersage	falsch positive Klone			
	1. ATG		andere ATGs	
	Anzahl	%	Anzahl	%
Signal Peptid	12	67	13	72
mitochondr. Transitpeptid	2	11	-	-
anderes Peptid	4	22	-	-
insgesamt	18	100	18	100

**Tab. 3.8: Zusammenfassung des Ergebnisses der iPSORT Analyse aller YSST-Klone.**

### 3.3 Genomweite Identifizierung signalpeptidkodierender Sequenzen *in silico*.

Die zu Beginn dieser Arbeit nahezu vollständig vorliegende Genomsequenz von *U. maydis* bot die Möglichkeit, alle theoretischen Signalsequenzen *in silico* und somit neue, evtl. bisher nicht annotierte, Gene zu identifizieren. Für die Durchführung dieser funktionellen Analyse wurde das PERL-Skript PS-1 (vgl. M&M und Abb. 3.4) entwickelt. Dieses extrahierte aus der genomischen Sequenz, zunächst alle peptidkodierenden Sequenzfragmente, welche mit einem ATG begannen und auf einer Länge von 90 bp von keinem Stop-Kodon unterbrochen wurden. Die dabei gesammelten DNA-Fragmente übersetzte PS-1 anschließend in Aminosäuren und transferierte sie zur Analyse an iPSORT. Die erhaltenen iPSORT-Ergebnisse wurden schließlich von PS-1 übernommen, in eine Datenbank übertragen und tabellarisch zusammengestellt (Tab. 3.8). Demnach kodierte die Genomsequenz von *U. maydis* für knapp 300.000 Peptidsequenzen mit Initiator-methionin, die eine Mindestlänge von 30 Aminosäuren besitzen. Von diesen wurden ca. 22000 (8 %) als Signalpeptide vorhergesagt, was



**Abb. 3.4: Funktionsschema des PERL-Skripts PS-1 zur genomweiten Identifizierung von Signalpeptiden.**

etwa der 3,5fachen Anzahl annotierter *U. maydis* Gene entspricht. Analog zu der in Abschnitt 3.2.1 durchgeführten Zuordnung nicht redundanter YSST-Klone, wurden die identifizierten Signalpeptide mit genkodierenden Bereichen abgeglichen (Tab. 3.9).

Ergebnis	Anzahl	%
Signalpeptide (SP)	22.411	8
Mitochondriale Transitpeptide (MTP)	118.832	40
andere Peptide (OP)	154.487	52
analyzierte Peptide insgesamt	295.730	100

**Tab. 3.8: Ergebnis der genomweiten iPSORT-Analyse**

Demnach stimmten 4 % der Signalsequenzen mit den N-Termini annotierter Gene überein, während sich ein Drittel innerhalb dieser Gene befand und 64 % in nicht annotierten Genombereichen zu finden waren. Diese Zahlen stellten eine Umkehr des Ergebnisses der Signalpeptidselektion in Hefe dar, bei welcher knapp 62 % der detektierten Signalsequenzen dem

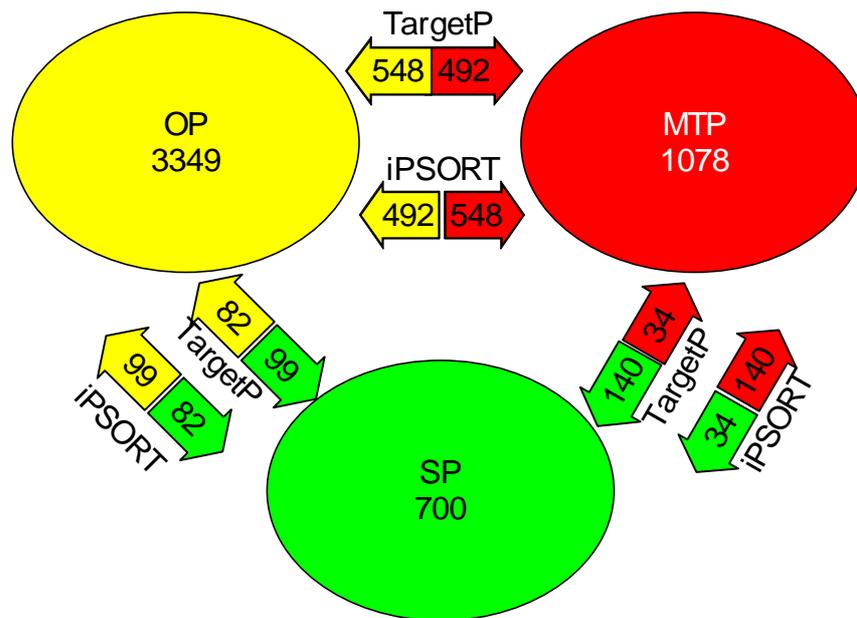
Zuordnung	iPSORT		YSST	
	Anzahl	%	Anzahl	%
N-Terminus annotierter Gene	900	4	29	62
innerhalb annotierter Gene	7.100	32	15	32
intergenische Bereiche	16.411	64	3	6
Signalpeptide insgesamt	22.411	100	47	100

**Tab. 3.9: Genomische Zuordnung der *in silico* identifizierten Signalsequenzen und Vergleich mit den Ergebnissen der Signalpeptidselektion.**

N-Terminus eines Gens entsprachen, während 16 % außerhalb von Genen lokalisiert waren. Der Anteil der intergenischen signalpeptidkodierenden Sequenzen war dagegen in beiden Ansätzen identisch.

### **3.4 Identifizierung von Proteinen des sekretorischen Transportweges *in silico*.**

Das annotierte Genom des *U. maydis* Stamms Um521 umfaßt 6522 potentielle Gene, sowie 200 kleinere offene Leserahmen von ca. 150 bp, bei welchen es sich möglicherweise um funktionale Gene handeln könnte. Die abgeleiteten Proteinsequenzen wurden mit den Computerprogrammen iPSORT und TargetP (Emanuelsson et al., 2000) analysiert. Beide Programme identifizierten zusammen insgesamt 1055 Sequenzen mit Signalpeptiden und erzielten bei 700 Signalpeptiden Übereinstimmung. Dagegen wurden 239 Signalpeptide exklusiv von TargetP, bzw. 116 von iPSORT, vorhergesagt. Die Analyseergebnisse für die beiden anderen Peptidklassen sind in Abb. 3.5 zusammengefaßt.



	TargetP	iPSORT	Übereinst.	Insgesamt
SP	939	816	700	1055
MTP	1604	1766	1078	2292
OP	3979	3940	3349	4570
insgesamt	6522	6522	-	-

**Abb. 3.5: Vergleich der TargetP und iPSORT Analysen des *U. maydis* Genoms.** Ovale beinhalten die Anzahl übereinstimmender Ergebnisse beider Programme, während die Pfeile gegensätzliche Vorhersagen symbolisieren. So bestimmte TargetP z. B. 140 Signalpeptide, die dagegen von iPSORT als MTPs identifiziert wurden. Umgekehrt waren es jeweils 34 Sequenzen.

### 3.5 Charakterisierung ausgewählter Gene.

Aus den Ergebnissen der molekularbiologischen und bioinformatischen Analysen wurden Gene, welche wahrscheinlich für Zellwand- und Zelloberflächenproteine kodieren eingehender charakterisiert (Tab. 3.11), da diese an Wirt-Pathogen Interaktionen beteiligt sein könnten. Hierzu zählten die Genprodukte der *ump*-Genfamilie (UMP1-6; *Ustilago Mannoprotein*), bei denen es sich wohlmöglich um integrale, an der Zelloberfläche exponierte Zellwandproteine handelt. Mit YSST 29 wurde ein weiteres Zellwandprotein, welches auf Grund einer expansinähnlichen Domäne an der Umstrukturierung der pilzlichen Zellwand aber auch an der Desintegration der Pflanzenzellwand beteiligt sein könnte, ausgewählt. Aus den bioinformatischen Analysen waren mit den Glyoxaloxidasen (GLO1-3) mögliche Zellwand und Membranproteine hervorgegangen, von denen *glo1* bereits als ein für die pathogene Entwicklung essentielles Gen identifiziert wurde (Aichinger et al. 2004).

Eine zweite Gruppe von Genen kodierte für putative Proteine der Zelloberfläche, welche in hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Pilz und Pflanze oder an Prozessen der Wirtszell-

anhaftung und –erkennung beteiligt sein könnten. Hierzu zählte RPH1 (repetitive protein and hydrophobin), ein bifunktionales Protein mit einer dem Repellentprotein REP1 ähnlichen Domäne sowie einer HUM2-homologen Hydrophobindomäne. Zwei weitere Proteine, RSP1 und RSP2 wurden als mögliche, repetitive Oberflächenproteine identifiziert, welche, analog zu REP1 und RPH1, durch eine KEX2-ähnliche Protease prozessiert und in kleinere Peptide unbekannter Funktion unterteilt werden könnten. Schließlich wurde das wahrscheinlich für die Prozessierung dieser repetitiven Proteine verantwortliche Endoproteinasegen *umkex2* charakterisiert.

Protein	YSST	Homologie
UMP1	13	Makrophage Activating Glycoprotein
UMP2	-	Makrophage Activating Glycoprotein
UMP3	-	Makrophage Activating Glycoprotein
UMP4	-	Makrophage Activating Glycoprotein
UMP5	-	Makrophage Activating Glycoprotein
UMP6	-	Makrophage Activating Glycoprotein
YSST29	29	Expansin
GLO1	-	Glyoxaloxidase
GLO2	-	Glyoxaloxidase
GLO3	-	Glyoxaloxidase
RSP1	46	Repellent Protein und Hydrophobin
RSP1	142	keine
RSP2	-	keine
UMKEX2	-	Kexin

**Tab. 3.11: Übersicht eingehender charakterisierter Proteine.** Angegeben sind bereits bestehende oder in dieser Arbeit vergebene Gennamen, sowie die Homologie dieser Gene. Zugehörige YSST-Klone sind, so weit vorhandenen vermerkt. Analysen: Y, Signalpeptidselektion („Yeast Signal Sequence Trap“); C, Computeranalyse; G, GFP Lokalisationsstudien; D, Gendeletion („Knockout“).

### 3.5.1 Charakterisierung zellwandassoziiierter Proteine

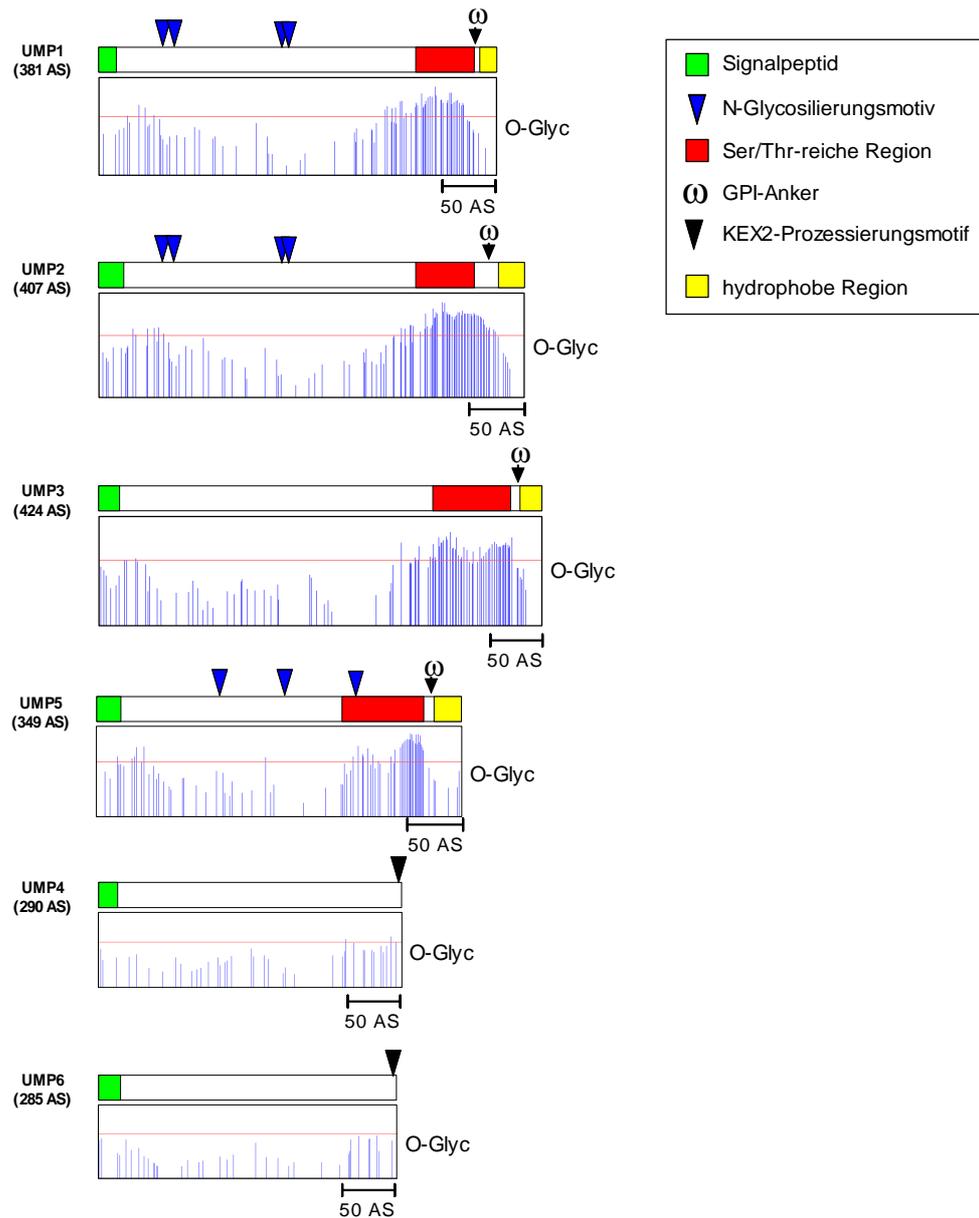
Die pilzliche Zellwand ist für Wachstum und Entwicklung von großer Bedeutung. So werden Änderungen der Zellmorphologie und polares, apikales Wachstum durch stetige Umlagerung und Neusynthese von Zellwandpolymeren bewerkstelligt (Wessels, 1993). Somit ist die Zellwand auch für die, während der Pathogenese ablaufenden, Wechselwirkungen zwischen Pilz und Wirtspflanze essentiell und wurde in der Vergangenheit als möglicher Angriffspunkt für neu zu entwickelnde Fungizide ausgemacht (Gozalbo et al., 1993).

#### 3.5.1.1 UMP1, ist homolog zu Mannoproteinen aus *C. neoformans*.

Die abgeleitete Proteinsequenz des mit YSST13 assoziierten Gens (UM06162.1) zeigte signifikante Ähnlichkeit zu MP88, einem die Immunantwort von Maus T-Zellen stimulierenden,

388 AS umfassenden Mannoprotein des humanpathogenen Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* (Huang et al. 2002). YSST13 wurde daher fortan als UMP1 (*Ustilago maydis* Mannoprotein 1) bezeichnet. *Ump1* befindet sich auf Chromosom XXII und war in Teilssequenzen in den EST-Klonen CF639578.1 und CF644706.1, aus der EST-Bibliothek des diploiden, filamentös wachsenden *U. maydis* Stamms FBD12, repräsentiert. Das Gen besitzt ein Intron und kodiert für ein Protein von 381 AS. Neben dem Signalpeptid weist UMP1 verschiedene mögliche N-Glycosilierungsmotive auf. Der C-Terminus beinhaltet eine serin- und threoninreiche Region, mit zahlreichen möglichen O-Glycosylierungsstellen und wird von einer Transmembrandomain, der eine GPI-Anker Prozessierungsstelle voransteht, abgeschlossen (Abb. 3.6). Somit könnte UMP1, während seiner Passage durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, möglicherweise zahlreichen Glycosylierungsschritten unterliegen. Bei MP88 deuten experimentelle Befunde darauf hin, daß es sich hierbei um die Anlagerung von Mannosylresten handelt, welche das Molekulargewicht der Primärsequenz von 38,7 auf 88 kD im glycosylierten Protein erhöhen (Huang et al. 2002).

In computergestützten Sequenzanalysen wurde das *U. maydis* Genom mittels TBLASTN (Altschul et al., 1990) nach weiteren zu *ump1*-homologen Genen durchsucht. So konnten fünf weitere Gene identifiziert werden, die in Teilbereichen verschiedene signifikante Homologien aufwiesen. Die Genfamilie der *ump1*-homologen spaltete sich in zwei Gruppen auf. In die erste Gruppe gliederten sich neben *ump1* die Gene *ump2*, *ump3* und *ump5* ein, welche in ihrer Domänenstruktur ähnlich organisiert waren (Abb. 3.6). Als Besonderheit waren UMP1 und UMP2 auf Aminosäureebene zu 75 % identisch (Abb. 3.7). Die zweite Gruppe bildeten *ump4* und *ump6*, deren abgeleitete Genprodukte zu 43 % identisch waren und nur in kurzen Sequenzbereichen Homologien zu UMP1 aufwiesen. Ansonsten waren, mit Ausnahme des Signalpeptids, keine Gemeinsamkeiten bezüglich der Domänenstruktur mit UMP1 festzustellen. So enthielten beide Sequenzen deutlich weniger Glycosylierungsstellen während serin-/threoninreiche Sequenzabschnitte und ein hydrophober C-Terminus fehlten. Die C-Termini beider Proteine wiesen statt dessen mehrere basische Aminosäuren auf, bei denen es sich um KEX2-Prozessierungsmotive handeln könnte.

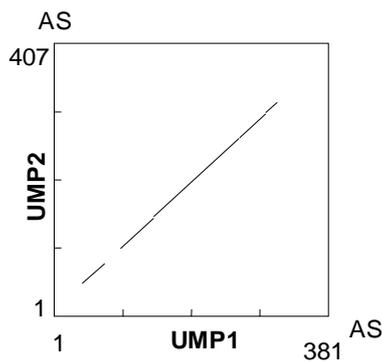


**Abb. 3.6: Schematische Übersicht der UMP1-homologen Proteine.** Die Abbildung ist maßstabsgetreu. Für die Sequenzanalysen wurden die Programme Net-OGlyc (O-Glycosilierungsmotive), Net-NGlyc (N-Glycosilierungsmotive), TargetP (Signalpeptide), TMHMM (hydrophobe Domänen) und DGPI (GPI-Prozessierung) eingesetzt (vgl. M&M). Weitere Erklärungen im Text.

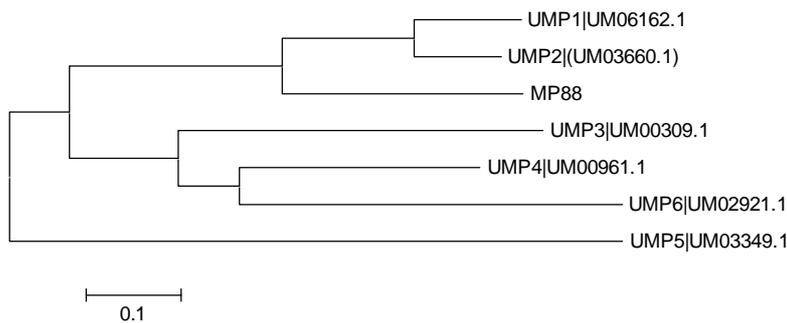
**A**

UMP1	...MKAVS...AAALVALVAGVSAQS...VAPFSYCTPSNPYGVKGTNRNGPTNPSSPQLNTPINQTSDSRLASLNSVED	72
UMP2	MFFSKAVSSVMGATVLAATAVSAQASSSVPAFTYGTANPDYPGVKSTNRNGPTNPSTPQLNTPINQTSVSRASLNSIDD	80
MP88	.....MISKVALGAAAALMAGVAN.VNAQVATGTMGPTNPSTPQLNTPINQTSYARLLSLNAIDD	60
UMP1	WCTFGPQVPGTIIIGNVEGETVAYCTKPRNNARVIPDGTITGAHFVKTPLYVQLMALGDFTKIQLVPGDEGGELDPHGATN	152
UMP2	WCTFAPPGTGQPLADVEEITVAYCTKPRNNARVIPDGTITGAHFVKTPLYVQLMAVGDFTSIGFMAGDEGGELDPHGATN	160
MP88	FCLFAPPEPDSVIGDTEAEEVAWCVCPRNNARVIPDG.VLTAHFVKTPLYVQLQGFDFTHLNIQDDEGGELDPHGATG	139
UMP1	MGNPVGGNVTSNVSQEDVFYEEWMNYVSYNOICFRICLAGSEQAPTALFCQHFLDVMGCNFMVPGNYADNVFETCDGDAA	232
UMP2	MGNPVGGNVTSNVSQGDVFYEEWMNYASANOICFRVCIAGSEQAPTALFCQHFLDVMGCNFMVPGNYADNVFETCDGDSA	240
MP88	LGNPVGGNVTTNATGSDVSYEEWMNYMAYDQFCRLRICISENSTYSAAFCQHFLDVMGCNFMVPG.DTNNSFTFCDGDSA	218
UMP1	YPPGLYPDNGRITSTFQFFFTGEYVAVGTTYSYINGAADQVTPTAAYSTPSTSNCKTTASISNGIKRSIVPS.....SSA	306
UMP2	YPPGLYPDNGRITSTFQFFFTGDTYVLDGTVYSYINGAADQTPQAAYSTPATSNCKTTSTIANGIKRSIVPS.....TSA	314
MP88	YPPGWYLLANGSTSTFQQRVYTGTYTN.GDGLGVTWQGETVTPQTAYSTPATSNCKTYTSVGNGLASLALSAGSVNSTA	297
UMP1	APTSSSSASASGSMAT...SARGSSSAPRS.SATTSGS.GSSNSNSSSGNGSSSGASSVAASAFCLIFASLAAAAGAYL	380
UMP2	VPSSTSSSSAAKVTSTKSSSSGSSGSSG.SSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSAAASSGASKLANASVVSASA	393
MP88	AATNSSSGCASAATGSSSSGTTAGSSAGSSGSSGSSAAAGSTAAASSGSSGSS...TSAAMSNCINYGTAMAEVISV	374
UMP1	L.....	381
UMP2	AIALIAMIAGAMM	406
MP88	ALVAGAGSFLLL..	385

**B**



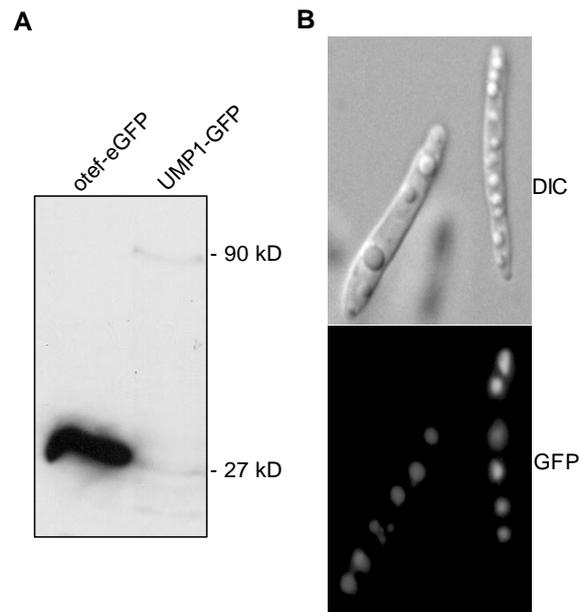
**C**



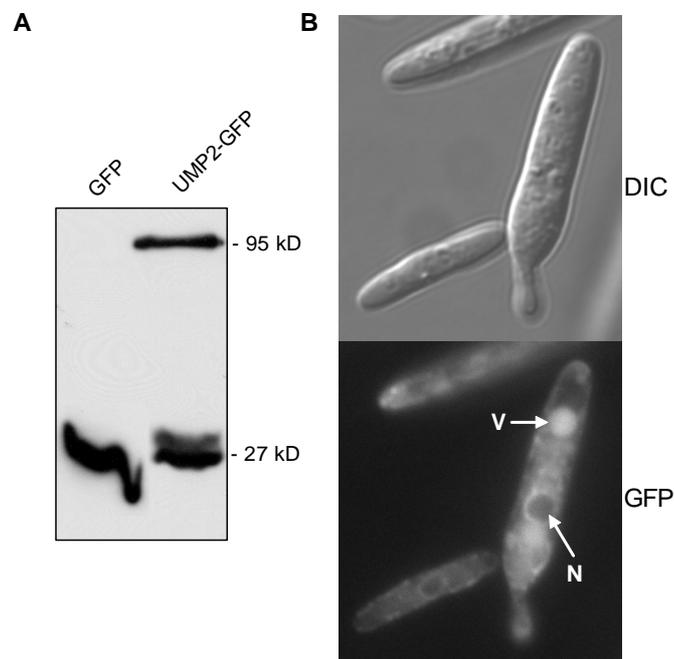
**Abb. 3.7: Homologie der UMP Proteine. A)** Sequenzalignment von UMP1, UMP2 und MP88 **B)** Dot-Blot zwischen UMP1 und UMP2. Die Proteinesequenzen zeigen 75%ige Übereinstimmung. **C)** Dendrogramm eines Sequenzvergleichs der sechs UMP-homologen und MP88.

### 3.5.1.2 Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von UMP1 und UMP2.

Zur Bestimmung ihrer zellulären Lokalisation wurden UMP1- und UMP2-eGFP Reporterstämme hergestellt. Dazu wurden beide Gene durch Klonierung in den Vektor pCA123 (Aichinger et al., 2004) C-terminal mit eGFP fusioniert. Die Fusionsproteine standen somit unter Kontrolle des in *U. maydis* konstitutiven *otef* Promotors (Spelling et al., 1996). Die daraus hervorgehenden Plasmide pCA123-UMP1, bzw. -UMP2 wurden linearisiert und ektopisch in den *cbx*-Locus rekombiniert. Die Insertion der eGFP-Fusionskonstrukte wurde mittels Ganzzell-PCR überprüft und die amplifizierten DNA-Fragmente sequenziert. Anschließend wurde die Expression der Fusionsproteine mit Hilfe eines eGFP-spezifischen Antikörpers in Western-Analysen kontrolliert (Abb. 3.8 und 3.9). Die Proteinbanden der UMP-eGFP-Fusionsproteine konnte bei 90 kD (UMP1) bzw. 95 kD (UMP2) nachgewiesen werden. Nach Abzug des eGFP-Anhangs errechneten sich somit Molekulargewichte von 63 kD (UMP1), bzw. 68 kD (UMP2). Die Differenz zu den abgeleiteten Molekulargewichten der Primärsequenzen (38 kD, UMP1; 38,7 kD, UMP2) könnte auf Glycosylierungsschritten beruhen. Unterhalb der Bande der Fusionsproteine fand sich jeweils noch ein zweites Signal auf Höhe des in Um521otef-GFP nativ exprimierten eGFP, welches wohlmöglich Prozessierung oder Abbau der konstitutiv exprimierten Fusionsproteine aufzeigte. In Proteinpräparationen von jeweils drei unabhängigen eGFP-Reporterstämmen, konnte für die UMP1-Fusion nur eine schwache Proteinexpression festgestellt werden, während UMP2-GFP stark exprimiert wurde. Im Rahmen der lichtmikroskopischen Charakterisierung der UMP1-GFP Reporterstämme konnte Fluoreszenz lediglich in den Vakuolen festgestellt werden. In diesen Zellkompartimenten schien das Abbauprodukt der Gesamtfusion zu akkumulieren. Auf Grund der schwachen Expression war eine Aussage zur Lokalisierung von UMP1-GFP nicht möglich. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Charakterisierung der UMP2-GFP Reporterstämme (Abb. 3.9-B), trat erneut ein starkes Fluoreszenzsignal in der Vakuole in Erscheinung, welches sich vermutlich auf die im Western-Blot erkennbare, separate GFP-Bande zurückführen ließ. Diese könnte von einer möglichen Prozessierung des C-Terminus oder vom Abbau des überexprimierten Fusionsproteins herrühren. Zusätzlich konnte GFP-Fluoreszenz in der Peripherie des Zellkerns, sowie diffus verteilt innerhalb der Zelle nachgewiesen werden. Es könnte sich hierbei um UMP2-GFP handeln welches durch das Endoplasmatische Retikulum, mit seiner innersten, den Zellkern umgebenden Membranschicht, transportiert wird.



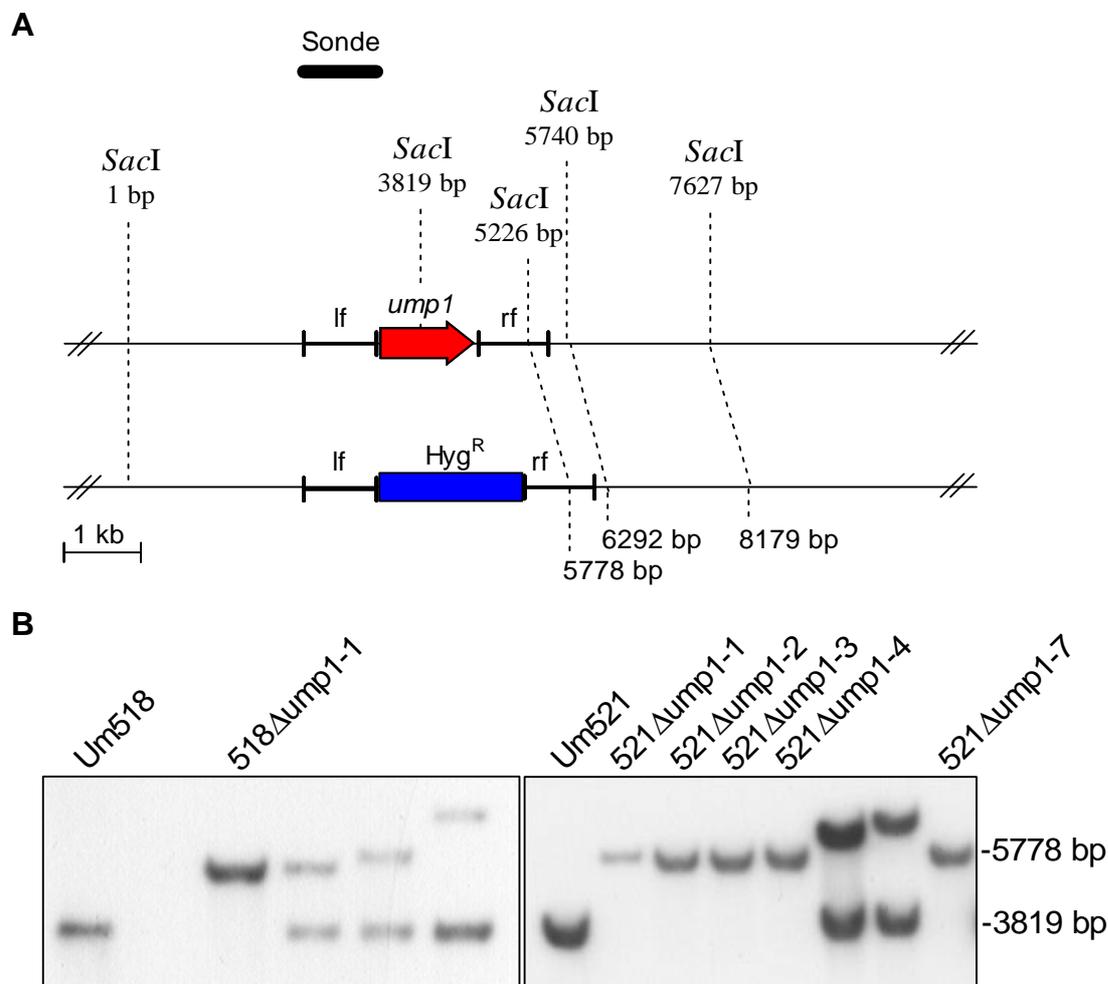
**Abb. 3.8: Bestimmung der subzellulären Lokalisation des UMP1-eGFP Fusionsproteins.** **A:** Immunodetektion von UMP1-eGFP. Neben einer nur schwachen Fusionbande von ca. 90 kD konnte auch ein Abbau- oder Prozessierungsprodukt detektiert werden (rechte Spur). Als Kontrolle diente die Proteinpräparation eines eGFP nativ exprimierenden Stamms. **B:** Subzelluläre Lokalisation von UMP1-GFP. Fluoreszenz konnte ausschließlich in Vakuolen festgestellt werden.



**Abb. 3.9: Analyse der subzellulären Lokalisation des UMP2-eGFP Fusionsproteins.** **A)** Immunodetektion von UMP2-eGFP. Neben der Fusionbande bei ca. 95 kD konnte auch ein eGFP-Abbau oder –Prozessierungsprodukt detektiert werden (rechte Spur). Als Kontrolle diente die Proteinpräparation des eGFP nativ exprimierenden Stamms Um521otef-GFP (linke Spur). **B)** Subzelluläre Lokalisation von UMP2-GFP. Das Fluoreszenzsignal war in der Vakuole (V), in der Peripherie des Zellkerns (N), sowie diffus verteilt im Endoplasmatischen Retikulum zu sehen.

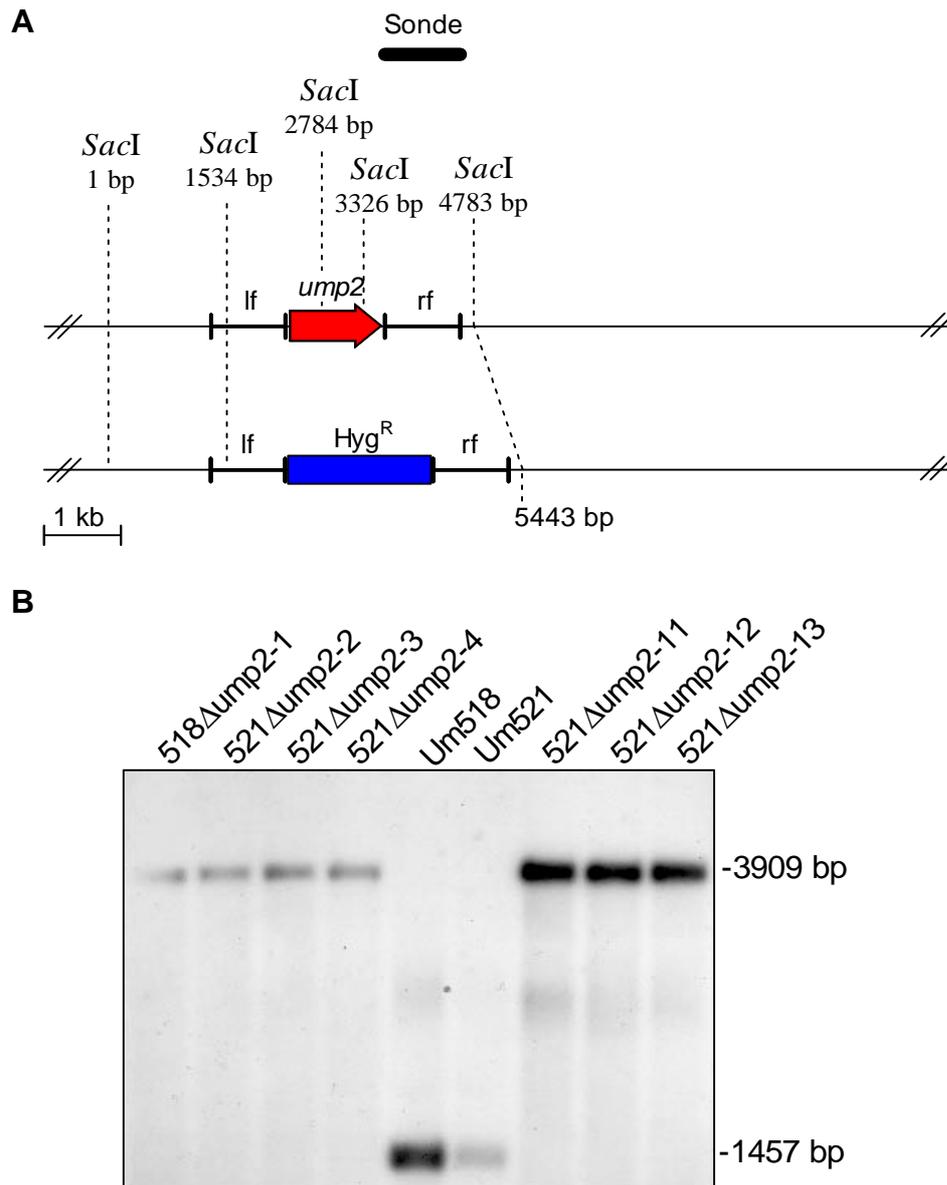
### 3.5.1.3 Die Einzeldelationen von *ump1* und *ump2* haben keinen Einfluß auf die Pathogenität.

Um Einblick in die biologische Funktion von *ump1* und *ump2* zu erlangen, wurde die Gene jeweils in den genetisch kompatiblen Stämmen Um521 (*a1b1*) und Um518 (*a2b2*) deletiert. Dazu wurden nach der von Brachmann (2003) beschriebenen Strategie zwei jeweils etwa 1 kb große 5' und 3' flankierende DNA-Bereiche des ORFs amplifiziert und mit einer Hygromycin B-Resistenzkassette ligiert. Die Deletionskassetten wurden in *U. maydis* transformiert und durch homologe Rekombination gegen die Wildtyploci ausgetauscht (Abb. 3.10 und 3.11). Die Transformanten wurden zunächst mittels Ganzzell-PCR nach Nullmutanten durchsucht und die homologe Rekombination bei entsprechend vorausgewählten Stämmen mittels Southern-Analyse bestätigt.



**Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Konstruktion von *ump1*-Deletionsstämmen und Southern-Analyse der putativen Deletionsklone. A)** Schematische Darstellung des *ump1*-Locus vor und nach der homologen Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette. Angegeben sind die für die Integration amplifizierten und an die Hygromycin B-Resistenzkassette ligierten flankierenden DNA-Abschnitte (lf: linke Flanke; rf: rechte Flanke), sowie die Schnittstellenpositionen des für die Southern-Analyse verwendeten Restriktions-

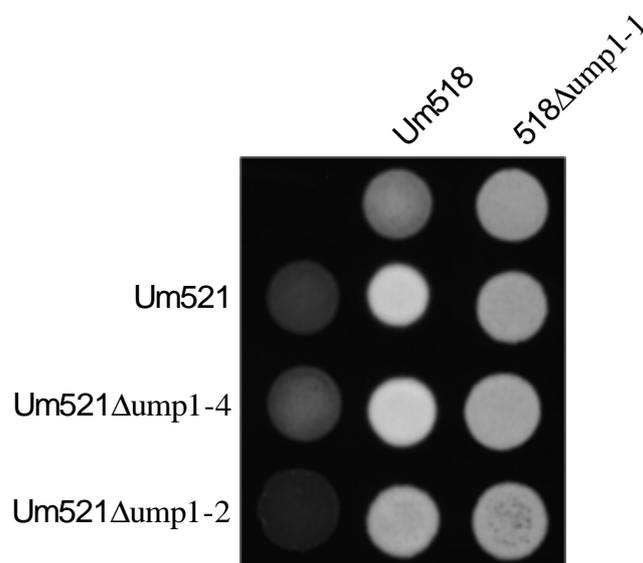
enzym (SacI). Hyg<sup>R</sup>: Hygromycin B-Resistenzkassette; KO: Gendeletion, "Knockout"; WT: Wildtyp. Die Abbildung ist Maßstabsgetreu. **B)** Für Southern-Analysen wurde genomische DNA aus den erhaltenen Transformanten und den jeweiligen Ausgangsstämmen 518 und 521 isoliert und nach SacI-Restriktion elektrophoretisch aufgetrennt. Als Hybridisierungssonde wurde die DIG-dUTP-markierte linke DNA-Flanke (lf) eingesetzt. Im Autoradiogramm zeigten sich die Signale des Wildtyplocus (3819 bp) bzw. der homologen Insertion der Hygromycin B-Resistenzkassette (5778 bp). Nicht bezeichnete Klone weisen keine Deletion des *ump1*-Locus, sondern ektopische Insertionen der Hygromycin B-Kassette auf.



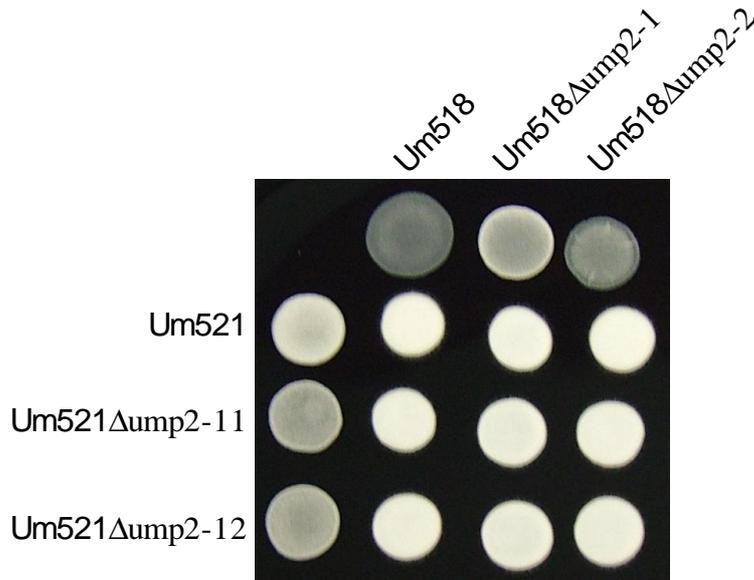
**Abb. 3.11: Schematische Darstellung der Konstruktion von *ump2*-Deletionsstämmen und Southern-Analyse der putativen *ump2*-Deletionsklone** **A)** Schematische Darstellung des *ump2*-Locus vor und nach der homologen Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette. Angegeben sind die für die Integration amplifizierte und an die Hygromycin B-Resistenzkassette ligierten flankierenden DNA-Abschnitte (lf: linke Flanke; rf: rechte Flanke), sowie die Schnittstellenpositionen des für die Southern-Analyse verwendeten Restriktionsenzym (SacI). Hyg<sup>R</sup>: Hygromycin B Resistenzkassette; KO: Gendeletion, "Knockout"; WT: Wildtyp. Die Abbildung ist Maßstabsgetreu. **B)** Für Southern-Analysen wurde ge-

nomische DNA aus den erhaltenen Transformanten und den jeweiligen Ausgangsstämmen 518 und 521 isoliert und nach *SacI*-Restriktion elektrophoretisch aufgetrennt. Als Hybridisierungssonde wurde die DIG-dUTP-markierte rechte DNA-Flanke (rf) eingesetzt. Im Autoradiogramm zeigten sich die Signale des Wildtyplocus (1457 bp) bzw. der homologen Insertion der Hygromycin B-Resistenzkassette (3909 bp).

Die bestätigten Nullmutanten *Um521 $\Delta$ ump1 / - $\Delta$ ump2* und *Um518 $\Delta$ ump1 / - $\Delta$ ump2* wiesen keine zum Wildtyp erkennbaren Unterschiede in Wachstum und Zellmorphologie auf. Weiterführend wurde das Kreuzungsverhalten jeweils kompatibler Stämme auf aktivkohlehaltigem Festmedium untersucht (Abb. 3.12 und 3.13). Bei diesem Bioessay kann die Ausbildung des filamentösen Dikaryons, nach Mischung genetisch kompatibler Stämme, verfolgt werden. Bei Wildtypkreuzungen erscheinen Kolonien gebildeter Myzelien fusselig (*Fuz*<sup>+</sup>-Phänotyp) und durch Lufteinschlüsse in den Zellwänden in tiefem Weiß (Day und Anagnostakis, 1971; Banuett und Herskowitz, 1988). Auch im Kreuzungsverhalten konnten keine Beeinträchtigungen gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden.



**Abb. 3.12: Kreuzungsverhalten der *ump1*-Deletionsmutanten.** Die angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf aktivkohlehaltiges Medium aufgetropft und 48 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dikaryotische Filamente erscheinen als weiße, and den Rändern fusselige Kolonien (*fuz*<sup>+</sup>-Phänotyp).



**Abb. 3.13: Kreuzungsverhalten der *ump2*-Deletionsmutanten.** Die angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf aktivkohlehaltiges Medium aufgetropft und 48 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dikaryotische Filamente erscheinen als weiße, and den Rändern fusselige Kolonien (*fuz*<sup>+</sup>-Phänotyp).

Schließlich wurde in Pathogenitätstests ein möglicher Pathogenitätsbezug von *ump1* und *ump2* untersucht. Hierzu wurden zwei Wochen alte Maispflanzen der Sorte „Gaspar Flint“ mittels Tropfinfektion infiziert und nach drei Wochen bonitiert. (Tab. 3.12). Es konnten weder in Bezug auf Tumorbildung und –Entwicklung, noch bei der Brandsporenbildung, Abweichungen vom Wildtyp festgestellt werden. Demnach scheinen die Verluste von *UMP1* und *UMP2* jeweils keinen Einfluß auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis* zu besitzen oder durch redundante Genfunktionen kompensiert werden zu können.

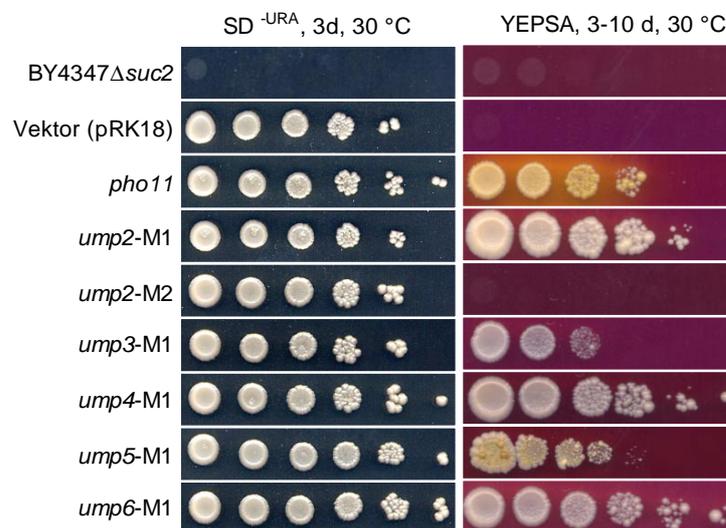
Infektion	Tumorbildung	% vom Wildtyp
Um521 x Um518	29 / 30	100 %
Um521Δump1 x Um518Δump1	27 / 30	93 %
Um521 x Um518	27 / 29	100 %
Um521Δump2 x Um518Δump2	28 / 30	94 %

**Tab. 3.12: Auswertung der *ump1* und *ump2* Pathogenitätstests.** Die Bonitur erfolgte drei Wochen nach Infektion. Angegeben sind die Anzahl der Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der Infizierten Pflanzen.

#### 3.5.1.4 Die fünf *UMP1*-homologen Proteine besitzen funktionelle Signalpeptide.

Für die abgeleiteten Proteinsequenzen der zu *ump1* homologen Gene *ump2*, *ump3*, *ump4*, *ump5* und *ump6* wurde in computergestützten Sequenzanalysen jeweils ein mögliches Signalpeptid vorausgesagt (vgl. 3.4). Die Funktionalität der *in silico* identifizierten Signalse-

quenzen wurde mit Hilfe der Signalpeptidselektion *in vivo* gegengeprüft. Dazu wurden jeweils 5'-kodierende Bereiche von ca. 300 bp Länge in den Invertasevektor pRK18 kloniert, und dem Testsystem der Signalpeptidselektion zugeführt (Abb. 3.14). Als Besonderheit wies die Proteinsequenz von UMP2 zwei mögliche N-terminale Methionine, im Abstand von 10 AS auf, welche beide einem möglichen Signalpeptid voranstehen und in separaten Subklonen (*ump2-M1* und *ump2-M2*) getestet wurden. Alle Fusionsklone zeigten - bis auf eine Ausnahme - nach 3 bis 10tägiger Inkubation, Wachstum auf Saccharose Medium. Dabei wiesen die Klone *ump4-M1* und *ump5-M1* eine verzögerte, erst nach 8 Tagen sichtbare Koloniebildung auf, während *ump2-M1*, *ump3-M1* und *ump6-M1* sich bereits nach 3 Tagen als positiv herausstellten. Der Subklon *ump2-M2* wuchs dagegen nicht und enthielt demnach kein in Hefe funktionales Signalpeptid.



**Abb. 3.14: Signalpeptidselektion UMP1-homologer Proteine aus *U. maydis*.** N-terminale Subklone wurden auf eine funktionale Signalsequenz hin getestet. Mit *suc2*-Fusionskonstrukten transformierte *suc2*-defiziente Hefen wurden über Nacht auf eine OD<sub>600</sub> von 1 angezogen, parallel, in Verdünnungsreihen von 1 bis 10<sup>-5</sup> auf SD<sup>-URA</sup>-, bzw. YEPSA-Medium getropft und 3, bzw. 3-10 Tage bei 30 °C inkubiert. Als Negativkontrolle dienten der untransformierte (BY4347Δ*suc2*), sowie der mit leeren Invertasevektor transformierte, *suc2*-Hefestamm. Als Positivkontrolle wurde ein Subklon der in Hefe sekretierten, sauren Phosphatase PHO11 verwendet.

### 3.5.1.5 Sequenzanalyse von *ysst29*.

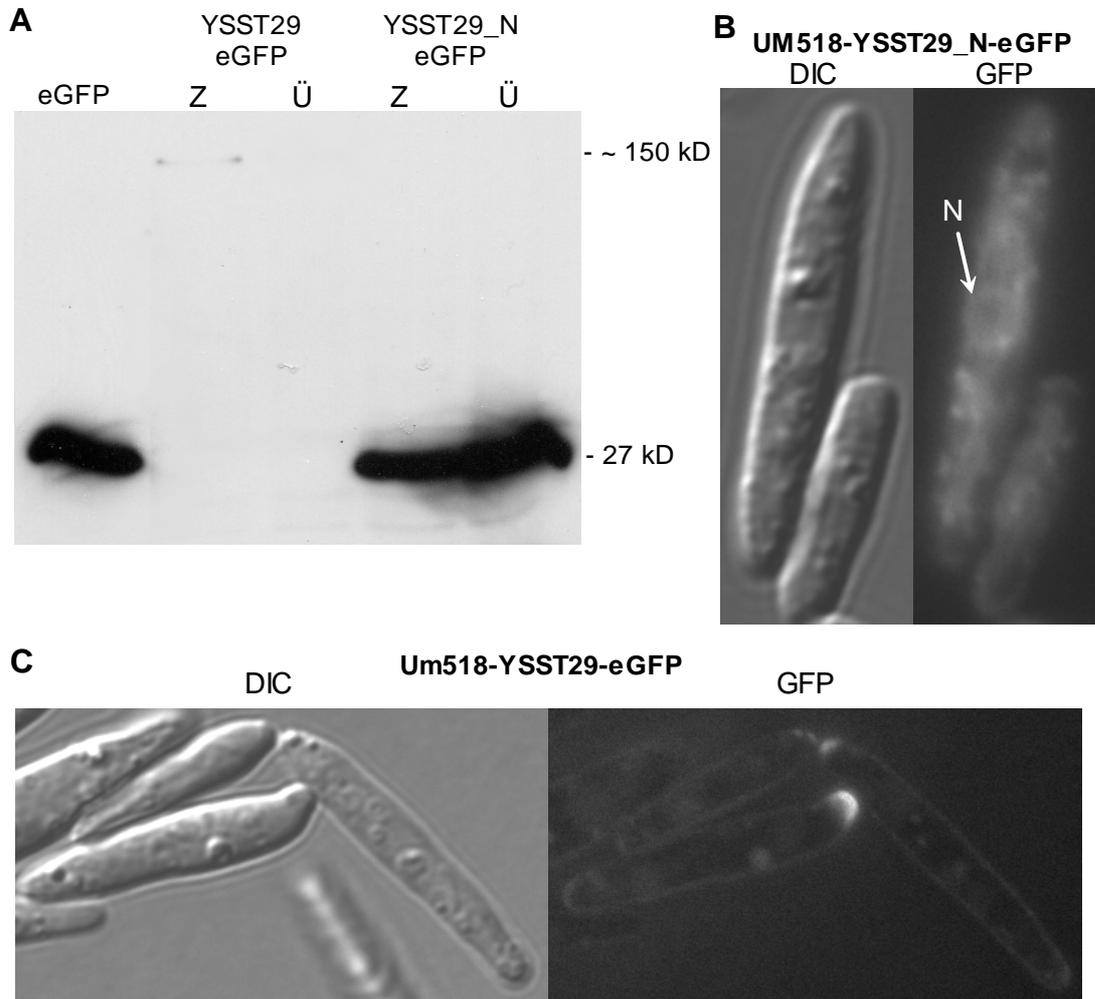
YSST29 ähnelte in seiner Aminosäurezusammensetzung dem extrazellulären, menschlichen Dentin Phosphoprotein (DPP) aus der Dentinmatrix von Odontoblasten (Gu et al., 2000) und besitzt zusätzlich eine C-terminale Domäne von 96 AS, welche Homologie zu Expansinen aus *Malus domestica* (Wakasa et al., 2003) und anderen Höheren Pflanzen aufweist. *ysst29* (UM01513.1) ist auf Chromosom III lokalisiert und kodiert für einen einzelnen offenen Lese-

rahmen von 736 AS, für welchen keine Sequenzhomologen in *U. maydis* existieren. Die 5´- und 3´ Enden des Gens sind jeweils in den EST-Klonen CF642968.1 bzw. CF643083.1 repräsentiert. Eine eingehendere Charakterisierung von YSST29 war zudem deswegen interessant, da für den N-Terminus, hinsichtlich des Vorhandenseins eines Signalpeptids, keine übereinstimmende Vorhersage *in silico* getroffen werden konnte. So klassifizierten die Computerprogramme TargetP und iPSORT die N-terminale Sequenz als Signal-, bzw. mitochondriales Transitpeptid.

### 3.5.1.6 YSST29 ist eine integrale Komponente der pilzlichen Zellwand.

Um eine Aussage über die biologische Funktion von YSST29 treffen zu können wurde die subzelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie von YSST29-GFP-Reporterstämmen bestimmt. Hierzu wurden der gesamte ORF, sowie ein Subklon, der 111 AS des N-Terminus kodierte, über den Vektor pCA123 mit eGFP fusioniert und ektopisch in den *cbx*-Locus integriert (vgl. M&M). Die Expression der eGFP-Fusionsproteine, in den resultierenden eGFP-Reporterstämmen Um518-YSST29-GFP und Um518-YSST29\_N-GFP, wurde an Hand von Western-Analysen kontrolliert (Abb. 3.15-A). Hierfür wurde Protein aus Zellen und Zellmedienüberständen isoliert. Die Fusion der N-terminalen YSST29-Sequenz mit eGFP ließ sich in beiden Proteinisolaten des Reporterstamms Um518-YSST29\_N-GFP nachweisen, wodurch die Funktion des Signalpeptids auch in *U. maydis* bestätigt werden konnte. In den Proteinproben aufgeschlossener Zellen von Um518-YSST29-GFP konnte ein hochmolekulares GFP-Derivat bei ca. 150 kD als schwache Bande nachgewiesen werden. Hierbei mußte es sich um die YSST29-eGFP Vollängenfusion handeln. Da das Molekulargewicht der Primärsequenz –ohne Signalpeptid- lediglich 67 kD beträgt, bedeutete dies, daß YSST29, während seiner Reifung in ER und Golgi, einer posttranslationalen Modifikation zu unterliegen scheint. Wegen der großen Zahl von Serinen, ist es wahrscheinlich, daß es sich dabei um O-Glycosylierungen handelt. Die hochmolekulare Proteinbande des Vollängenfusionsproteins konnte dagegen nicht in Proben aus Zellmedienüberständen nachgewiesen werden, was den Schluß nahe legte, daß YSST29 *in vivo* nicht sezerniert wird, sondern mit der Zellwand assoziiert sein könnte. Die in der Western-Analyse gesammelten Indizien, bezüglich der subzellulären Lokalisation von YSST29, konnten in den sich anschließenden, fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der eGFP-Reporterstämmen weiter untermauert werden. So war das Fluoreszenzsignal in Um518-YSST29\_N-eGFP im diffusen Netzwerk des Endoplasmatischen Retikulums verteilt und konnte zusätzlich in der, den Zellkern umgebenden, innersten Membranschicht des ER nachgewiesen werden (Abb. 3.15-B). Die Vollängenfusion in Um518-YSST29-eGFP zeigte dagegen eine eng eingegrenzte Lokalisierung. Das Fusionsprotein war vornehmlich in apikalen Bereichen sich neu abschnürender Tochterzellen zu finden (Abb. 3.15-C). Diese Beobachtung und die Tatsache, daß die Vollängenfusion in Western-Analysen nicht in Zellüberständen detektiert werden konnte, deuten daraufhin,

daß YSST29 *in vivo* als integraler Bestandteil der sich, als Folge von Zellteilung, umstrukturierenden pilzlichen Zellwand fungieren könnte.

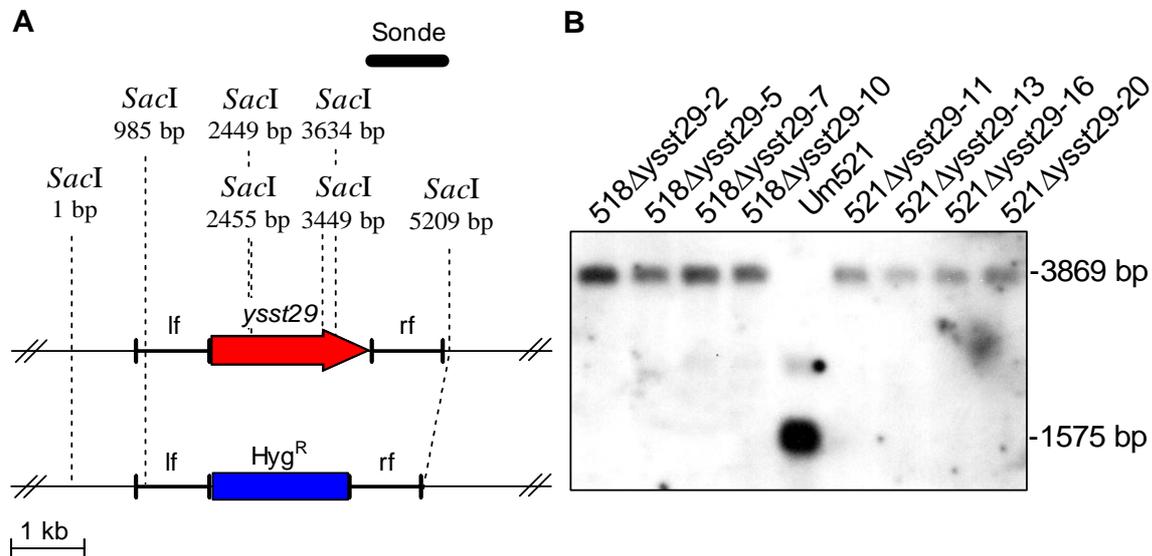


**Abb. 3.15: Subzelluläre Lokalisation der YSST29-eGFP Fusionsproteine.** **A)** Immunodetektion der Fusionskonstrukte in Proteinpräparationen von aufgeschlossenen Zellen (Z) und Zellmedienüberständen (Ü). Das Vollängenfusionsprotein (YSST29-eGFP) konnte nur in Zellaufschlüssen detektiert werden, während die Fusion des nach 111 AS gestutzten Proteins mit eGFP (YSST29\_N-eGFP) auch in das Medium sezerniert wurde. **B, C)** Zelluläre Lokalisation der YSST29 Fusionsproteine. Die Reporterstämme Um518-YSST29\_N-eGFP und Um518-YSST29-eGFP wurden licht- (DIC) und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die verkürzte Fusion (**B**) konnte in diffusen Strukturen und kleinen Vesikeln detektiert werden, welche wahrscheinlich dem ER und Golgi zuzuordnen sind. N: der von der innersten Membranschicht des ER umgebene Zellkern. Das eGFP-Vollängenfusionsprotein (**C**) war in distinkten, apikalen Regionen sich neu ausbildender Tochterzellen lokalisiert.

### 3.5.1.7 Die Deletion von *ysst29* hat keinen Einfluß auf die Pathogenität.

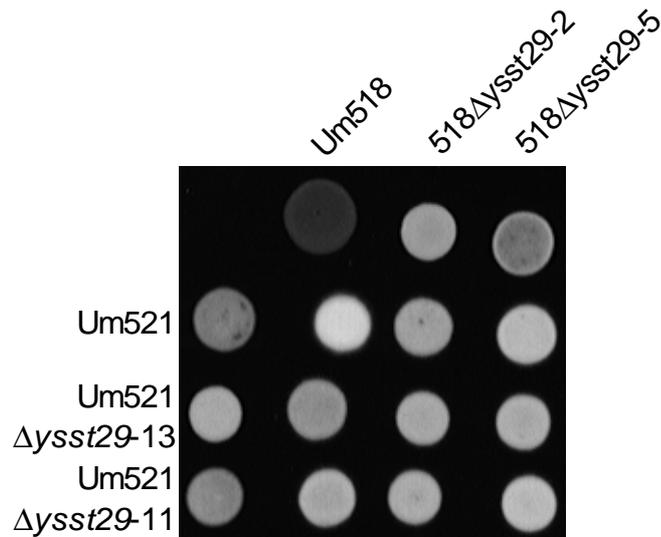
Die Akkumulation von YSST29 in Bereichen sich erweiternder Zellwände ließ vermuten, daß das Protein eine wichtige Funktion in der Morphogenese der Zellwand und somit auch der pathogenen Entwicklung innehaben könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden daher *ysst29*-Nullmutanten der genetisch kompatiblen Wildtypstämme Um521 (*a1 b1*) und

Um518 (a2 b2) generiert. Hierzu wurde der ORF von *YSST29* durch eine Hygromycin B-Resistenzkassette ersetzt. Der Genautausch in den resultierenden Deletionsmutanten Um521 $\Delta$ *ysst29* und Um518 $\Delta$ *ysst29* wurden in Southern-Analysen nachgewiesen (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Konstruktion von *ysst29*-Deletionsstämmen und Southern-Analyse der putativen *ysst29*-Deletionsklone.** **A)** Schematische Darstellung des *ysst29*-Locus vor und nach der homologen Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette. Angegeben sind die für die Integration amplifizierte und an die Resistenzkassette ligierten flankierenden DNA-Abschnitte (lf: linke Flanke; rf: rechte Flanke), sowie die Schnittstellenpositionen des für die Southern-Analyse verwendeten Restriktionsenzym (*SacI*). Hyg<sup>R</sup>: Hygromycin B-Resistenzkassette. Die Abbildung ist Maßstabsgetreu. **B)** Für Southern-Analysen wurde genomische DNA aus den erhaltenen Transformanten und dem Wildtypstamms Um521 isoliert und nach *SacI*-Restriktion elektrophoretisch aufgetrennt. Als Hybridisierungssonde wurde die DIG-dUTP-markierte rechte DNA-Flanke (rf) eingesetzt. Im Autoradiogramm zeigten sich die Signale des Wildtyplocus (1575 bp) bzw. der homologen Insertion der Hygromycin B-Kassette (3869 bp).

Die erzeugten *ysst29*-Nullmutanten wiesen keine Beeinträchtigungen bezüglich Zellmorphologie und Wachstumsverhalten, gegenüber ihren Ausgangsstämmen auf. Auch das Kreuzungsverhalten auf aktivkohlehaltigem Festmedium war dem Wildtyp entsprechend ausgeprägt (Abb. 3.17). Mit Mischkulturen genetisch kompatibler *ysst29*-Deletionsmutanten inokulierte Maispflanzen, bildeten die gleichen Pathogenitätssymptome aus, wie die mit *U. maydis* Wildtypstämmen infizierten Kontrollpflanzen. Demnach scheint die von *ysst29* beigesteuerte Funktion für die Erweiterung und Neubildung von Zellwänden keine essentielle Bedeutung zu haben oder von anderen, nicht homologen Genen kompensiert werden zu können.



**Abb. 3.17: Kreuzungsverhalten von  $\Delta$ ysst29-Nullmutanten.** Die genetisch kompatibler Stämme Um521 $\Delta$ ysst29 und Um518 $\Delta$ ysst29, sowie ihre Ausgangsstämme wurden, allein und in Mischkulturen, auf aktivkohlehaltiges Festmedium aufgetropft und für 48 h bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.5.1.8 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der Glyoxaloxidasen aus *U. maydis*.

Pilzliche Glyoxaloxidasen wurden als eine von drei extrazellulären Enzymklassen des ligninabbauenden Basidiomyceten *Phanaerochaete chrysosporium* identifiziert. Ihre biologische Funktion besteht u. a. in der Bereitstellung von  $H_2O_2$ , welches für die oxidativen Prozesse ligninlysierender Peroxidasen benötigt wird (Kersten et al., 1990). Von den drei in *U. maydis* vorkommenden homologen Glyoxaloxidasen (GLO1, GLO2 und GLO3) nimmt GLO1, auf Grund eines cytosolischen C-Terminus, mit vorgelagerter Transmembrandomäne, eine Sonderstellung ein. Die Deletion von *glo1* führte zum vollständigen Verlust der Pathogenität, während die Deletionen von *glo2* und *glo3* keinen Einfluß auf die Pathogenität von *U. maydis* zeigten. In Konsens mit der *in silico* vorhergesagten Transmembrandomäne, konnte die Hauptenzymaktivität von GLO1-überproduzierenden Stämmen in Membranfraktionen aufgeschlossener Zellen nachgewiesen werden (Aichinger et al., 2004).

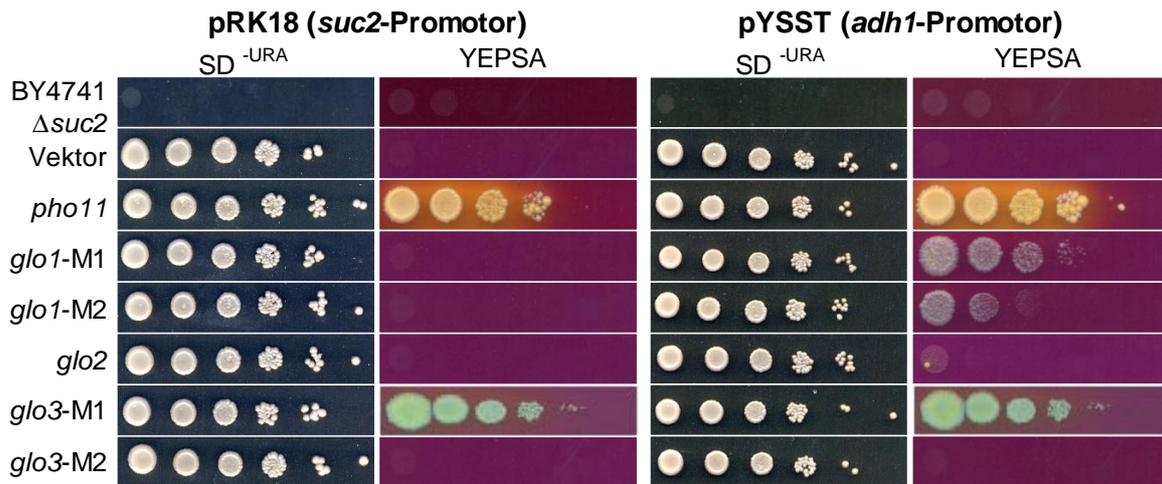
Um weitergehende Aussagen über die möglichen Zielorte der drei Glyoxaloxidasen in *U. maydis* treffen zu können, wurden die kodierenden Gene dem Testsystem der Hefe Signalpeptidselektion zugeführt. Zu diesem Zweck wurden Subklone aus den 5'-Bereichen der drei ORFs, unter Berücksichtigung von zwei möglichen Initiator-methioninen von GLO1 und GLO3, in die Invertasevektoren pRK18 und pYSST, *in frame* mit dem 5'-trunkierten Invertasegen kloniert (Tab. 3.14). Die verwendeten Vektoren unterschieden sich jeweils in der dem *suc2*-Fusionskonstrukt voranstehenden Promotorsequenz. Während pRK18 den nativen, bei Glucosemangel induzierenden *suc2*-Promotor aufwies (Klein et al., 1996), steht die Expression des Fusionsproteins in pYSST unter der Kontrolle des konstitutiven Hefe *adh1*-

Promotors (M&M). Die Eignung dieses Promotors für die Signalpeptidselektion hatte sich zuvor, unter Verwendung eines anderen Reportergens, erwiesen (Surpili et al., 2002). Es stellte sich

Protein	Subklon	iPSORT	Fragment [AS]	Vektor
GLO1	glo1-M1-RK18	SP	104	pRK18
GLO1	glo1-M1-YSST	SP	104	pYSST
GLO1	glo1-M2-RK18	SP	86	pRK18
GLO1	glo1-M2-YSST	SP	86	pYSST
GLO2	glo2-RK18	SP	94	pRK18
GLO2	glo2-YSST	SP	94	pYSST
GLO3	glo3-M1-RK18	SP	128	pRK18
GLO3	glo3-M1-YSST	SP	128	pYSST
GLO3	glo3-M2-RK18	OP	128	pRK18
GLO3	glo3-M2-YSST	OP	128	pYSST

**Tab. 3.14: Liste der N-terminalen, in der Signalpeptidselektion getesteten *glo:suc2* Klone.**

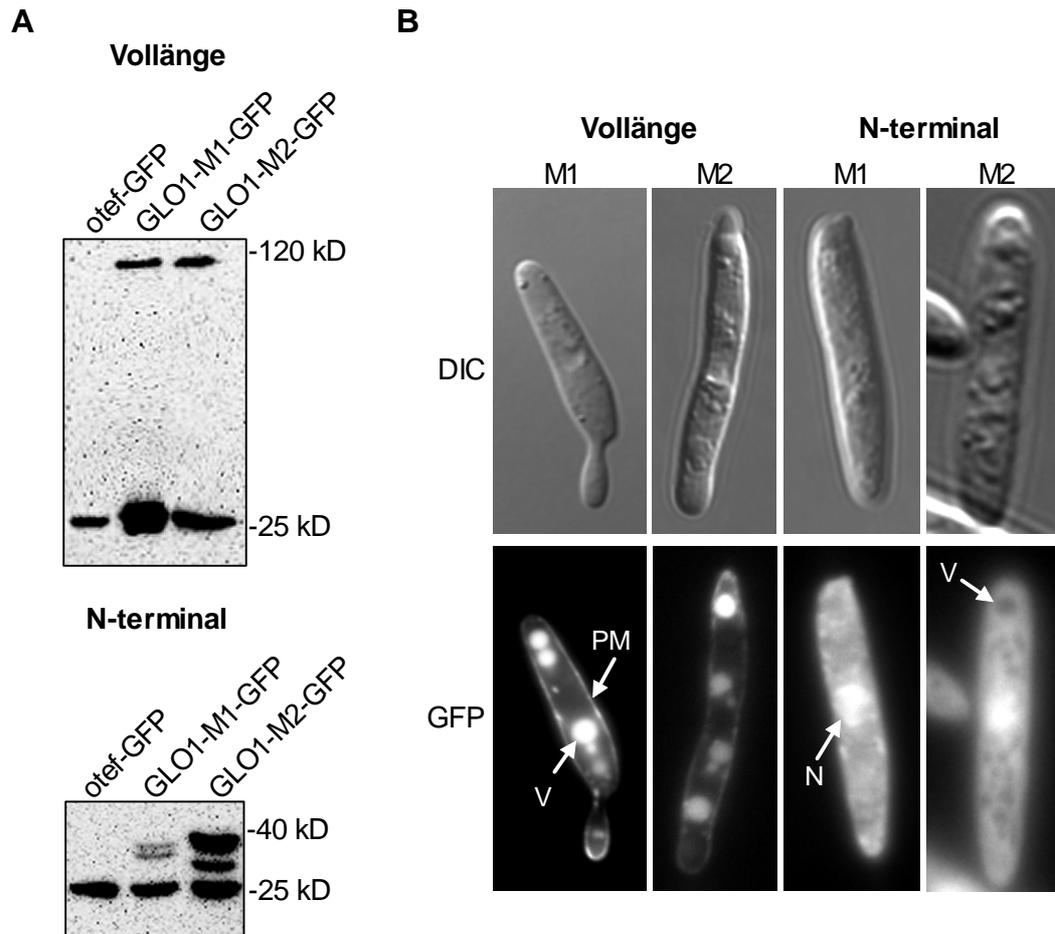
heraus, daß die verschiedenen Promotoren das Ergebnis der Signalpeptidselektion beeinflussten (Abb. 3.18). So zeigten die unter Kontrolle des nativen *suc2*-Promotors stehenden Klone nur im Falle von *glo3*-M1 Wachstum auf saccharosehaltigem Festmedium. Dieses Ergebnis bestätigte die mit iPSORT durchgeführten Sequenzanalysen der beiden möglichen Translationsstarts von GLO3, nach welcher das erste Methionin der Sequenz einem Signalpeptid voranstand, während *glo3*-M2 keine Signalsequenz enthielt (Tab 3.14). Die negative Selektion der *glo1*- und *glo2*-Subklone war dagegen überraschend, da die Sequenzanalyse mittels iPSORT in diesen Sequenzen ein mögliches Signalpeptid vorherbestimmte. Unter Kontrolle des konstitutiven *adh1*-Promotors wurden jedoch die beiden *glo1*-Konstrukte positiv selektiert, wiesen jedoch ein, gegenüber der Positivkontrolle, vermindertes Wachstum auf. Die *glo2-suc2* Fusion konnte dagegen bei konstitutiver Expression ein von den Negativkontrollen nur rudimentär zu unterscheidendes Wachstum induzieren. Somit scheint die konstitutive Expression die Toleranz des Signalpeptid Selektionssystems, gegenüber ineffizienten Signalpeptiden, noch weiter zu erhöhen. Andererseits kann auch eine falsch positive Selektion, auf Grund von Fehllokalisierungen innerhalb der Zelle, bedingt durch die große Menge der Fusionsproteine, gefördert sein (vgl. Diskussion). Abschließend ließ sich feststellen, daß der abgeleiteten Proteinsequenz von *glo3* ein in Hefe funktionales Signalpeptid voransteht, während das N-terminale Transportsignal von GLO1 in diesem heterologen System nur schwach funktional war. Das für GLO2 *in silico* vorhergesagte Signalpeptid konnte dagegen in der Signalpeptidselektion nicht bestätigt werden.



**Abb. 3.18: Funktionaler Nachweis der Signalsequenzen der GLO-Proteine.** N-terminale Subklone wurden mit *SUC2* fusioniert und nach Transformation in *suc2*-defiziente Hefen auf Wachstum auf saccharosehaltigem Festmedium getestet. Die mit den Fusionskonstrukten transformierten Hefen wurden über Nacht auf eine  $OD_{600}$  von 1 angezogen, parallel in Verdünnungsreihen von 1 bis  $10^{-5}$  auf  $SD^{-URA}$ -, bzw. YEPSA-Medium getropft und 3, bzw. 4-10 Tage bei 30 °C inkubiert. Als Negativkontrollen dienten untransformierte (*BY4741Δsuc2*), sowie die mit leeren Invertasevektoren transformierten, *suc2*-Hefestämme. Als Positivkontrolle wurde ein Subklon der in Hefe sekretierten sauren Phosphatase *PHO11* verwendet.

Da Sequenzanalysen und enzymatische Aktivitätstests, trotz des nicht eindeutigen Ergebnisses der Signalpeptidselektion, eine mögliche Lokalisierung von *GLO1* in der Plasmamembran vorschlugen (s.o.), wurde zur Feststellung der subzellulären Lokalisation in *U. maydis* *GLO1*-eGFP Reporterstämme hergestellt. Dazu wurden neben den bereits in der Signalpeptidselektion getesteten N-terminalen Subklonen zwei *GLO1*-Vollängenkonstrukte, beginnend mit dem ersten, bzw. zweiten Methionin, durch Klonierung in pCA123, C-terminal mit eGFP fusioniert. Die resultierenden Plasmide wurden linearisiert und ektopisch in den *cbx*-Locus des Wildtypstamms Um521 integriert. Die Expression der eGFP-Fusionsproteine wurde mittels Western-Analysen kontrolliert und ihre subzelluläre Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. In den Western-Analysen konnte, in Proteinpräparationen aufgeschlossener Zellen, neben den Proteinbanden der jeweiligen Fusionsproteine, auch ein Signal auf Höhe des nativen eGFP detektiert werden (Abb. 3.19-A). Dies korrelierte mit zuvor analysierten GFP-Fusionsprodukten, die unter der Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors standen (s.o.). Bei den N-terminalen, mit eGFP fusionierten *GLO1*-Subklonen, traten zusätzliche, intermediäre Banden auf, welche auf zu den Vollängenfusionen abweichende Proteinabbau schließen ließen. In Proteinpräparationen aus Medienüberständen konnte kein GFP-Signal nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In fluoreszenzmikroskopischen Charakterisierungen der *GLO1*-eGFP-Reporterstämme, konnte die Vollängenfusionsproteine in der Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 3.19-B). Daneben wurde weitere Fluoreszenz, welche der nativen eGFP-Proteinbande zuzuordnen war, in den Vakuolen festgestellt. Interessanterwei-

se waren beide Fluoreszenzsignale unabhängig von den verschiedenen Initiator-methioninen. Die eGFP-Fusionsproteine der N-terminalen glo1-Subklone zeigten übereinstimmend eine gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma und akkumulierten zusätzlich im Zellkern. Vakuolen und kleinere Vesikel waren dagegen frei von Fluoreszenz. Abschließend ließ sich damit die für GLO1 angenommene Lokalisierung in der Plasmamembran bestätigen, wobei die Translokation durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums nicht durch ein N-terminales Signal vermittelt zu werden scheint. Diese Annahme korrelierte mit den zuvor ermittelten Ergebnissen der Hefe Signalpeptidselektion.



**Abb. 3.19:** Analyse der GLO1-GFP Reporterstämme

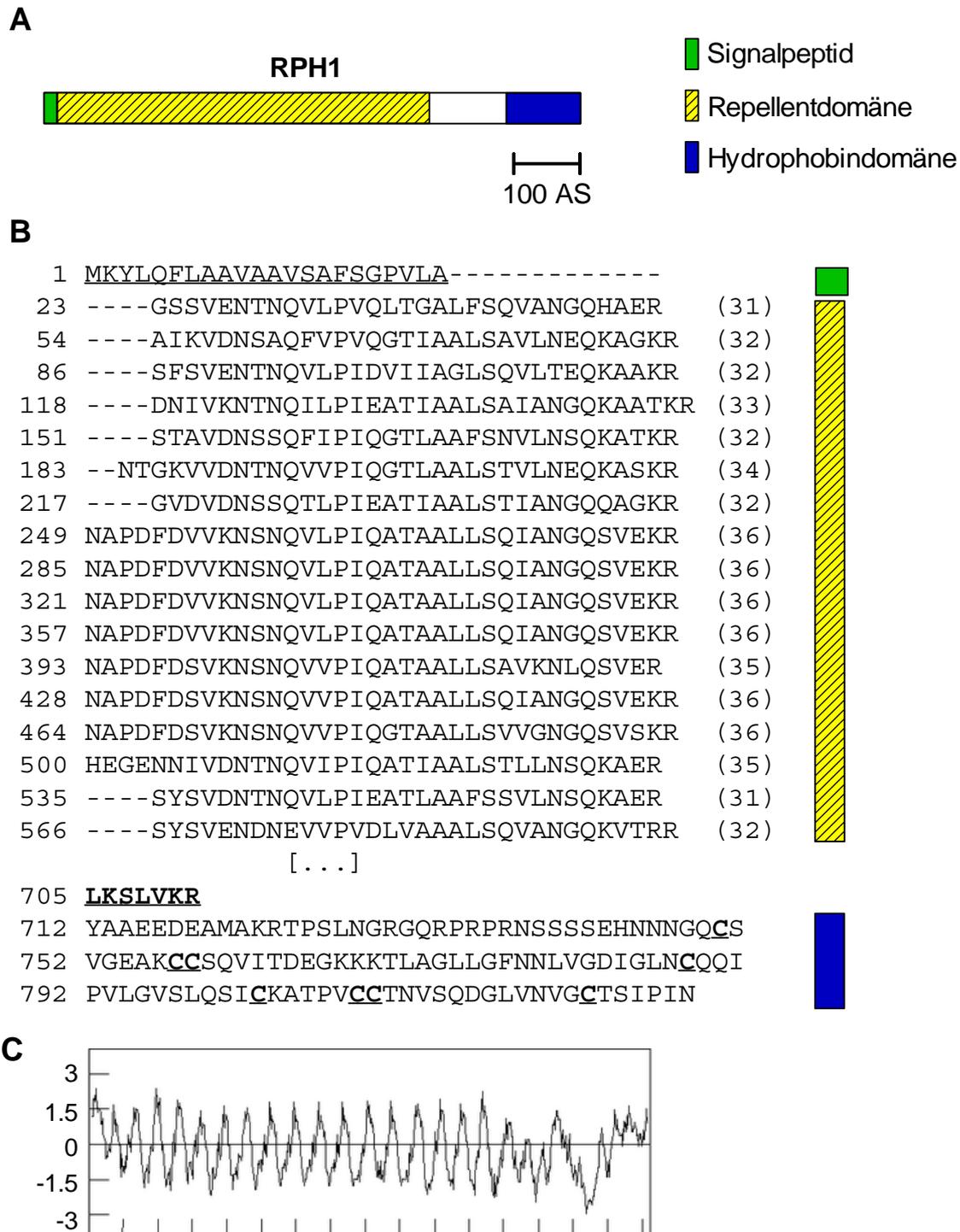
### 3.5.2 Charakterisierung von Proteinen der Zelloberfläche.

#### 3.5.2.1 Sequenzanalyse von RPH1, einem sekretierten bifunktionalen Protein mit Repellent- und Hydrophobindomäne.

Die aus der Signalpeptidselektion hervorgegangenen YSST-Klone 11 und 101 ließen sich den beschriebenen *U. maydis* Genen *hum2* bzw. *rep1* zuordnen. Beide Genprodukte wurden in reversgenetischen Ansätzen als sekretorische Proteine identifiziert (Bohlmann, 1996; Wösten et al. 1996). Das Hydrophobin HUM2 (Bohlmann, 1996) ist spezifisch in der dikaryo-

---

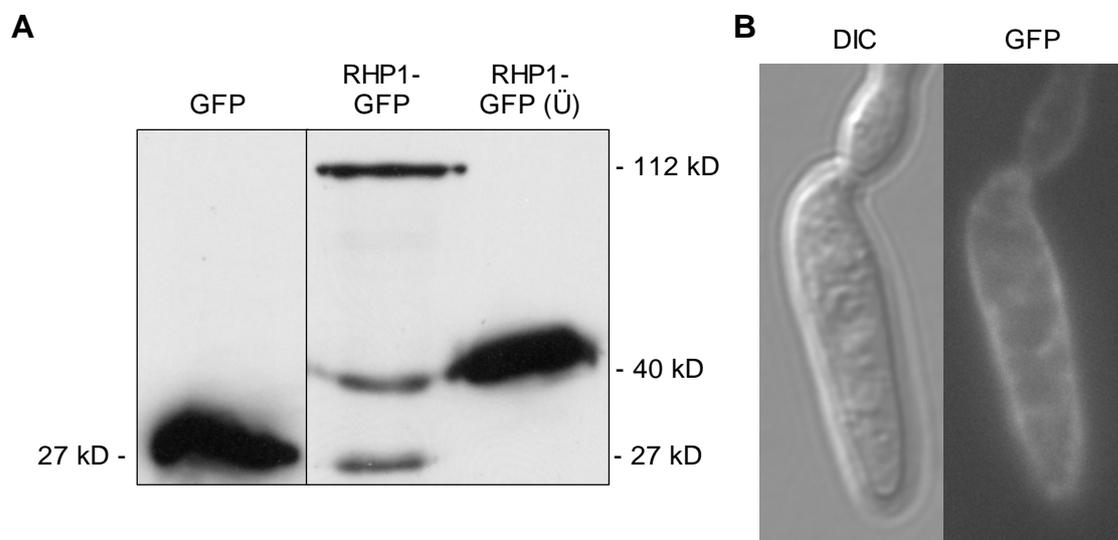
tischen Phase von *U. maydis* exprimiert und steht unter indirekter Kontrolle des  $\beta$ -Heterodimers. Das mit YSST46 assoziierte, intronlose Gen (UM04433.1) vereinte in seiner abgeleiteten Proteinsequenz von 828 Aminosäuren beide oben beschriebenen Proteindomänen. Daher wurde das Protein fortan als RPH1 (Repetitive Protein and Hydrophobin) bezeichnet. Die 575 AS umfassende repellentähnliche Domäne erstreckte sich ab der möglichen Spaltungsstelle des Signalpeptids und wies 17 amphipathische Wiederholungen von 31 – 36 AS auf, welche jeweils in putativen KEX2-Prozessierungsmotiven endeten (Abb. 3.20). Vier dieser Wiederholungen waren identisch. Die Prozessierungsstellen wichen jedoch teilweise in den beiden C-terminalen und in REP1 funktionalen Lysin-Arginin, bzw. Prolin-Arginin Resten ab. Statt dessen war bei 9 Wiederholungen dem C-terminalen Arginin ein Glutamat vorangestellt. Eine Prozessierung durch KEX2 schien bei diesen Motiven daher fraglich. Die Hydrophobindomäne umfaßte 117 AS und wies die konservierten acht Cysteine in der für Hydrophobine charakteristischen Anordnung auf (Abb. 3.20-B).



**Abb. 3.20: A) Struktur und Sequenz von RPH1: A)** Übersicht über die Domänenstruktur. **B)** Aminosäuresequenz. Die Längen der 17 repetitiven Teilsequenzen der Repellentdomäne sind in Klammern angegeben. Der zwischen beiden Domänen liegende Sequenzabschnitt wurde ausgespart und durch Punkte symbolisiert. Das putative Signalpeptid ist unterstrichen, die putative letzte Prozessierungsstelle vor der Hydrophobindomäne, sowie die konservierten Cysteine sind fett unterstrichen dargestellt. **C)** Hydropathieplot nach Kyte und Doolittle (1982).

### 3.5.2.2 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von RPH1.

Die Herstellung von RHP1-eGFP Reporterstämmen erfolgte wie in Abschnitt 3.5.1.1 beschrieben. Die Expression des mit eGFP fusionierten Vollängenklons wurde in Western-Analysen überprüft. Dabei ergab sich bei unterschiedlich durchgeführten Proteinpräparationen ein abweichendes Bandenmuster (Abb. 3.21). Bei Proteinpräparationen aufgeschlossener Zellen konnte die Proteinbande des Vollängenfusionsproteins bei ca. 112 kD nachgewiesen werden. Abzüglich des eGFP-Anhangs und des Signalpeptids errechnete sich für RPH1 ein Molekulargewicht von 85 kD, was der primären Aminosäuresequenz entsprach. Demnach scheint RPH1 bei der Passage durch ER und Golgi-Apparat keinen Glycosilierungsschritten zu unterliegen. Eine weitere Bande trat bei 40 kD auf und entsprach der prozessierten, noch mit eGFP fusionierten Hydrophobindomäne. Somit konnte die Funktionalität der postulierten Prozessierungsstelle zwischen der C-terminalen Hydrophobindomäne und dem Restprotein *in vivo* nachgewiesen werden. Schließlich trat erneut ein Signal auf Höhe des nativen eGFP auf, welches vom Abbau des überexprimierten Fusionsproteins herrührte. In Proteinpräparationen aus dem Medienüberstand sedimentierter Zellen konnte die Hydrophobin-eGFP Bande nachgewiesen werden, während andere Signale nicht auftraten. Durch diesen Befund konnte die Funktion des durch Signalpeptidselektion und Sequenzanalyse vorhergesagten Signalpeptids von RPH1 in *U. maydis* bestätigt werden. Aus der Abwesenheit von Vollängen Fusionsprotein in Zellüberständen ließ sich folgern, daß RPH1 während der Passage durch ER und Golgi-Apparat und nicht extrazellulär prozessiert wird.

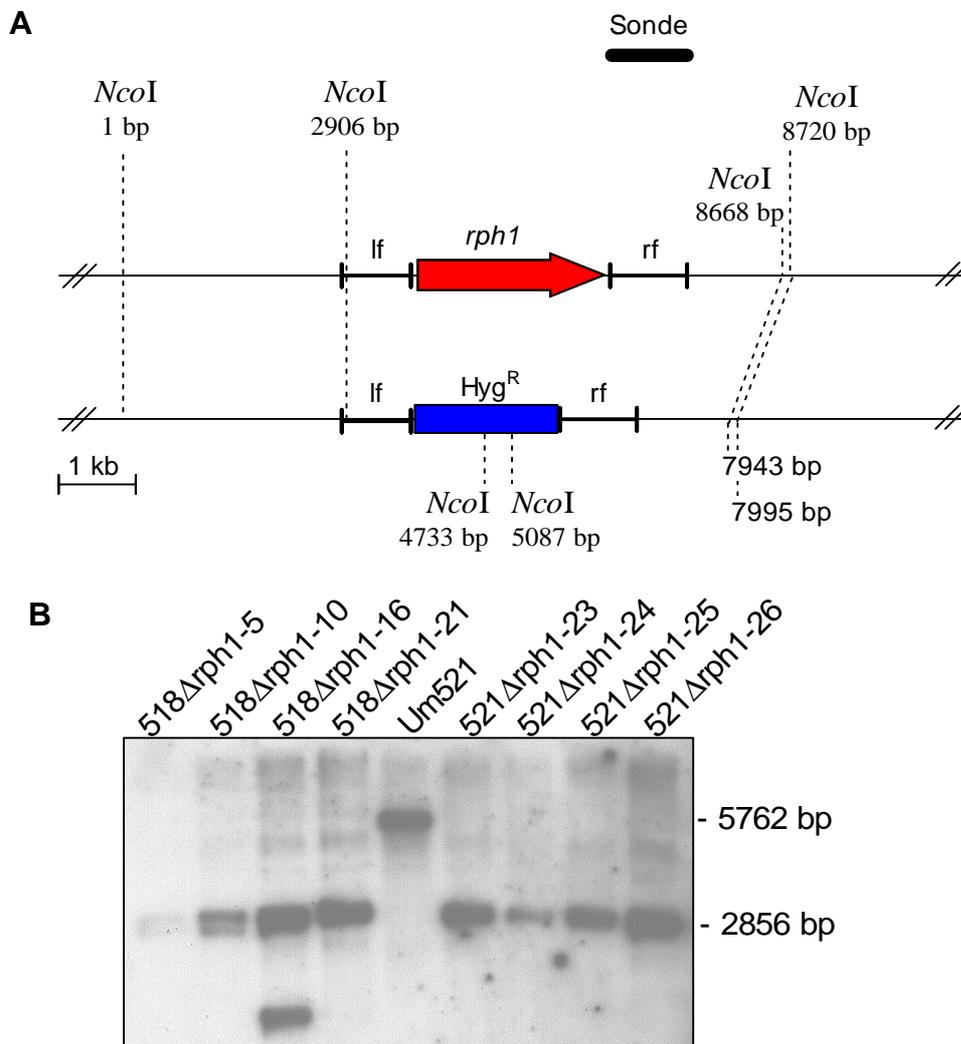


**Abb. 3.21: Subzelluläre Lokalisation des RHP1-eGFP Fusionsproteins.** **A)** Immunodetektion von RHP1-eGFP in Ganzzellpräparaten und Medienüberständen (Ü). Weitere Erläuterungen im Text. **B)** Fluoreszenzmikroskopie von RHP1-eGFP Reporterstämmen. Fluoreszenz konnte in der Peripherie der Zelle beobachtet werden.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der RPH1-eGFP Reporterstämmen war ein schwach fluoreszierendes Signal in der Peripherie der Zelle zu beobachten, was die aus den Westernanalysen gezogenen Schlüsse zur subzellulären Lokalisation von RPH1 weiter stützte.

### 3.5.2.3 Herstellung und Analyse *rph1*-defizienter *U. maydis* Stämme

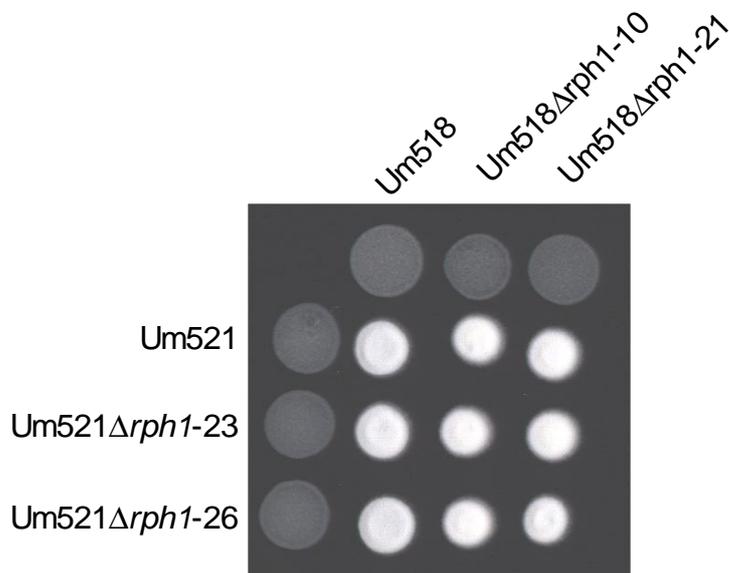
Zur Funktionsanalyse von *rph1* wurden Deletionsmutanten, der Stämme 521 (*a1b1*) und 518 (*a2b2*), durch Austausch des *rph1*-Locus gegen eine Hygromycin B-Resistenzkassette, hergestellt (Abb. 3.22, vgl. 3.5.1.2). Die durch Ganzzell-PCR und Southern-Analyse bestätigten *rph1*-Nullmutanten, Um518 $\Delta$ *rph1* und Um521 $\Delta$ *rph1*, wiesen keine zum Wildtyp erkennbaren Unterschiede in Wachstum und Zellmorphologie auf.



**Abb. 3.17: Schematische Darstellung der Konstruktion von *rph1*-Deletionsstämmen und Southern-Analyse der putativen Deletionsklone** **A)** Schematische, maßstabsgetreue Darstellung des *rph1*-Locus vor und nach der homologen Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette. Angegeben sind die für die Integration amplifizierten und an die Hygromycin B-Resistenzkassette ligierten flankierenden DNA-Abschnitte (lf: linke Flanke; rf: rechte Flanke), sowie die Schnittstellenpositionen des für die Southern-Analyse verwendeten Restriktionsenzym (NcoI). HygR: Hygromycin B-Resistenzkassette; KO: Gendeletion, "Knock-out"; WT: Wildtyp. **B)** Für Southern-Analysen wurde genomische DNA aus den erhaltenen Transformanten und des Wildtypstamms Um521 isoliert und nach NcoI-Restriktion elek-

trophoretisch aufgetrennt. Als Hybridisierungssonde wurde die DIG-dUTP-markierte rechte DNA-Flanke (rf) eingesetzt. Im Autoradiogramm zeigten sich die Signale des Wildtyplocus (5762 bp) bzw. der homologen Insertion der Hygromycin B-Resistenzkassette (2856 bp).

Weiterführend wurde das Kreuzungsverhalten beider Stämme auf aktivkohlehaltigem Medium untersucht. Auch hierbei konnten keine Beeinträchtigungen gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3.18). *Rep1*-Nullmutanten zeigten dagegen ein stark verringertes Hyphenwachstum auf Aktivkohlemedium (Wösten et al. 1996). *Rph1* scheint somit eine andere biologische Funktion zu besitzen. In abschließenden Pathogenitätstests entsprachen Tumorbildung und –entwicklung, sowie Brandsporenbildung denen des Wildtyps. Demnach scheint *rph1* allein für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* nicht von Bedeutung zu sein.

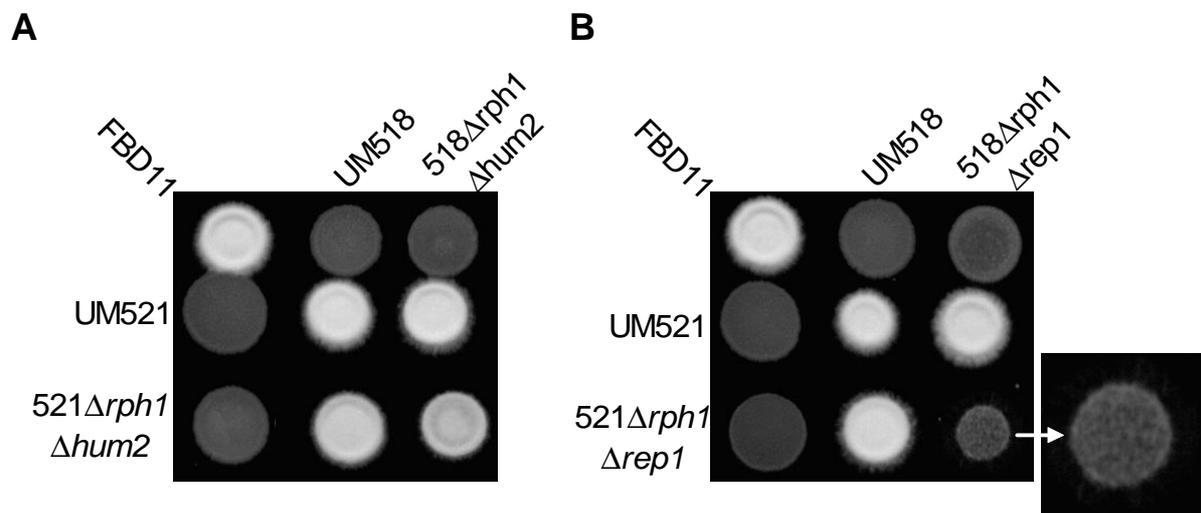


**Abb. 3.18: Kreuzungsverhalten der *rph1*-Deletionsmutanten.** Die angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf aktivkohlehaltiges Medium aufgetropft und 48 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dikaryotische Filamente erscheinen als weiße, and den Rändern fusselige Kolonien (*fuz*<sup>+</sup>-Phänotyp).

#### 3.5.2.4 Die gleichzeitigen Deletionen von *rph1* und *rep1* bzw. *rph1* und *hum2* haben keinen Einfluß auf die pathogene Entwicklung.

Da RPH1 die Produkte der Gene *rep1* und *hum2* als getrennte Domänen in einer Proteinsequenz vereint, erschien es möglich, daß eine gleichzeitige Deletion von *rph1* und jeweils einem der beiden Gene, die Pathogenität von *U. maydis*, durch die Eliminierung redundanter Genfunktionen, beeinflussen konnte. Somit wurden in den bereits vorhandenen, kompatiblen Deletionsstämmen Um521Δ*rhp1* und Um518Δ*rhp1* die Gene *rep1* bzw. *hum2* deletiert. Hierzu wurden die offenen Leserahmen beider Gene durch eine Nourseothricin-

Resistenzkassette (NAT<sup>R</sup>) ersetzt. Die Austausche in den resultierenden Stämmen Um521 $\Delta$ *rph1* $\Delta$ *rep1*, Um518 $\Delta$ *rph1* $\Delta$ *rep1*, Um521 $\Delta$ *rph1* $\Delta$ *hum2* und Um518 $\Delta$ *rph1* $\Delta$ *hum2* wurden mittels Ganzzell-PCR und Southern-Analysen nachgewiesen. Beide Doppelnulmutanten konnten in Bezug auf Wachstum und Zellmorphologie nicht vom Wildtyp unterschieden werden. Hinsichtlich der Dikaryenbildung in Kreuzungstests auf aktivkohlehaltigem Festmedium war bei den *rph1-hum2*-Nullmutanten kein Unterschied zum Wildtyp festzustellen (Abb. 3.19-A). Die Ausbildung von Luftmyzelien war in *rph1-rep1*-Nullmutanten dagegen stark vermindert (Abb. 3.19-B). Das Auftreten dieses Phänotyps stimmte mit dem von Wösten et al. (1996) beschriebenen Phänotyp *rep1*-deletierter Stämme überein. Ein darüber hinausgehender, kompletter Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung dikaryotischer, luftexponierter Myzelien konnte bei dieser Doppelmutante jedoch nicht beobachtet werden.



**Abb. 3.19: Kreuzungsverhalten der *rhp1*-Doppelmутanten. A)  $\Delta$ *rph1* $\Delta$ *hum2* Doppelmутante. B)  $\Delta$ *rph1* $\Delta$ *rep1* Doppelmутante. Als Zusätzliche Kontrolle wurde der diploide, filamentös wachsende Stamm FBD11 (*a1a2 b1b2*), hinzugezogen.**

In Bezug auf die Pathogenität infizierter Maispflanzen konnte bei beiden Mutanten keine Beeinträchtigung gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden.

### 3.5.2.5 Sequenzanalyse von RSP1, einem repetitiven, sekretorischen Protein.

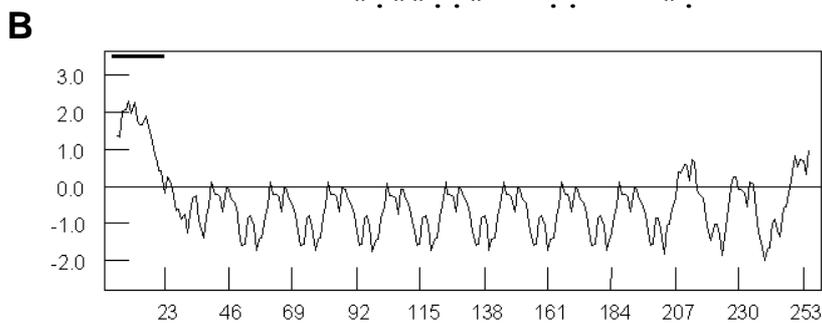
Das durch YSST142 identifizierte, intronlose Gen (UM06112.1) befindet sich auf Chromosom XXI. Die abgeleitete Proteinsequenz umfaßte 260 AS und wies, analog zu REP1 und RPH1, mehrere zu beiden Proteinen nicht homologe und durch mögliche KEX2-Prozessierungsstellen getrennte, Sequenzwiederholungen auf (Abb. 3.20). Die Längen der insgesamt 11 abzuleitenden Peptide betragen, mit Ausnahme des ersten und C-terminalen Peptids konstant 21 AS. Acht der Wiederholungen wiesen ein C-terminales LKKR-Motiv auf, welches in REP1 als funktionale Prozessierungsstelle nachgewiesen wurde (Wösten et al.

1996). 7 dieser 8 Teilsequenzen waren identisch, während die achte Sequenz einen einzelnen Aminosäureaustausch vorwies. Als signifikanten Unterschied zu REP1 und RPH1 besaß RSP1 ein abweichendes Hydropathiemuster, welches ein vornehmlich hydrophiles Profil aufzeigte.

**A** (SP) MKLSFTIVATAALVASCTFA

1	APTPASSKLATRYDGDII	IDETNAALKDLGLKKR	(12+21)
2		YDGDII	IDETNAALKDLGLKKR (21)
3		YDGDII	IDETNAALKDLGLKKR (21)
4		YDGDII	DKTNAALKDLGLKKR (21)
5		YDGDII	IDETNAALKDLGLKKR (21)
6		YDGDII	IDETNAALKDLGLKKR (21)
7		YDGDII	IDETNAALKDLGLKKR (21)
8		YDGDII	IDETNAALKDLGLKKR (21)
9		YEGDVLDEINGCLTSLGFRKR	(21)
10		YEGDVLDELAAAEKEFGVRKR	(21)
11		YEGDVLDAVNGCLKSLGL	(19)

\* . \*\* . . \*    . .    \* .

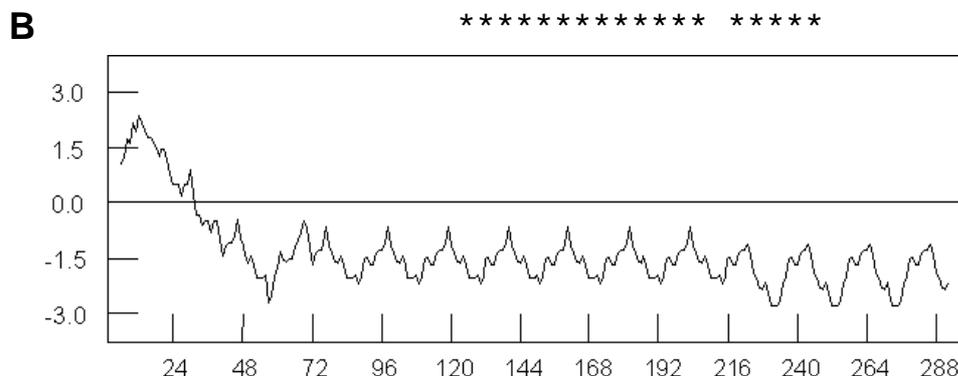
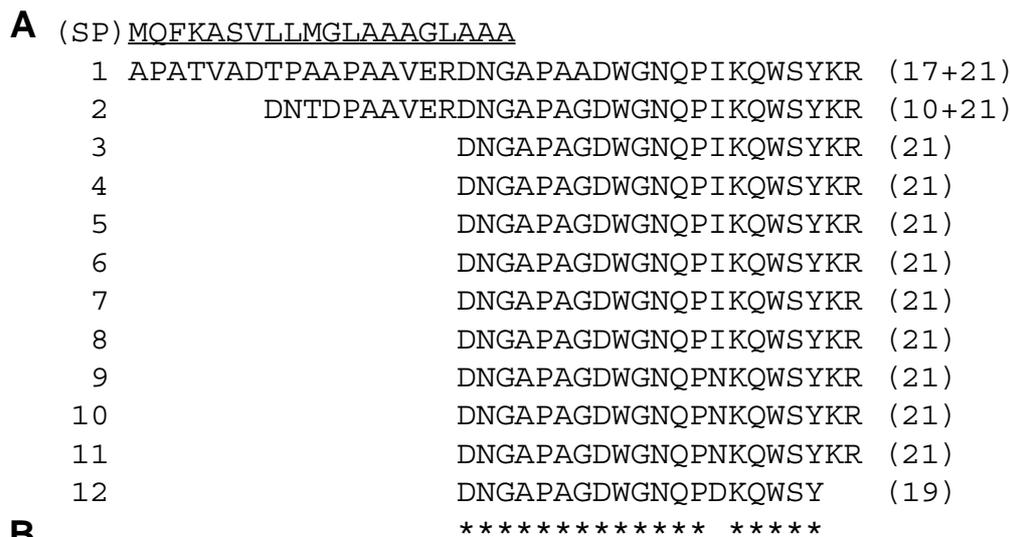


**Abb. 3.20: Strukturelle Eigenschaften von RSP1. A)** Sequenzähnlichkeit der einzelnen Aminosäurewiederholungen (Anzahl der Aminosäuren rechts in Klammern). Mit Ausnahme der C-terminalen Wiederholung enden alle Teilsequenzen mit einem typischen KEX2-ähnlichen KR-Prozessierungsmotiv. Das putative Signalpeptid ist unterstrichen dargestellt. **B)** Hydropathiemuster von RSP1, erstellt mit dem Programm WinPep (Hennig, 1999) nach den Parametern von Kyte und Doolittle (1982).

### 3.5.2.6 Identifizierung von RSP2, einem weiteren repetitiven Protein mit putativem Signalpeptid und KEX2-Prozessierungsstellen.

Mit *rep1*, *rph1* und *rsp1* waren drei repetitive Gene identifiziert worden, bei deren Genprodukten es sich um nachgewiesen oder potentiell prozessierte Vorstufenproteine handelt. Obwohl die Sequenzen in ihrer Aminosäurekomposition keine Ähnlichkeiten aufweisen, sind ihnen, mit den in identischen oder nahezu identischen Abständen auftretenden Lysin-Arginin-Motiven, doch unverkennbare, strukturelle Eigenschaften gemein. Für eine computergestützte Sequenzanalyse wurde das PERL-Skript PS-3 (vgl. M&M) entwickelt, welches die DNA-Sequenz des *U. maydis* Genoms, in allen 6 Leserahmen, nach periodisch auftretenden, KEX2-ähnlichen Prozessierungsmotiven absuchte. Dabei wurden nur die an der P1- und P2-

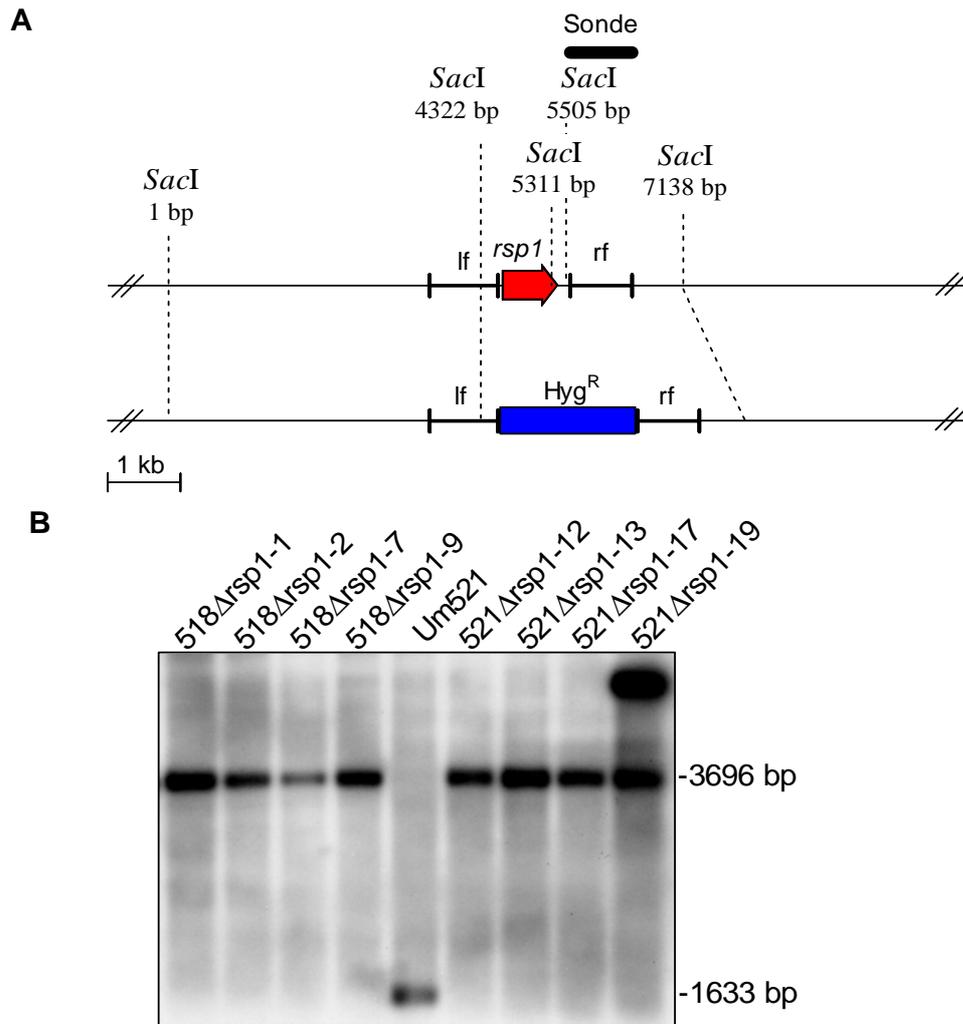
Position auftretenden Aminosäuren eines KEX2-Motivs berücksichtigt. Durch diesen bioinformatischen Ansatz konnte ein weiterer, 297 Aminosäuren kodierender offener Leserahmen (UM05708.1) auf Chromosom XVI, identifiziert werden. Das 5' Ende des annotierten Gens war zudem in dem EST-Klon CF642967.1 enthalten und der daraus abgeleitete N-Terminus wies eine, durch die Computerprogramme iPSORT und TargetP gleichermaßen vorhergesagte, Signalsequenz auf (Abb. 3. 21). In Aufbau und Struktur besaß diese Proteinsequenz bestechende Ähnlichkeit mit RSP1 und wurde daher als RSP2 bezeichnet. So waren die Längen der jeweils repetitiven Sequenzabschnitte, mit 21 AS (jeweils 19 bei der C-terminalen Wiederholung) zu RSP1 identisch, nur deren Gesamtzahl war, auf Grund der längeren Gesamtsequenz, um eine Wiederholung erhöht. Auch RSP2 besaß ein alternierendes Hydropathiemuster, welches im Vergleich zu RSP1 jedoch stärker im hydrophilen Bereich angesiedelt war. In Bezug auf die Aminosäurekomposition wies RSP2 keine Übereinstimmungen mit den Proteinsequenzen von REP1, RPH1 und RSP1 auf. Eine weiterführende Charakterisierung des bisher nur *in silico* analysierten RSP2 wurde in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt.



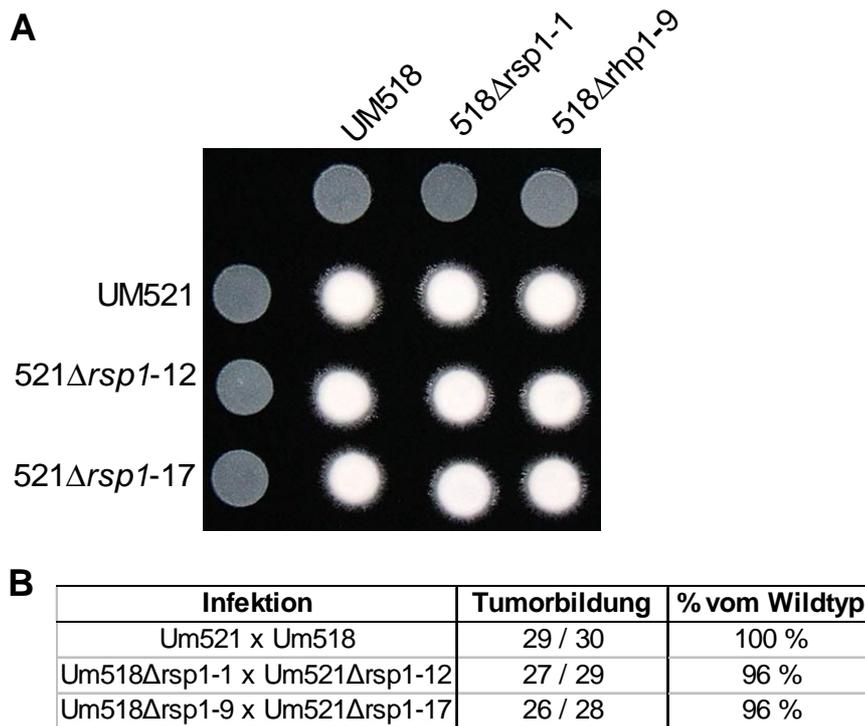
**Abb. 3.21: Strukturelle Eigenschaften von RSP2. A)** Sequenzähnlichkeit der einzelnen Aminosäurewiederholungen (Anzahl der Aminosäuren rechts in Klammern). Mit Ausnahme der C-terminalen Wiederholung enden alle Teilsequenzen mit einem typischen KEX2-ähnlichen KR-Prozessierungsmotiv. Das putative Signalpeptid ist unterstrichen dargestellt. **B)** Hydropathiemuster von RSP2, erstellt nach den Parametern von Kyte und Doolittle (1982).

### 3.5.2.7 Herstellung und Analyse *rsp1*-defizienter Stämme

Um Einblick in die biologische Funktion von *rsp1* zu erlangen, wurden *rsp1*-Deletionsmutanten hergestellt. Hierfür wurde der ORF von *rsp1* in den genetisch kompatiblen Wildtypstämmen 521 (*a1b1*) und 518 (*a2b2*) gegen eine Hygromycin B-Resistenzkassette ersetzt (Abb. 3.22). Die durch Ganzzell-PCR und Southern-Analyse bestätigten Deletionsmutanten, Um518 $\Delta$ *rsp1* und Um521 $\Delta$ *rsp1*, waren in Bezug auf Wachstum und Zellmorphologie vom Wildtyp nicht zu unterscheiden. Anschließend wurde das Kreuzungsverhalten der Deletionsstämmen auf aktivkohlehaltigem Festmedium untersucht, und es konnte gegenüber dem Wildtyp keine Beeinträchtigung der Dikaryenbildung festgestellt werden (Abb. 3.23-A). Auch in Bezug auf die Pathogenität bei Infektion von Maispflanzen zeigten Mischungen kompatibler *rsp1*-Deletionsmutanten keine signifikante Verminderung der Pathogenität gegenüber entsprechenden Wildtypinoculaten (Abb. 3.23-B). Sowohl Tumorbildung und -entwicklung als auch Sporulation und Sporenkeimung waren normal ausgeprägt (nicht gezeigt).



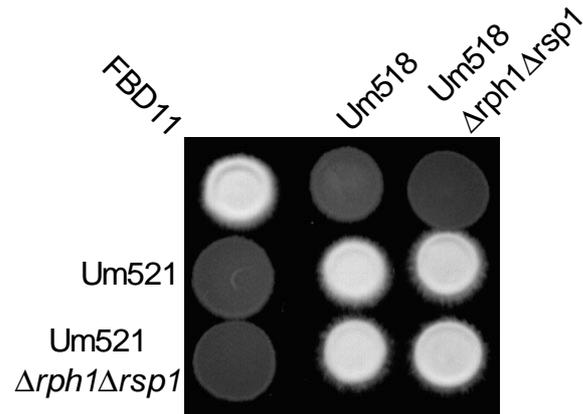
**Abb. 3.22: Schematische Darstellung der Konstruktion von *rsp1*-Deletionsstämmen und Southern-Analyse der putativen *rsp1*-Deletionsklone. A)** Schematische Darstellung des *rsp1*-Locus vor und nach der homologen Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette. Angegeben sind die für die Integration amplifizierten und an die Hygromycin B Resistenzkassette ligierten flankierenden DNA-Abschnitte (lf: linke Flanke ;rf: rechte Flanke), sowie die Schnittstellenpositionen des für die Southern-Analyse verwendeten Restriktionsenzym (SacI). HygR: Hygromycin B-Resistenzkassette; KO: Gendeletion („Knock-out“); WT: Wildtyp. Die Abbildung ist maßstabsgetreu. **B)** Für Southern-Analysen wurde genomische DNA aus den erhaltenen Transformanten und dem Wildtypstamm 521 isoliert und nach SacI-Restriktion elektrophoretisch aufgetrennt. Als Hybridisierungssonde wurde die DIG-dUTP-markierte rechte DNA-Flanke (rf) eingesetzt. Im Autoradiogramm zeigten sich die Signale des Wildtyplocus (1633 bp) bzw. der homologen Insertion der Hygromycin B-Resistenzkassette (3696 bp). Bei Klon 521Δ*rsp1*-19 fand ein zusätzliches ektopisches Rekombinationsereignis der Resistenzkassette statt.



**Abb. 3.23: Einfluß von RSP1 auf Kreuzungsverhalten und Pathogenität. A)** Kreuzungsverhalten von *rsp1*-Dekletionsstämmen auf aktivkohlehaltigen Festmedium. **B)** Ergebnis des Pathogenitätstests mit *rsp1*-Dekletionsstämmen. Die Bonitur erfolgte drei Wochen nach Infektion. Angegeben sind die Anzahl der Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der Infizierten Pflanzen.

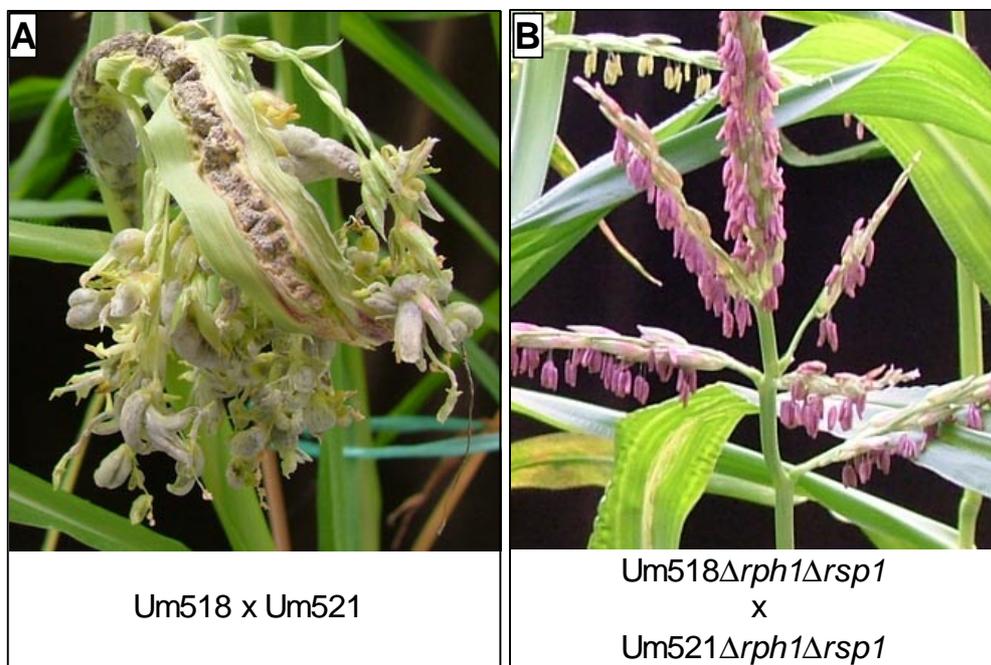
### 3.5.2.8 Die gleichzeitige Deletion von *rph1* und *rsp1* führt zu Apathogenität.

Die repetitiven und strukturell ähnlichen Sequenzen der Genprodukte von *rph1* und *rsp1* legen, wie schon zuvor bei *rph1* und *rep1*, die Vermutung nahe, daß beide Proteine gemeinsame oder miteinander kombinierte biologische Funktionen in *U. maydis* ausüben könnten. Daher wurde *rsp1* in den genetisch kompatiblen *rph1*-Deletionsmutanten Um521Δ*rph1* und Um518Δ*rph1* gegen eine Nourseothricin-Resistenzkassette ausgetauscht. Die homologe Integration der Resistenzkassette wurde, mittels Ganzzell-PCR und Southern-Analysen bestätigt. Die resultierenden Stämme Um521Δ*rph1*Δ*rsp1* und Um518Δ*rph1*Δ*rsp1* wiesen, bezüglich Wachstum und Zellmorphologie, keine Besonderheiten gegenüber dem Wildtyp auf (nicht gezeigt). Auch das Kreuzungsverhalten auf aktivkohlehaltigem Festmedium stimmte mit dem Wildtyp überein (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Kreuzungsverhalten von  $\Delta rph1\Delta rsp1$  Doppelmutanten.**

Eine mögliche Auswirkung der *rph1-rsp1*-Doppeldelation auf die Pathogenität wurde durch Maisinfektionen mit Mischkulturen kompatibler Mutanten getestet und es konnte ein vollständiger Pathogenitätsverlust festgestellt werden. Die infizierten Maispflanzen wiesen keinerlei Anthocyanbildung auf und waren auch in Bezug auf Ausbildung und Anzahl von Tumoren völlig symptomfrei gegenüber den mit Wildtyp infizierten Kontrollpflanzen (Abb. 3.25 und Tab. 3.13).



**Abb. 3.25: Pathogenitätsverlust von *rph1-rsp1*-Nullmutanten.** Männliche Infloreszenzen der per Tropfinfektion mit Kulturgemischen von kompatiblen Wildtypstämmen (A), bzw. *rph1-rsp1*-Doppelmutanten (B) infizierten, zwei Wochen alten Maispflanzen. Die Bonitur erfolgte drei Wochen nach Infektion. Bei der Wildtypkontrolle trat eine ausgeprägte Tumorbildung an allen Pflanzenorganen auf, während die Mutante keinerlei Infektionssymptome hervorbrachte. Die in (B) erkennbare Anthocyanfärbung in Teilen der männlichen Blüte, ist nicht auf In-

fektionseinwirkung, sondern auf den natürlichen Habitus reifer Pollensäcke der Maisvarietät „Gaspar Flint“ zurückzuführen.

Infektion		Tumorbildung	% vom Wildtyp
Um521 x Um518		29 / 30	100 %
Um521 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rsp1-16 Um518 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rsp1-2	x	0 / 28	0%
Um521 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rsp1-19 Um518 $\Delta$ rph1 $\Delta$ rsp1-9	x	0 / 192	0%

**Tab. 3.13: Ergebnis des Pathogenitätstests mit *rph1-rsp1*-Dekletionsstämmen.** Die Bonitur erfolgte drei Wochen nach Infektion. Angegeben sind die Anzahl der Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der Infizierten Pflanzen.

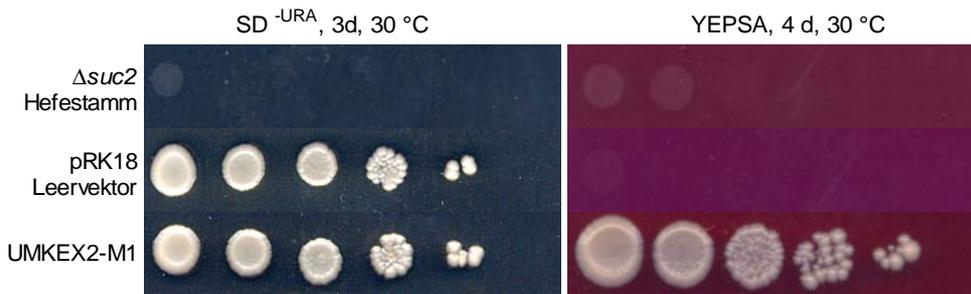
Trotz der eindeutigen Ergebnisse der Pathogenitätstests mit dieser Doppelmutante kann über die genaue biologische Funktion und das Zusammenspiel von RPH1 und RSP1 an dieser Stelle nur spekuliert werden und es sei daher auf den Diskussionsteil verwiesen,

### 3.5.2.9 Identifizierung des *kex2*-homologen Gens in *U. maydis*.

Das in *U. maydis* zu *kex2* homologe Gen *umkex2* (UM02843.1) ist auf Chromosom VII des Genoms lokalisiert und kodiert in einem einzelnen offenen Leserahmen für ein Protein von 1021 AS.

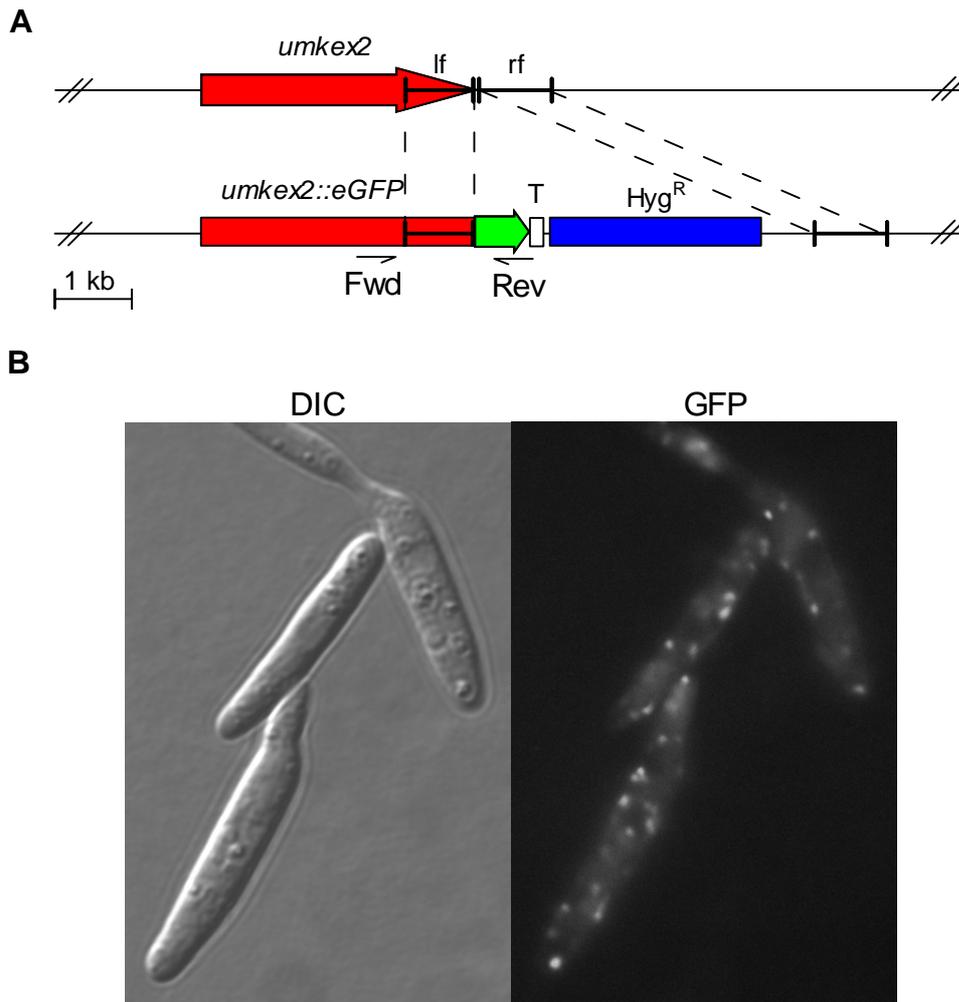
### 3.5.2.10 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von UMKEX2

Die abgeleitete Proteinsequenz von UMKEX2 wies ein in computergestützten Sequenzanalysen vorhergesagtes Signalpeptid auf, dessen biologische Funktionalität Hefe getestet wurde. Dazu wurde die N-terminalen 115 Aminosäuren C-terminal mit *suc2* fusioniert und in das System der Signalpeptidselektion eingebracht. Die Transformierten, *suc2*-defizienten Hefen zeigten nach vier Tagen gutes Wachstum auf saccharosehaltigem Medium (Abb. 3.26). Somit konnte die biologische Funktionalität des UMKEX2-Signalpeptids in Hefe nachgewiesen werden.



**Abb. 3.26: Funktionaler Nachweis der Signalsequenz von UMKEX2.** Ein N-terminaler 115 AS kodierender *umkex2*-Subklon wurde auf eine funktionale Signalsequenz hin getestet. Die mit dem *umkex2:suc2*-Fusionskonstrukt transformierten *suc2*-defiziente Hefen wurden über Nacht auf eine  $OD_{600}$  von 1 angezogen, parallel, in Verdünnungsreihen von 1 bis  $10^{-5}$  auf  $SD^{-URA}$ -, bzw. YEPSA-Medium getropft und 3, bzw. 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Als Negativkontrolle dienten der untransformierte, sowie der mit leeren Invertasevektor transformierte, *suc2*-Hefestamm.

Die subzelluläre Lokalisation des in Pilzen stark konservierten KEX2 wurde bisher in Hefe untersucht und dort in verschiedenen Kompartimenten des Golgiapparates nachgewiesen (Franzussoff und Schekmann, 1991; Redding et al. 1991). Um zu überprüfen, ob diese Ergebnisse auf phytopathogene Pilze übertragbar sind, wurde das KEX2-homologe Protein von *U. maydis* mit eGFP verknüpft und die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zur Herstellung der UMKEX2-eGFP Fusion wurde eine mit flankierenden, gDNA-Bereichen ligierte eGFP-Hygromycin B-Resistenzkassette mittels homologer Rekombination in das 3'-Ende des *umkex2*-Locus integriert und *egfp* dabei in den gleichen Leserahmen mit *umkex2* fusioniert (Abb. 3.27-A). Das daraus resultierende, hybride *umkex2::egfp* Gen stand somit nach wie vor unter der Kontrolle des nativen *umkex2*-Promotors. In mikroskopischen Analysen der UMKEX2-eGFP Reporterstämme konnte eine auf kleine, gleichmäßig über die Zelle verteilte Vesikel beschränkte Fluoreszenz festgestellt werden (Abb. 3.27-B). Diese Vesikel könnten einem Äquivalent des Golgiapparats entsprechen.

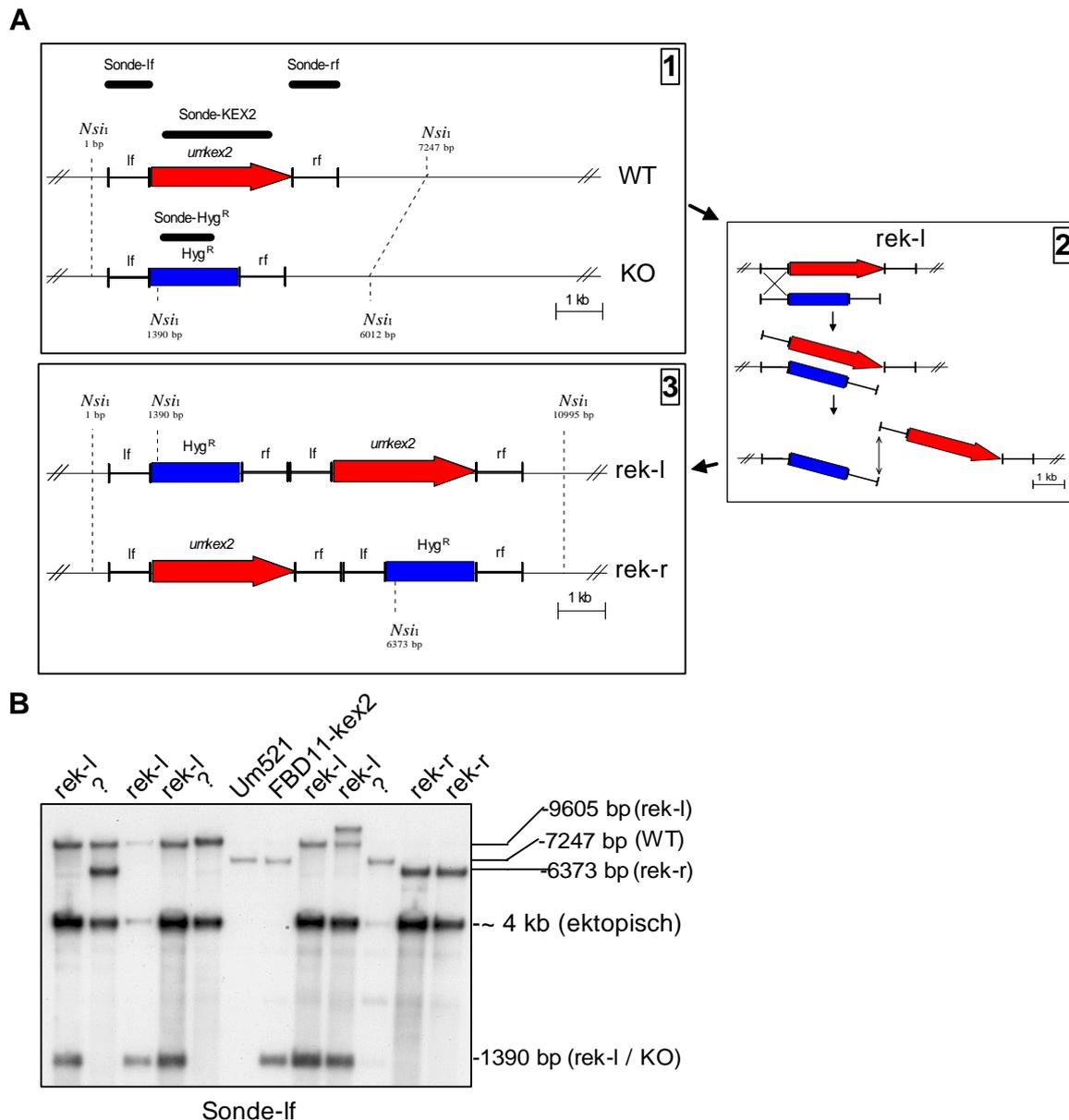


**Abb. 3.27: Schematische Darstellung der Konstruktion von UMKEX2-eGFP Fusionsstämmen und Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von UMKEX2-eGFP. A)** Schematische Darstellung des *umkex2*-Locus vor und nach der homologen Integration der eGFP-Hygomycin B-Fusionskassette. Angegeben sind die für die Integration amplifizierte und an die eGFP-Fusionskassette ligierten flankierenden DNA-Abschnitte. Der Bereich der translationalen Fusion wurde aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert (Fwd: KEX2-GFP-5, Rev: CA123\_rev) und sequenziert. (lf: linke Flanke ;rf: rechte Flanke; T: Nos-Terminator; Hyg<sup>R</sup> Hygomycin B-Resistenzkassette. Die Abbildung ist Maßstabsgetreu. **B)** Intrazelluläre Lokalisation des UMKEX2-eGFP Fusionsproteins. UMKEX2-eGFP akkumuliert in gleichmäßig über die Zelle verteilten Vesikeln, welche dem Vesikelnetzwerk des Golgiapparats zugeordnet werden können.

### 3.5.2.11 *umkex2*, ein essentielles Gen in *U. maydis*

Die Ergebnisse der Lokalisationsstudien, deuteten an, daß *umkex2* in *U. maydis* eine ähnliche biologische Funktion, wie in anderen Pilzen besitzen könnte. Um dies zu überprüfen, wurde versucht den *umkex2*-Locus in den kompatiblen Wildtypstämmen Um521 (*a1 b1*) und Um518 (*a2 b2*) zu deletieren. Hierzu wurde eine Hygomycin B-Resistenzkassette mit ligierten, den *umkex2*-ORF flankierenden DNA-Abschnitten (Abb. 3.x.x ,A-1) in die Stämme Um521 (*a1 b1*) und Um518 (*a2 b2*) transformiert. Ein Austausch des Wildtyplocus konnte

jedoch in insgesamt 60, mittels Ganzzell-PCR und Southern-Analysen überprüften, hygromycinresistenten Transformanten nicht nachgewiesen werden. Die Deletionskassette wurde statt dessen ektopisch in den *umkex2*-Locus oder an anderen Stellen des Genoms integriert, ohne diesen zu ersetzen (Abb. 3.28) Da diese Rekombinationsereignisse eine mögliche essentielle Bedeutung von *umkex2* in Aussicht stellten, wurde als nächstes versucht, das Gen in dem diploiden Stamm FBD11 (*a1 a2, b1 b2*) in einer Kopie zu deletieren, um so, nach sexuellem Rekombinationszyklus *in planta*, mit anschließender Sporens segregation, haploide, *umkex2*-deletierte Nachkommen zu erhalten. Aus der Transformation mit oben beschriebener Deletionskassette ging ein einziger Transformant (FBD11-kex2 (*umkex2*  $\Delta$ kex2)) hervor, bei welchem der Austausch eines *umkex2*-Allels, ohne weitere ektopische Insertionen der Deletionskassette, in Southern-Analysen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.28-B). Nach erfolgter Pflanzeninfektion konnten in zwei daran anschließenden, unabhängigen Segregationsanalysen keine haploiden Nachkommen mit ausgetauschtem *umkex2*-Locus identifiziert werden. So wurden von Vereinzelungsausstrichen der Nachkommen von insgesamt acht Sporen jeweils 10 Sporidienkolonien auf Hygromycin B-Resistenz getestet. Von 80 Sporidien waren 65 Hygromycin B-resistent und lagen so über der statistisch zu erwartenden Anzahl von 50 %. In einem Test auf filamentöses Wachstum, durch Ausstreichen auf aktivkohlehaltiges Festmedium, wurde überprüft, ob es sich bei den resistenten Nachkommen um diploide Stämme handelte. 34 der 65 Stämme bildeten Myzelien aus und waren somit diploid. Aus den übrigen 31 Stämmen wurde genomische DNA isoliert und, unter Verwendung von Sonden des *umkex2*-ORF und des ORFs des Hygromycinresistenzgens, Southern-Analysen zugeführt. Dabei stellte sich heraus, daß auch diese Stämme diploid waren, denn sie besaßen neben dem *umkex2*-Wildtypallel auch eine Kopie der Deletionskassette, welche homolog in den *umkex2*-Locus integriert war (nicht gezeigt). Das Auftreten ausschließlich diploider, Hygromycin B-resistenter Nachkommen könnte auf den Selektionsdruck des putativ essentiellen *umkex2*-Gens zurückzuführen sein. Andererseits wären unvollständige Meiosen, bedingt durch den Verlust eines der *umkex2*-Allele als Ursache für das Ausbleiben haploider, Hygromycin B-resistenter Sporidien denkbar.



**Abb. 3.28: Schematische Darstellung der Konstruktion von *umkex2*-Deletionsstämmen und Southern-Analyse der putativen *umkex2*-Deletionsklone. A-1)** Schematische Darstellung des *umkex2*-Locus vor und nach der theoretisch zu erwartenden homologen Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette. Angegeben sind die für die Integration amplifizierten und an die Hygromycin B Resistenzkassette ligierten flankierenden DNA-Abschnitte (lf: linke Flanke ; rf: rechte Flanke), sowie die Schnittstellenpositionen des für die Southern-Analyse verwendeten Restriktionsenzym (NsiI). Hyg<sup>R</sup>: Hygromycin B-Resistenzkassette; KO: Gendelektion („Knockout“); WT: Wildtyp. Die Abbildung ist maßstabsgetreu. **A-2)** Modell der tatsächlich erfolgten ectopischen Integration der Hygromycin B-Kassette in den *kex2*-Locus. Eine homologe Rekombination erfolgte jeweils nur an einer DNA-Flanke (hier dargestellt für die linke Flanke; rek-l) des *kex2*-Locus. Anschließend wurden die freien DNA-Enden von Reparaturenzymen des Zellkerns aneinanderligiert. **A-3)** Schematische Darstellung der erfolgten ectopischen Integrationen der Hygromycin B-Kassette in den *umkex2*-Locus. Dargestellt sind die beiden möglichen Intergrationen über die linke (rek-l), bzw. rechte (rek-r) DNA-Flanke des *umkex2*-Locus), sowie die Schnittstellenpositionen des für die Southern-Analyse verwendeten Restriktionsenzym (NsiI). **B)** Für Southern-Analysen wurde genomische DNA aus den erhaltenen Transformanten, dem Wildtypstamm Um521 und dem diploiden Stamm FBD11-*kex2* (*umkex2*  $\Delta$ *umkex2*) isoliert und nach NsiI-Restriktion elektrophore-

---

tisch aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte nacheinander mit 4 verschiedenen DIG-dUTP-markierten Sonden: lf (linke Flanke), rf (rechte Flanke), KEX2 (ORF von *umkex2*) und Hyg<sup>R</sup> (ORF des Hygromycingens der Deletionskassette). Das abgebildete Autoradiogramm zeigt die Hybridisierung der linken Flanke. Es konnten die Signale des Wildtyplocus (7247 bp), der jeweils erfolgten ektopischen Insertion der Hygromycin B-Resistenzkassette (rek-l, 9605 bp, 1390 bp; rek-r, 6373 bp), sowie ein zusätzliches, an anderer Stelle im Genom erfolgtes ektopisches Rekombinationsereignis (~ 4 kb) detektiert werden. Durch die Signalmuster der drei anderen Hybridisierungen wurden diese Rekombinationsereignisse bestätigt (nicht gezeigt). Bei den mit Fragezeichen versehenen Transformanten haben noch weitere, ungeklärte Rekombinationen im *umkex2*-Locus stattgefunden.

## 4 Diskussion

Proteinsekretion ist ein elementarer Lebensprozeß in Pilzen. Neben der Ausscheidung von Enzymen und Strukturproteinen, welche der Ernährung, sowie der Abgrenzung gegenüber, bzw. der Interaktion mit der Umwelt dienen, existieren eine Vielzahl sekretierter Proteine, die sowohl für den Übergang in die parasitäre Entwicklungsstufe, als auch für den Befall und das Überleben innerhalb des Wirtes bedeutsam sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue, bisher unbekannte sekretierte Proteine, welche in Bezug zur Pathogenität von *U. maydis* stehen, identifiziert. Um dieses Ziel zu erreichen wurde die biologische Information der zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden genomischen Sequenz in funktionellen Analysen, in Bezug auf die Kodierung sekretierter Proteine, eingegrenzt. Die experimentelle Basis dieser postgenomischen Funktionsanalyse bildeten zwei separate Vorgehensweisen: die Signalpeptidselektion, sowie die bioinformatische Identifizierung von Signalpeptiden.

Unter den 30 aus beiden Genomanalysen gleichsam hervorgegangenen Proteinen, befanden sich die wahrscheinlich an der Zelloberfläche lokalisierten RPH1 und RSP1. Während die jeweilige Einzeldelation der kodierenden Gene, die pathogene Entwicklung nicht beeinflusste, führte die gleichzeitige Deletion zum Vollständigen Verlust der Pathogenität. Das für die Pathogenität von *U. maydis* essentielle Zusammenwirken beider Gene hätte an Hand von konventionellen, genomweiten Insertionsmutagenesen, wie z. B. REMI (Bölker et al., 1995), nicht entdeckt werden können.

Eine signifikante Gemeinsamkeit der beiden zuvor genannten Proteine ist das mehrfache Auftreten von KEX2-ähnlichen Prozessierungsmotiven. Das in *U. maydis* vorhandene *kex2*-homologe Gen *umkex2*, welches zur funktionellen Charakterisierung dieser beiden und weiterer, verwandter Proteine deletiert werden sollte, stellte sich als essentielles Gen heraus.

### 4.1 Der Pathogenitätsbezug identifizierter zellwandassoziierter Proteine

Der pilzlichen Zellwand kommen mit der Aufrechterhaltung der zellulären osmotischen Integrität und als Mediator Entwicklungsstadien abhängiger Morphologiewechsel essentielle Bedeutungen zu. Zudem sind nach außen gerichtete Zellwandstrukturen parasitärer Pilze direkt in die Wechselwirkungen zwischen Pathogen und Wirt involviert und beeinflussen maßgeblich den Zugang zu Nährstoffen und das Überleben innerhalb des Wirtsorganismus. Die Zellwand von *U. maydis* besteht, abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium, zu etwa

2/3 aus neutralen Polysacchariden (zumeist  $\beta$ -Glucanen), und zu gleichen Teilen von ca. 15% aus Chitin und Proteinen (Ruiz-Herrera et al., 1996). Ein Großteil der Zellwandproteine wird glycosiliert und übernimmt eine Reihe unterschiedlicher Funktionen: neben Strukturproteinen wurden Enzyme und Transporter, sowie Proteine, welche der Interaktion mit der Umgebung dienen, beschrieben.

#### 4.1.1 Die UMP Genfamilie

Mit UMP1 (YSST13) konnte ein putatives Zellwandprotein und zu diesem, an Hand von genomweiten Sequenzanalysen, fünf weitere Homologe (UMP2 bis UMP6) in *U. maydis* identifiziert werden. Die Proteinsequenz von UMP1 weist 46 % Identität zu MP88 (Huang et al., 2002), einem Mannoprotein des humanpathogenen Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* auf. Mannoproteine lassen sich nach verschiedenen Gesichtspunkten unterteilen. Ausgehend von ihrer Verknüpfung mit anderen Zellwandkomponenten, werden nicht kovalent, kovalent an Zellwandglucane und über Disulfidbrücken mit anderen Proteinen gebundene Mannoproteine unterschieden (De Nobel und Lipke, 1994; Kapteyn et al. 1999). Eine zweite Einteilung berücksichtigt unterschiedliche Molekulargewichte. Demnach handelt es sich bei den HMWM (High Molecular Weight Mannoproteins), mit Molekulargewichten oberhalb von 200 kD, zumeist um integrale Strukturproteine der Zellwand (Chaffin et al., 1998). Dagegen wurden für Mannoproteine geringen bis mittleren Molekulargewichts neben Struktur-, vielfach Enzymfunktionen beschrieben (Rast et al., 2003).

Während in *U. maydis* fünf UMP1-homologe identifiziert werden konnten, wies die Genomsequenz von *C. neoformans* (Serotyp A) analog drei zu MP88 homologe Proteinsequenzen auf (Cn13011, Cn08299, Cn09362; Abb. 4.1). Weitere signifikante Homologien zu Genbankinträgen anderer Organismen, insbesondere Pilzen, konnten dagegen nicht gefunden werden. Dies deutet auf eine exklusive Stellung dieser Gruppe von Mannoproteinen in pathogenen Basidiomyceten hin. Mit Ausnahme von UMP4, UMP6 und Cn09362 besitzen alle Proteine jeweils serin-/threoninreiche, C-terminale Regionen, welche zahlreiche O-Glycosylierungsmotive beinhalten. Zusätzlich kommen vereinzelt, putative N-Glycosylierungsstellen vor. Für MP88 konnte eine Prozessierung durch Anlagerung von Mannosylresten gezeigt werden (Huang et al., 2002). An Hand von Western-Analysen von GFP-Fusionsproteinen konnten für UMP1 und UMP2 ein im Vergleich zur Primärsequenz fast doppelt so hohes Molekulargewicht festgestellt werden, woraus eine zu MP88 ähnliche Prozessierung geschlossen werden kann. Mit Molekulargewichten von 63 kD, bzw. 68 kD zählen UMP1 und UMP2 zur Klasse der Mannoproteine mittleren bis geringen Molekulargewichts.

UMP1 und UMP2 sind auf Aminosäureebene zu 75 % identisch, während die übrigen UMP-Sequenzen geringere Homologien zu UMP1 aufzeigen (Abb. 4.1). Die abgeleiteten Proteinsequenzen von UMP2 bis UMP6 weisen jeweils eine N-terminale Signalsequenz auf, deren Funktionalität mit Hilfe der Signalpeptidselektion nachgewiesen werden konnte.

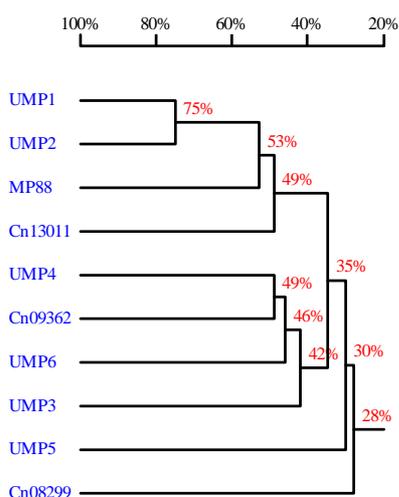
UMP1, -2, -3 und -5 stimmen mit MP88, Cn13011 und Cn08299 in ihren hydrophoben C-Termini überein, welche an vorgelagerten putativen Prozessierungsmotiven durch GPI-Anker ersetzt werden könnten. GPI-verankerte (Glycosyl-phosphatidylinosytol) Proteine treten ubiquitär in eukaryotischen Zellen auf. Die Prozessierung entsprechender Vorstufenproteine wird an der inneren Membran des Endoplasmatischen Retikulums durch einen putativen Transamidasekomplex vorgenommen (Benghezal et al. 1996). Dabei wird der hydrophobe C-Terminus der Primärsequenz an einer vorgelagerten, spezifischen Prozessierungsstelle ( $\omega$ -Motiv) abgespalten und durch den GPI-Anker ersetzt. Das Vorstufenprotein wird dadurch in der ER-Membran verankert und über den sekretorischen Weg zu seinem Bestimmungsort transportiert. In Pilzen sind GPI-Proteine zu einem kleinen Teil in der Plasmamembran verankert, während die Mehrzahl innerhalb der Zellwand lokalisiert ist (Kapteyn et al., 1999). Im letzt genannten Fall wird der GPI-Anker an der Zellmembran um seinen Phospholipidanteil gestutzt (Müller et al. 1996, Jeong et al., 2003) und mit Glucanresten anderer Zellwandkomponenten kovalent verknüpft (Van Der Vaart et al, 1997). Eine Ausnahmestellung nimmt das kürzlich in *Aspergillus fumigatus* beschriebene AFMP2 ein, welches trotz putativer GPI-Prozessierung vornehmlich über die Zellwand hinaus in das extrazelluläre Milieu sezerniert wird (Chong et al., 2004).

MP88 aus *C. neoformans* wurde von Huang et al. (2002) als ein die Immunantwort von T-Zellhybridomen stimulierendes Antigen entdeckt. Dies impliziert zwar keine zwingende Rolle als Virulenz- oder Pathogenitätsfaktor, bedeutet jedoch zumindest, daß MP88 in der äußeren Schicht der Zellwand lokalisiert und gegenüber dem Wirtsorganismus exponiert sein muß. Auf Grund der Sequenz- und Strukturhomologien wäre eine entsprechende subzelluläre Lokalisierung auch für UMP1, -2, -3 und -5 denkbar. In weiterführenden Sequenzanalysen konnten für alle UMP-homologen, wie auch für MP88 keine bekannten Proteindomänen ermittelt werden. Die Ableitung einer möglichen biologischen Funktion dieser Zellwandproteine ist daher an Hand von reinen Sequenzanalysen schwierig.

Die subzelluläre Lokalisation von UMP1 und UMP2 konnte mittels eGFP-Reporterstämmen nicht eindeutig bestimmt werden. UMP1-eGFP wurde für eine fluoreszenzmikroskopische Detektion zu schwach exprimiert, während UMP2-eGFP lediglich bei seiner Passage durch das ER detektiert werden konnte. Zusätzlich akkumulierte in beiden Reporterstämmen nati-

ves eGFP in der Vakuole, was einen weiteren Hinweis auf die mögliche C-terminale Prozessierung von UMP1 und UMP2 ergibt. Genauere Befunde könnten in zukünftigen Experimenten mit Applikationen spezifischer Hemmstoffe der Biosynthese von GPI-Ankern (Santos de Macedo et al., 2003) erhalten werden. In *Candida albicans* konnte die Oberflächenlokalisierung von GPI-Proteinen an Hand von Fusionskonstrukten gezeigt werden, bei denen GFP zwischen die N- und C-Termini der zu charakterisierenden Proteine fusioniert wurde (Mao et al., 2003). Diese Strategie sollte sich auch für *U. maydis* adaptieren lassen.

Da die Pathogenität von *ump1* und *ump2* Deletionsmutanten nicht beeinträchtigt war, scheinen diese Proteine entweder keine Bedeutung in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* zu besitzen oder durch redundante Funktionen anderer Gene ersetzt werden zu können. Aus diesem Grund wurde damit begonnen Doppelmutanten herzustellen, welche zum Abschluß dieser Arbeit jedoch erst in einem Paarungstyp (*Um521Δump1Δump2*) fertiggestellt werden konnten und somit erst in zukünftigen Experimenten auf eine mögliche Rolle in der Pathogenität hin getestet werden können.



**Abb. 4.1: Sequenzidentität der UMP-homologen aus *U. maydis* und *C. neoformans*.** Dendrogramm der Sequenzähnlichkeiten. Die angegebenen Prozentwerte fassen identische und ähnliche Aminosäuren zusammen.

UMP4 und UMP6 unterscheiden sich von den vier UMP-homologen durch abweichende Sequenzeigenschaften. Neben fehlenden Serin-/Threonin-reichen Regionen und putativen GPI-Prozessierungssignalen, finden sich in den C-terminalen Bereichen basische Aminosäuren, welche auf eine proteolytische Prozessierung durch KEX2 hindeuten. Auch die Anzahl putativer O-Glycosilierungsstellen ist stark reduziert, während N-Glycosilierungsmotive ganz fehlen. Auf Grund des Ergebnisses der Signalpeptidselektion kann für beide Proteine somit lediglich eine Überführung in den sekretorischen Weg der Zelle angenommen werden, während zu Lokalisierung und biologischer Funktion keine Hinweise vorliegen.

#### 4.1.2 YSST29, ein integrales Zellwandprotein mit Expansindomäne.

*Ysst29* (UM01513.1) ist in der EST-Bibliothek des diploiden *U. maydis* Stamms FBD12 repräsentiert und wird dem zufolge während der filamentösen Entwicklungsphase exprimiert. Das abgeleitete 736 AS lange Protein weist einen hohen Serinanteil (33%), mit zahlreichen, putativen O-Glycosylierungs- und Phosphorylierungsstellen auf. Tatsächlich konnte für das Protein an Hand von Western-Analysen ein Molekulargewicht ca. 150 kD ermittelt werden, während sich für die Primärsequenz 67 kD errechneten. Darüber hinaus besitzt YSST29 einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren (8 % Aspartat, 3 % Glutamat) und ähnelt damit in seiner Aminosäurezusammensetzung dem extrazellulären, menschlichen Dentin Phosphoprotein (DPP) aus der Dentinmatrix von Odontoblasten (Gu et al., 2000). YSST29 konnte an Hand der Analyse von YSST29-eGFP Reporterstämmen als integrales Zellwandprotein identifiziert werden. Interessanterweise besitzt das Protein zusätzlich eine C-terminale Domäne von 96 AS, welche 36 % Identität und 49 % Ähnlichkeit zu Expansinen aus *Malus domestica* (Wakasa et al., 2003) und anderen Höheren Pflanzen aufweist. Expansine wurden ursprünglich von Cosgrove (2000) als sekretierte Zellwandproteine in Gurkenpflanzen identifiziert. Die Expression dieser Proteine wird in sich im Streckungswachstum befindlichen Pflanzenzellen und auch während der Fruchtreife induziert. Man vermutet, daß Expansine nicht kovalente Bindungen zwischen Zellwandpolysacchariden lösen und somit eine druckvermittelte Ausdehnung der Zellwand ermöglichen. Neben ihrer Funktion im pflanzlichen Streckungswachstum wird für Expansine auch eine Beteiligung an anderen morphogenetischen Prozessen diskutiert (Lee et al., 2001, Cosgrove et al., 2002; Li et al., 2003). Auch in Pilzen konnten expansinähnliche Proteine mit cellulosezersetzender Aktivität identifiziert werden (Yuan et al., 2001; Saloheimo et al., 2002).

In fluoreszenzmikroskopischen Analysen von GFP-Reporterstämmen konnte YSST29-GFP in apikalen, sich erweiternden Zellwandbereichen lokalisiert werden. Damit könnte YSST29 in *U. maydis* eine zu Höheren Pflanzen analoge zellwandmodifizierende Funktion und somit eine mögliche Bedeutung für das polare Hyphenwachstum, welches eng mit der pathogenen Entwicklung filamentöser Pilze verknüpft ist, besitzen. Neben der Modifikation der eigenen Zellwand könnte YSST29 auch als Virulenzfaktor, welcher Cellulosestrukturen pflanzlicher Zellwände angreift, fungieren. Diese Überlegung ergibt sich insbesondere aus der Proteinstruktur von YSST29. Während pflanzliche Expansine mit 25 – 27 kD eine geringe Molekülgröße aufweisen (Cosgrove et al., 2002) und dadurch in der Zellwand frei beweglich sind, könnte YSST29 zum überwiegenden Teil in der Zellwand von *U. maydis* verankert und der expansinähnliche C-Terminus zur Kontaktfläche zwischen Pilz und Pflanze exponiert sein. *ysst29* Nullmutanten zeigten sich jedoch weder in Wachstum und Morphologie, noch in der pathogenen Entwicklung gegenüber dem Wildtyp beeinträchtigt. Obwohl in *U. maydis* keine

weiteren Kopien von *yss29* existieren, könnte seine Deletion durch redundante Funktionen anderer Gene kompensiert werden. Durch genomweite Sequenzanalysen konnten insgesamt sechs weitere Gene identifiziert werden (UM03212, UM05495, UM00567, UM01213, UM00250 und UM02981), deren abgeleitete Proteine in Teilregionen Homologien zur Expansindomäne von YSST29 aufzeigen und zusätzlich eine mögliche Signalsequenz besitzen. Die funktionelle Redundanz expansin homologer Gene in Pilzen wurde auch von Saloheimo et al. (2002) als Ursache für die Kompensation der Deletion des expansin homologen Gens *swo1* in *Trichoderma reesei* angenommen.

#### 4.1.3 GLO1, eine ungewöhnliche Glyoxaloxidase mit Transmembran- und cytosolischer Domäne

*Glo1* (Genbank Acc.-Nr. AJ550625) weist signifikante Homologie zu den Glyoxaloxidasegenen *glx1* und *glx2* (Kersten und Kirk, 1987) des ligninzersetzenden Wurzelpilzes *Phanerochaete chrysosporium* auf. Das Gen wurde im Rahmen einer systematischen Insertionsmutagenese in der Arbeitsgruppe Kahmann entdeckt und in der Arbeitsgruppe Schreier eingehender charakterisiert. Da *glo1* für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* essentiell ist und im Rahmen der genomweiten Sequenzanalyse dieser Arbeit als putatives sekretorisches Protein identifiziert werden konnte, wurde das Protein bezüglich seiner subzellulären Lokalisation eingehender charakterisiert. So konnte an Hand von GFP-Reporterstämmen eine Lokalisierung in der Plasmamembran ermittelt werden, wobei Glo1-GFP vornehmlich in Bereichen an denen die Zellwand Strukturänderungen unterlag akkumulierte. Hierzu zählten apikale Regionen junger Tochterzellen, sowie neu gebildete Zellwandsepten. Dieses Ergebnis korreliert mit enzymatischen Aktivitätstests, bei denen die Hauptenzymaktivität, an Hand der Oxidation von Methylglyoxal und kurzkettigen Aldehyden zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in Membranfraktionen aufgeschlossener Sporidien nachgewiesen werden konnte. Neben der in Glyoxaloxidasen konservierten katalytischen Domäne beinhaltet die 862 AS umfassende Proteinsequenz von GLO1 12 putative N-Glycosylierungsstellen, während O-Glycosylierungsmotive fehlen. Das in Western-Analysen bestimmte Molekulargewicht war mit ca. 93 kD gegenüber der Primärsequenz nicht erhöht, obwohl Vorstufenproteine an N-Glycosylierungsstellen, während der Passage durch ER und Golgi, in der Regel durch Anlagerung langkettiger, verzweigter Polysaccharidketten prozessiert werden (Cutler, 2001). Interessanterweise akkumulierten GFP-Fusionen aus C-terminal deletierten Verkürzungsklonen, welche lediglich die ersten 300 AS von GLO1 enthielten, in Cytosol und Zellkern. Da sich der N-Terminus von GLO1 in der Signalpeptidselektion darüber hinaus als äußerst ineffektive Signalsequenz erwies, könnte das Protein in vivo auf einer zu ER und Golgi alternativen Route an seinen Zielort dirigiert werden. Tatsächlich ist der hydrophobe Abschnitt des putativen Signalpeptids durch zwei aufeinander folgende Arginine (R9, R10) unterbrochen. Diese Teilsequenz zeigt starke Ähnlich-

keit zu prokaryotischen TAT-Motiven (twin-arginin translocation), welche in Prokaryonten eine alternative Translokation von gefalteten Proteinen durch die Plasmamembran vermitteln (Berks et al., 2004). Das Vorkommen eines TAT-ähnlichen Translokationskomplexes ist in Eukaryonten jedoch bisher nicht bekannt. Der extrazelluläre, sich über 631 AS erstreckende homologe Sequenzbereich, beinhaltet die katalytische Domäne und wird durch eine Transmembrandomäne an Position 670 vom hydrophilen, cytosolischen C-Terminus getrennt. Während GLX1 und GLX2 *in vivo* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für extrazelluläre, oxidative Prozesse ligninlysierender Peroxidasen bereitstellen (Kersten et al., 1990), ist die genaue biologische Funktion von *Glo1*, zumal in der Wirtspflanze *Zea mays* keine ligninhaltigen Strukturen anzutreffen sind, weitgehend unbekannt. *Glo1*-defiziente Sporiden weisen eine stark veränderte Zellwandmorphologie auf und sind in Kreuzungstests auf aktivkohlehaltigem Festmedium nicht mehr zu filamentösem Wachstum befähigt. Zusammen mit der ermittelten subzellulären Lokalisation implizieren diese Befunde, daß GLO1 wichtige Funktionen während der wachstums- und zellteilungsbedingten Strukturänderung der Zellwand zukommen.

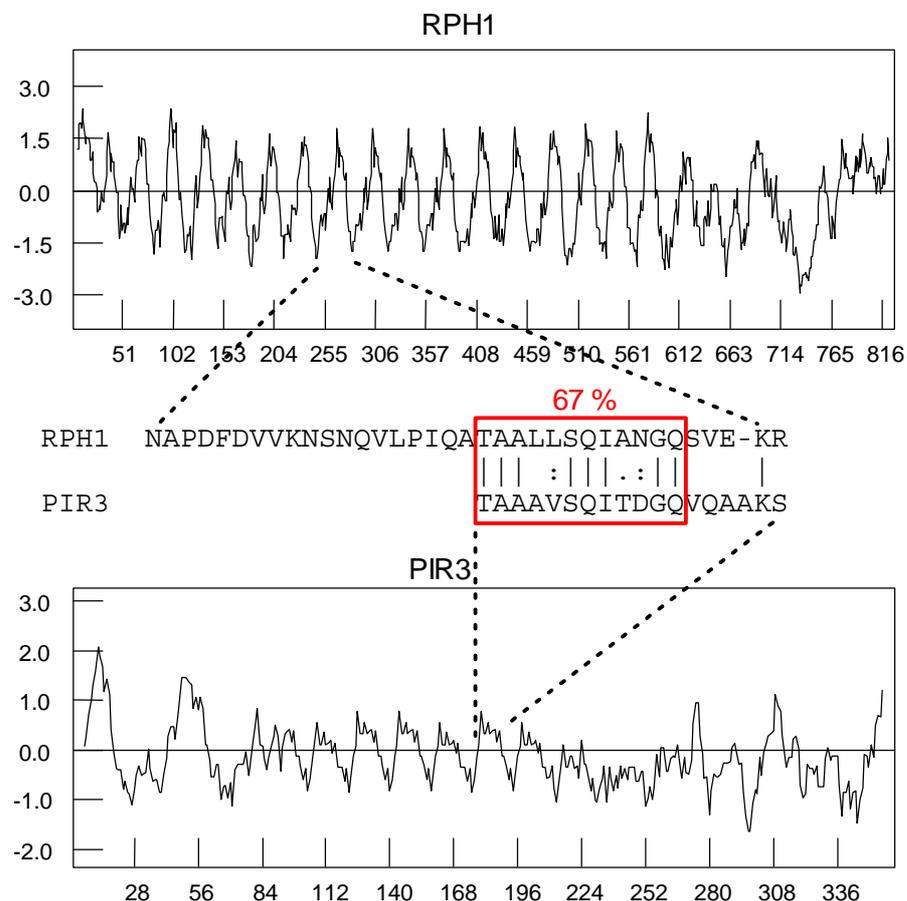
Neben *glo1* existieren in *U. maydis* zwei weitere homologe Glyoxaloxidasegene (*glo2*, *glo3*), wobei GLO1, auf Grund des cytosolischen C-Terminus, mit vorgelagerter Transmembrandomäne, auch in Vergleich mit Glyoxaloxidasen anderer Organismen, eine Sonderstellung einnimmt. Die Deletionen von *glo2* und *glo3* haben keinen Einfluß auf die Pathogenität, womit diese Gene wahrscheinlich andere Funktionen in *U. maydis* ausüben. Die 652 Aminosäure umfassende Peptidsequenz von GLO3 weist drei O- und acht putative N-Glycosylierungsmotive, sowie eine mögliche C-terminale GPI-Prozessierungsstelle auf. Darüber hinaus erwies sich der N-Terminus in der Signalpeptidselektion als effektive Signalsequenz. Demnach könnte es sich bei GLO3 um ein integrales Zellwandprotein handeln, welches zudem in oxidative Prozesse involviert ist. Das für GLO2 (625 AS) *in silico* vorhergesagte Signalpeptid konnte in der Signalpeptidselektion ein nur schwaches Sekretionssignal vermitteln. Zudem besitzt die Proteinsequenz nur eine einzige putative N-Glycosylierungsstelle, während O-Glycosylierungsmotive nicht auftreten. Demnach könnte GLO2 in anderen Zellkompartimenten lokalisiert sein.

## 4.2 Repetitive Oberflächenproteine sind für die pathogene Entwicklung essentiell.

Mit REP1, HUM2, RPH1, RSP1 und RSP2 konnten zwei bekannte und drei putative, bisher unbeschriebene Proteine der Zellwandoberfläche detektiert werden. Dabei waren das Repellentprotein REP1 (YSST101; Wösten et al., 1996), das Hydrophobin HUM2 (YSST11; Bohlmann, 1994), RPH1 (YSST46) und RSP1 (YSST142) aus der Signalpeptidselektion hervorgegangen, während RSP2 mit bioinformatischen Methoden identifiziert wurde. Obwohl



HUM2, könnte auf eine Genduplikation von *hum2* zurückzuführen sein, welche im Laufe der Evolution stattgefunden hat. Genduplikationen werden als evolutionärer Mechanismus angesehen, welche die Toleranz eines Organismus gegenüber Mutationen oder Verlusten von Genen erhöht (Gu et al., 2003; Conant und Wagner, 2004). Darüber hinaus bilden Genduplikationen die entscheidende Voraussetzung für die Diversifizierung von Genen und Organismen (Taylor und Raes, 2004). Das duplizierte *hum2*-Gen könnte anschließend durch ungleiches *crossing over* mit einem *rph1*-Vorläufer fusioniert sein. Der evolutionäre Vorteil dieser Fusion läge in der vereinfachten Koregulation der Expression funktionell verknüpfter Gene (Snel et al., 2000). Tatsächlich ist für *rep1* und *hum2* eine gleichermaßen filamentspezifisch induzierte Expression bekannt (Bohlmann, 1994; Wösten et al., 1996). Andererseits könnte *rhp1* dupliziert worden, und *rep1* und *hum2* durch Separation zweier Genabschnitte aus einem der Duplikate hervorgegangen sein. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, daß REP1 und RPH1 auf Sequenzebene keine Übereinstimmungen aufweisen.



**Abb. 4.4: Vergleich der repetitiven Teilsequenzen von RPH1 und PIR3.** Dargestellt sind die Hydrathieprofile beider Proteine, deren interne Sequenzwiederholungen als alternierende, amphipathische Abschnitte in Erscheinung treten und sich in Teilsequenzen bis zu 67 % ähnlich sind.

Hinweise für die evolutive Entstehung von *rph1* ergeben sich aus Sequenzvergleichen mit den PIR-Genen (protein with internal repeats) aus *S. cerevisiae*. Bei PIR1-3 handelt es sich

um drei eng verwandte, kovalent mit der Zellwand verknüpfte Matrixproteine, (Toh-e et al., 1993), welche neben amphipathischen Sequenzwiederholungen in einem zu diesem repetitiven Bereich nicht homologen, cysteinreichen und amphipathischen C-Terminus mit RPH1 übereinstimmen. Die Aminosäuresequenzen der PIR-Wiederholungen sind darüber hinaus auf einer Länge von 12 AS bis zu 67 % mit Teilbereichen einiger Wiederholungen von RPH1 identisch (Abb. 4.4). Es wäre demnach möglich, daß sich *rph1*, mit einhergehender segmentaler Duplikation des repetitiven Genabschnitts, aus einem PIR-ähnlichen Vorläufer entwickelt hat. Als Unterschiede zwischen den PIR-Proteinen und RPH1 sind die ca. zweifach kürzeren Proteinsequenzen, mit weniger Wiederholungen (7-10) von jeweils geringerer Aminosäurezahl (18-19 AS), zu verzeichnen. Des Weiteren werden die Sequenzwiederholungen der PIR-Proteine nicht durch KEX2-ähnliche Bindungsmotive separiert und prozessiert. Auch die C-terminalen Bereiche sind zu der Hydrophobindomäne von RPH1 nicht homolog und weisen lediglich in ihrem amphipathischen Profil Übereinstimmungen auf. Die Sequenzwiederholungen der PIR-Proteine dienen der Verankerung mit der Zellwand. Darüber wurde PIR2 in Hefe als Hitzeschockprotein beschrieben (Castillo et al., 2003).

Während aus der Homologie des RPH1-C-Terminus eine Hydrophobinfunktion geschlossen werden kann, ist die biologische Funktion der repetitiven Domäne unklar. Lufthyphen gekreuzter kompatibler *rep1*-Deletionsmutanten sind, als Folge eines weitgehenden Verlustes der Oberflächenhydrophobizität, in Wachstum und Entwicklung stark beeinträchtigt (Wösten et al., 1996, vgl. Einleitung), wohingegen dieser Phänotyp bei *rhp1*-defizienten Stämmen nicht beobachtet werden kann. Hiermit korrelieren die Sequenzunterschiede beider Proteine (s. o.), und es kann somit eine funktionelle Redundanz beider Gene ausgeschlossen werden. Auch eine funktionelle Interaktion von *rph1* und *rep1* ist nicht wahrscheinlich, da sich kompatible Stämme mit Doppeldeletionen beider Gene bezüglich Ausbildung und Oberflächenhydrophobizität von Lufthyphen nicht von *rep1*-Enzeldelationen unterscheiden: das Hyphenwachstum ist nach wie vor stark beeinträchtigt aber nicht vollständig unterbunden. Darüber hinaus sind *rep1-rhp1*-Nullmutanten, wie auch Mutanten mit entsprechenden Einzeldelationen, in ihrer pathogenen Entwicklung nicht beeinträchtigt.

Bei RSP1 und RSP2 handelt es sich um zwei weitere sekretorische Proteine, mit internen Wiederholungen, welche von KEX2-ähnlichen Prozessierungsstellen getrennt werden. Das mehrfach in Rsp1 auftretende, die repetitiven Sequenzabschnitte separierende, LKKR-Motiv wurde von Wösten et al. (1996) als funktionales Prozessierungsmotiv beschrieben, während über eine Prozessierung der in RSP2 vorkommenden SYKR-Motive nur spekuliert werden kann. Somit könnten aus den Vorstufen beider Proteine, nach Prozessierung, 11 (RSP1) bzw. 12 (RSP2) kurze Peptide von mehrheitlich 19 AS freigesetzt und sekretiert werden. Im

Gegensatz zu REP1 und RPH1 sind diese Peptide jedoch nicht amphipatisch, und weisen statt dessen ein im neutralen bis hydrophilen Bereich schwach alternierendes Hydrophathieprofil auf.

Während die Einzeldelationen von *rhp1* und *rsp1* bezüglich Morphologie, Wachstum und pathogener Entwicklung keine Beeinträchtigung gegenüber dem Wildtyp aufwiesen, führt das Ausschalten beider Gene zum vollständigen Verlust der Pathogenität. Somit scheinen die Produkte beider Gene funktionell zu interagieren oder redundante Virulenzfunktionen zu besitzen, deren gleichzeitiger Verlust von *U. maydis* nicht kompensiert werden kann. Eine detaillierte Funktionsanalyse beider Proteine müßte zunächst in einem funktionellen der Nachweis der putativen KEX2-Prozessierungsmotive bestehen. Hierzu könnte das von Kim et al. (2002) in Hefe etablierte System zur Detektion spezifischer KEX2-Prozessierungsstellen auf *U. maydis* adaptiert werden. Sollten RPH1 und RSP1 nicht prozessiert werden, so könnten es sich bei beiden um Oberflächenproteine der Zellwand handeln

Es könnte sich bei RHP1 und RSP1 um Oberflächenpeptide handeln, welche die invasiven Hyphen der Erkennung durch die Pflanze entziehen. So wurden auch in Pathogenen, wie Plasmodium repetitive Oberflächenproteine beschrieben, die in diesem Organismus einen Pathogenitätsbezug besitzen (Topolska et al., 2004). Das Beispiel RHP1 / RSP1 belegt, daß filamentöses Wachstum zwar eine Voraussetzung, nicht aber das alleinige Kriterium für Pathogenität in *U. maydis* bildet.

### 4.3 Das Endoproteinasegen *umkex2* ist in *U. maydis* essentiell.

Für eine funktionelle Analyse der KEX2-ähnlichen Prozessierungsmotive, der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Proteine, sollten *umkex2*-defiziente Stämme generiert werden. Eine Deletion von *umkex2* war in den haploiden Stämmen Um521 und Um518 jedoch nicht möglich. Statt dessen integrierte die Deletionskassette in den 5'-, bzw. 3'-flankierenden Bereichen des *umkex2*-Locus ohne diesen zu ersetzen. Somit verlief in Southern-Analysen das Signal einer *umkex2*-ORF Sonde oberhalb des Wildtyplocus. In dem diploiden Stamm FBD11 war die Deletion einer Genkopie von *umkex2* zwar möglich, in einer Segregationsanalyse konnten, nach einmaligem Durchlaufen des infektiösen Entwicklungsabschnitts, jedoch keine haploiden, *umkex2*-defiziente Sporidien detektiert werden. Da ähnliche Beobachtungen bei anderen in dieser Arbeit hergestellten Gendelationen nicht angestellt werden konnten, scheint es sich bei *umkex2* um ein in *U. maydis* essentielles Gen zu handeln, dessen Deletion einen Selektionsdruck auf dieses Rekombinationsereignis auszuüben scheint. Durch den Verlust von UMKEX2 scheinen in *U. maydis* demnach mittelbar die Expression der Produkte anderer, möglicherweise essentieller Gene beeinträchtigt zu sein.

KEX2 (Kexin; EC 3.4.21.61) ist eine wichtige Komponente der posttranslationalen Prozessierung und Aktivierung von Vorstufenproteinen, innerhalb des späten sekretorischen Weges. und wurde ursprünglich als Produkt von *kex2* („killer toxin expression“) in *S. cerevisiae* beschrieben (Julius et al., 1983; Fuller et al., 1989). Seine physiologische Rolle wurde durch genetische Komplementationsanalysen von *kex2*-defizienten Hefestämmen, bei denen Defekte in der Produktion reifer  $\alpha$ -Hormonfaktoren und viraler „Killer Toxine“ auftraten, aufgedeckt (Fuller et al., 1988). Als membranständige Dipeptidylaminopeptidase spaltet das Enzym spezifisch hinter kurzen basischen Peptidmotiven, welche vornehmlich in den Aminosäuren Lysin-Arginin (KR) oder Arginin-Arginin (RR) enden. KEX2-homologe Proteine wurden bisher in Pilzen, Säugern und Drosophila nicht aber in Pflanzen identifiziert. So wurden auch für *U. maydis* KEX2-ähnliche Prozessierungsschritte, die zur Freisetzung kleinerer, biologisch funktionaler Peptide aus Vorstufenproteinen führten, beschrieben (Park et al., 1994; Wösten et al., 1996). Auf Grund der Vielzahl möglicher Prozessierungsziele, welche den des sekretorischen Transportweg passieren, wäre somit auch eine Beteiligung von *umkex2* an der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* denkbar. Diese Vermutung wird zusätzlich durch die im Ergebnisteil dieser Arbeit vorgestellten repetitiven Proteine bekräftigt, deren Pathogenitätsbezug im Falle *RPH1* und *RSP1* demonstriert wurde.

Die in dieser Arbeit vorgenommene Eingrenzung der biologischen Information der genomischen Sequenz, in Bezug auf die Kodierung sekretierte Proteine, und deren weitere bioinformatische Charakterisierung erwies sich somit als wirkungsvolles Kriterium zur Aufspürung von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren in *U. maydis* und wäre in dieser Form, unter Anwendung konventioneller, funktioneller Genomanalysen nicht möglich gewesen.

## 5 Zusammenfassung

Unter der Vielzahl pilzlicher Moleküle und Faktoren, die sowohl für den Übergang in die parasitäre Phase, als auch für den Befall und das Überleben innerhalb der Wirtspflanze von Bedeutung sind, spielen sekretierte Proteine eine entscheidende Rolle. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung bisher unbekannter, sekretierter Proteine mit Bezug zur Pathogenität in *U. maydis* und konnte, unter Durchführung experimenteller und bioinformatischer, funktioneller Genomanalysen, erreicht werden. Hierzu wurde eine durch zufällige Fragmentierung hergestellte, genomische DNA-Bibliothek mit Hilfe der Signalpeptidselektion in Hefe durchsucht. Dadurch konnten 30 Proteine, mit einer in Hefe funktionalen Signalsequenz, identifiziert werden. Aus der bioinformatischen Analyse der nahezu vollständig vorliegenden genomischen Sequenz gingen 1055 mögliche Proteine mit Signalpeptiden hervor. Aus übereinstimmenden Ergebnissen der experimentellen und bioinformatischen Genomanalysen wurden mit der Zellwand assoziierte Proteine und Oberflächenproteine, welche in direkte Wechselwirkung mit dem Wirtsorganismus treten könnten, eingehender charakterisiert. Hierzu wurden die subzelluläre Lokalisation an Hand von GFP-Reporterstämmen, sowie die Bedeutung für die Pathogenität durch Gendeletionen untersucht. Die sechs Genprodukte der *ump*-Familie sind zu einem immunoreaktiven Mannoprotein der Zellwand von *C. neoformans* homolog. Die Deletionen von *ump1* und *ump2* hatten keinen Einfluß auf die Pathogenität. Auch die Deletion des expansinähnlichen, in sich erweiternden Zellwandbereichen lokalisierten YSST29 beeinträchtigte die pathogene Entwicklung nicht. Mit RPH1, RSP1 und RSP2 konnten wahrscheinlich mit der Zellwandoberfläche assoziierte Proteine, welche interne, durch KEX2-ähnliche Prozessierungsmotive getrennte Sequenzwiederholungen aufweisen, identifiziert werden. Der repetitive, mit dem Repellentprotein REP1 verwandte Sequenzabschnitt des bifunktionalen RPH1 wird durch Prozessierung von einer C-terminalen Hydrophobindomäne, welche nach der Sekretion an der Zellwandoberfläche lokalisiert, getrennt. Die gleichzeitige Deletion von *rph1* und *rsp1* führte zu einem vollständigen Verlust der Pathogenität. Das Gen der in golgiähnlichen Vesikeln lokalisierten Endoprotease UMKEX2, welche an der Prozessierung von Vorstufenproteinen beteiligt ist, erwies sich als ein in *U. maydis* essentielles Gen.

Die Eingrenzung der biologischen Information der genomischen Sequenz, in Bezug auf die Kodierung sekretierter Proteine, erwies sich somit als wirkungsvolles Kriterium zur Aufspürung von Pathogenitätsfaktoren in *U. maydis* und eröffnet neue Perspektiven für die postgenomische Analyse pathogener Pilze.

## 6 Abstract

Among fungal molecules and factors secreted proteins play an important roll in transition to the pathogenic stage as well as for infection and survival inside the host. This work was aimed to the detection of unknown secreted and pathogen related proteins in *U. maydis* by use of experimental and bioinformatic functional genomics. Therefore a randomly fragmented genomic library was constructed and screened in a signal sequence trap approach leading to the identification of 30 proteins with functional signal peptides in yeast. The bioinformatic approach derived 1055 putative proteins containing signal sequences. From matching results of experimental and bioinformatic analysis cell wall associated and surface proteins which could be involved in host pathogen interactions were chosen for further characterizations. This was done by the analysis of GFP-reporter strains and gene deletions. The six members of the *ump*-gene family are homologous to MP88 a immunoreactive mannoprotein of *C. neoformans*. The gene deletion of *ump1* and *ump2* had no influence of pathogenicity. Deletion of *ysst29* a expansin-like protein which is located to extending regions of the cell wall resulted in no reduction of pathogenic development as well. RPH1, RSP1 and RSP2 were identified as putative surface proteins containing internal repeats with are separated by KEX2-like cleavage sites. The hydrophobin-like C-terminal Domain of RPH1 is cleaved off the repetitive repellent-like region and is located to the cell surface after secretion. The double deletion of *rph1* and *rsp1* resulted in the complete loss of pathogenicity. UMKEX2 which is putatively involved in processing of protein precursors is located to golgi-like vesicles and revealed to be essential in *U. maydis*.

Filtration of biologic information provided by the genomic sequence regarding to secreted proteins revealed to be a powerful method to identify pathogen related proteins in *U. maydis* and opens new perspectives for post genomic analyses of pathogenic fungi.

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Strukl, K.** (1987) Current protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons, Inc.*, USA.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. und Miyano, S.** (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**(2), 298-305.
- Banuett, F.** (1991). Identification of genes governing filamentous growth and tumor induction by the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3922-3926.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F.** (2002) Pathogenic Development in *Ustilago maydis*: a progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. In Osiewacz, H. (ed.), *Molecular Biology of Fungal Development*, 399-418.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1989) Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1994) Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycology* **18**, 247-266.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Benghezal, M., Benachour, A., Rusconi, Aebi, M. und Conzelmann, A.** (1996) Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J.* **15**, 6575–6583.
- Berks, B. C., Palmer, T., Sargent, F.** (2003) The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv Microb Physiol.* **47**, 187-254.
- Bohlmann, R.** (1996) Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R.** (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bölker, M., Bohnert, H. U., Braun, K. H., Gorl, J. und Kahmann, R.** (1995). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol. Gen. Genet.* **248**, 547-52.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. und Kahmann, R.** (1995) Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- Börner, H.** (1997) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. *Eugen Ulmer Verlag*, Stuttgart.
- Brachmann, A., König, J. und Feldbrügge, M.** (2003) Genome-based strategy for the generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*.
- Castillo, L., Martinez, A. I., Garcera, A., Elorza, M. V., Valentin, E. und Sentandreu, R.** (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of

- Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan. *Yeast* **20**(11) 973-83.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. und Martinez, J. P.** (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**(1), 130-180.
- Chong, K. T., Woo, P. C., Lau, S. K., Huang, Y. und Yuen, K. Y.** (2004) AFMP2 encodes a novel immunogenic protein of the antigenic mannoprotein superfamily in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* **42**(5), 2287-2291.
- Christensen, J. J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Conant, G. C. und Wagner, A.** (2004) Duplicate genes and robustness to transient gene knock-downs in *Caenorhabditis elegans*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **271**, 89-96.
- Cosgrove, D. J.** (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321-326.
- Cosgrove, D. J., Li, L.C., Cho, H. T., Hoffmann-Benning, S., Moore, R. C., Blecker, D.** (2002) The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol.* **43**(12), 1436-1444.
- Cutler, J. E.** (2001) N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol.* **39** Suppl 1, 75-86.
- Day, P. R., Anagnostakis, S. L.** (1971) Corn smut dikaryon in culture. *Nature* **231**, 19-20.
- De La Fuente, G. und Sols, A.** (1962) Transport of sugars in yeast. *Biochem. Biophys. Acta* **56**, 49-62.
- De Nobel, H. und Lipke, P. N.** (1994) Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly? *Trends Cell Biol* **4**, 42-46.
- Esser, K.** (1976) Kryptogamen. *Springer-Verlag, Berlin*.
- Eddy, S. R.** (1995) Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 114-120.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005-1016.
- Franzusoff, A. und Schekman, R.** (1990). Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the *sec7* mutation. *EMBO J.* **8**, 2695-2702.
- Fuller, R. S., Sterne, R. E. und Thorner, J.** (1988) Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu. Rev. Physiol.* **50**, 345-362.
- Fuller, R. S., Brake, A. und Thorner, J.** (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **246**, 482-486.
- Galliciotti, G., Schneider, H., Wyder, L., Vitaliti, A, Wittmer, M., Ajmo, M. und Klemenz, R.** (2001) Signal-sequence trap in mammalian and yeast cells: a comparison. *J. Membrane Biol.* **183**, 175-182.

- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Goo J. H., Park A. R., Park W. J., Park, O. K.** (1999) Selection of *Arabidopsis* genes encoding secreted and plasma membrane proteins. *Plant Mol Biol.* **41**(3), 415-23.
- Gow, N. A. R.** (1994) Growth and guidance of the fungal hypha. *Microbiology* **140**, 3193-205.
- Gozalbo, D., Elorza, M. V., Sanjuan, R., Marcilla, A., Valentin, E. und Sentandreu, R.** (1993) Critical steps in fungal cell wall synthesis: strategies for their inhibition. *Pharmac. Ther.* **60**, 337-345.
- Gupta, R., Jung E. und Brunak, S.** (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
- Gu, K., Chang S., Ritchie, H. H., Clarkson, B. H., Rutherford, R.B.** (2000) Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. *Eur J Oral Sci.* **108**(1), 35-42.
- Gu, Z., Steinmetz, L. M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R. W., Li, W. H.** (2003) Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* **421**, 63-66.
- Hamer, J. E., Howard, R. J., Chumley, F. G., Valent, B.** (1988) A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* **239**, 288–90.
- Hennig, L.** (1999) WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of amino acid sequences. *BioTechniques* **26**, 1170-1172.
- Heringa, J.** (1999) Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**, 341-364.
- Hoch, H. C., Staples, R. C.** (1991) Signaling for infection structure formation in fungi. In *Fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Edited by Cole, G.T., Hoch, H. C. New York: *Plenum Press* 25-46.
- Hoffmann, C. S. und Winston, F.** (1987). A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation in *E.coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holliday, R.** (1961) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**, 204-230.
- Holliday, R.** (1974) *Ustilago maydis*. In King, R. C. (ed.), *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York, USA, **Vol. 1**, 575-595.
- Howard R.J., Ferrari M.A., Roach, D.H., Money, N. P.** (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11281–84.
- Huang, C., Nong, S., Mansour, M. K., Specht, C. A. und Levitz, S. M.** (2002) Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. *Infec. and Immun.* **Okt.**, 5485-5493.
- Hulder, G. W.** (1998) *Magical Mushrooms, Mischievous Molds*. *Princeton University Press*, Princeton.

- Jeong, H. Y., Kim, H., Han, D. M., Jahng, K. Y. und Chae, K. S.** (2003) Expression of the *mnpA* gene that encodes the mannoprotein of *Aspergillus nidulans* is dependent on *fadA* and *.bA* as well as *veA*. *Fungal Genetics and Biology* **38**, 228-236.
- Jones, E. B. G.** (1994) Fungal adhesion. *Mycol. Res.* **98**, 961-81.
- Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R. und Brunak, S.** Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. Eingereicht in *Glycobiology*.
- Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G. und Thorner, J.** (1983). Yeast alpha factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* **32**, 839-852.
- Kahmann, R. G. S., Basse, C., Feldbrügge, M. und Kämper, J.** (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In Kronstad, J.W. (ed.) *Fungal Pathology*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht.
- Kaiser, C. A., Preuss, D., Grisafi, P. und Bostein, D.** (1987) Many random sequences functionally replace the secretion signal of yeast invertase. *Science* **235**, 312-317.
- Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. und Klis, F. M.** (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 373-383.
- Kawashima, S. und Kanehisa, M.** (2000). AAindex: Amino Acid index database. *Nucleic Acids Res.* **28**(1), 374.
- Kim, S. Y., Park, D., Oh, M., Sellamuthu, S. und Park, W. J.** (2002) Detection of site-specific proteolysis in secretory pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**, 419-424.
- Klein, R. D., Gu, Q., Goddard, A. und Rosenthal, A.** (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7108-7113.
- Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. S., Flaishman, M. A.** (1995) Surface signaling in pathogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* **92**, 4080-4087.
- Kronegg, J. und Buloz, D.** (1999), Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI), <http://129.194.185.165/dgpi/>
- Kyte, J. und Doolittle, R. F.** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Lee Y, Choi D, Kende H.** (2001) Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol.* **4**(6), 527-532.
- Li, Y., Jones, L., McQueen-Mason, S.** (2003) Expansins and cell growth. *Curr Opin Plant Biol.* **6**(6), 603-610.
- Mao, Y., Zhang, Z., Wong, B.** (2003) Use of green fluorescent protein fusions to analyse the N- and C-terminal signal peptides of GPI-anchored cell wall proteins in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **50**(5), 1617-1628.
- Mendgen, K. und Deising, H.** (1993) Infection structures of fungal plant pathogens -a cytological and physiological evaluation. *New Phytol.* **124**, 193-213

- Mendgen, K., Hahn M., und Deising, H.** (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 367–86
- Müller, E. und Loeffler, W.** (1992) Mykologie. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York.*
- Müller, G., Gross, E., Wied, S. and Bandlow, W.** (1996) Glucose-induced sequential processing of a glycosylphosphatidylinositol-anchored ectoprotein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 442–456.
- Nicholson, R. L.** (1996) Adhesion of fungal propagules. In *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions*, ed. M Nicole, V Gianinazzi-Pearson, 117–34. Amsterdam: Kluwer
- Nicholson, R. L., Epstein, L.** (1991) Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. ed. GT Cole, HC Hoch, 3–23. New York: Plenum
- Ng, D. T., Brown, J. D. und Walter, P.** (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* **134**, 269–278.
- Ozcan, S. und Johnston, M.** (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 554-569
- Podila, G. K., Rogers, L. M., Kolattukudy, P. E.** (1993) Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol* **103**, 1267-1272.
- Rapoport, T. A.** (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**, 931–936
- Rast D. M., Baumgartner, D., Mayer, C., Hollenstein, G. O.** (2003) Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* **64**(2), 339-366.
- Read, N. D., Kellock, L. J., Knight, H., Trewavas, A. J.** (1992) Contact sensing during infection by fungal pathogens. In *Perspectives in Plant Cell Recognition*, ed. JA Callow, JR Green, **48**, 137–72. Cambridge: Cambridge Univ. Press
- Redding, K., Holcomb, C. und Fuller, R. S.** (1991). Immunolocalization of Kex2 protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **113**, 527-538.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L. und Frommer, W. B.** (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* **11**, 4705-4713.
- Rodríguez-Gálvez E., Mendgen, K.** (1995). The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* **189**, 61–72
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R. und Kämper, J.** (2000) Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J., Makarow, M.** (1992). A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3671–3675.

- Saalbach, G., Jung, R., Kunze, G., Saalbach, I., Adler, K. und Muntz, K.** (1991) different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. *Plant Cell* **3**, 695-708.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssonen, E., Bhatia, A., Ward M. und Penttila, M.** (2002) Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J Biochem.* **269**(17), 4202-4211.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. und Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.*
- Santos de Macedo, C., Shams-Eldin, H., Smith, T. K., Schwarz, R. T. und Azzouz, N.** (2003) Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Biochimie* **85**, 465–472
- Shimozono, S.** (1999). Alphabet indexing for approximating features of symbols. *Theor. Comput. Sci.* **210**, 245–260.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R.** (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Snel, B., Bork, P., Huynen, M.** (2000) Genome evolution. Gene fusion versus gene fission. *Trends Genet.* **16**(1), 9-11.
- Snetselaar, K. M.** (1993). Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp. Mycol.* **17**, 345-355.
- Snetselaar, K. M., Mims, C. W.** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae. *Mycol. Res.* **98**, 347–55
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R.** (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- Struck, C., Ernst, M., Hahn, M.** (2002) Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (AAT1p) of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 23–30
- Surpili, M. J., Müller-Röber, B. und Willmitzer, L.** (2002) A yeast-based model system for cloning secreted and membrane proteins. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **74**(4), 599-608.
- Taft, R. A., Denegre, J. M., Pendola, F. L., Eppig, J. J.** (2002) Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap. *Biol Reprod. Sep.* **67**(3), 953-60.
- Taylor, J. S. und Raes, J.** (2004) Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu Rev Genet.* **26** in Druck.
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J. und Hamer, J. E.** (1993). Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 1575-90.
- Talbot, N. J., Kershaw, M. J., Wakley, G. E., de Vries, O. M. H., Wessels, J. G. H. und John Hamer, J. E.** (1996) MPG1 Encodes a fungal hydrophobin involved in surface

interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**, 985-999.

**Talbot, N. J.** (1995) Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Trends Microbiol.* **3**, 9–16

**Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., Honjo, T.** (1993) Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* **261**, 600-603.

**Timberlake, W. E.** (1986). Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. In biology and molecular biology of plant-pathogen interactions, J. Bailey, ed. (Berlin, Heidelberg, Springer Verlag), pp. 343-357.

**Toh-e, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T., und Matsui, Y.** (1993). Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**, 481–494.

**Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W. K.** (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.

**Voegelé, R. T., Struck, C., Hahn, M., Mendgen, K.** (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8133–38

**von Heijne, G.** (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105.

**von Heijne, G.** (1990) The signal peptide. *J. Membrane Biol.* **115**, 195-201.

**Van Der Vaart, J. M., Te Biesebeke, R., Chapman, J. W., Klis, F. M. und Verrips, C. T.** (1997) The  $\beta$ -1,6-glucan containing side-chain of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* is bound to the glycan core of the GPI moiety. *FEMS Lett.* **145**, 401–407.

**Wakasa, Y., Hatsuyama, Y., Takahashi, A., Sato, T., Niizeki, M. und Harada, T.** (2003) Divergent expression of six expansin genes during apple fruit ontogeny. *Europ. J. Hort. Sci.* **68**, 253-259.

**Wessels, J. G. H., de Vries, O. M. H., Asgeirsdottir, S. A., Schuren, F. H. J.** (1991) Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum commune*. *Plant Cell* **3**, 793–99

**Wessels, J. G. H.** (1993) Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol.* **123**, 397–413.

Wösten, H. A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bölker, M., und Kahmann, R. (1996). **A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*.** *EMBO J* **15**, 4274-4281.

**Wösten, H. A. B., de Vocht, M. L.** (2000) Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica et Biophysica Acta* **1469**, 79-86.

**Wu, S. und Manber, U.** (1992). Fast text searching allowing errors. *Commun. ACM* **35**, 83–91.

**Xiao J-Z, Ohshima A., Kamakura T., Ishiyama T., Yamaguchi I.** (1994) Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 639–644

**Yuan, S., Wu, Y., Cosgrove, D. J.** (2001) A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. *Plant Physiol.* **127**(1) 324-333.

# Danksagung

Meinen Eltern sei herzlich für die unermüdliche Unterstützung während der langen Jahre des Studiums und der Promotion gedankt.

Joachim Uhrig und Peter Schreier danke ich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung, sowie dem Interesse an meiner Arbeit. Herrn Prof. Werr und Herrn Prof. Melkonian möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachten und des Prüfungsvorsitzes danken.

Der Bayer Cropscience AG danke ich für die Finanzierung meines Projekts, der Bereitstellung von Laborplatz und Gewächshaus, sowie den Zugriff auf das *U. maydis* Genom. Bei Prof. Salamini und Prof. Koornneef bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit diese Doktorarbeit auch über das Ende meiner „Bayerzeit“ hinaus fertigstellen zu können.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Ippacio Cicarello und Antche Rottmann, welche die gewissenhafte Anzucht und Pflege der Maispflanzen übernommen haben.

Prof. Kahmann danke ich für die Möglichkeit die Mikroskopierarbeiten an ihrem Institut durchführen zu können und Philip Müller für die freundliche Einweisung und Hilfe bei der Bedienung des Fluoreszenzmikroskops.

Mein besonderer Dank gilt den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, sowie den Kollegen von Bayer Cropscience, die mich während meiner Arbeit begleitet und bei der Bewältigung kleinerer und größerer Probleme unterstützt haben: Christian, Dana, Gregor, Verena, Jana, Marc, Edda, Markus, Birgitta, Edith, Christina, Klaus, Anja, Christoph, Wolfgang, Tim, Ulrike und Ilona.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation zwischen Bayer Cropscience und der Max-Planck-Gesellschaft am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, in der Abteilung Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie erstellt.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Peter H. Schreier betreut worden.

Teile dieser Arbeit werden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Birgitta Leuthner, Christian Aichinger, Edith Oehmen, Olaf Müller, Philip Müller, Regine Kahmann, Michael Bölker, Peter H. Schreier** A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. (eingereicht)

Köln, den 10.10.2004

---

## Lebenslauf

<b>Personalien</b>	Olaf Müller Geboren am 16.11.1967 in Hagen, Nordrheinwestfalen
<b>Schulbildung</b>	1974-1978 Schraberg-Grundschule, Herdecke 1978-1988 Friedrich-Harkort-Gymnasium, Herdecke Abschluß: Abitur
<b>Wehrdienst</b>	1988-1989 Fallschirmjägerbatallion 273, Iserlohn
<b>Berufsausbildung</b>	1990-1993 Industriemechaniker im Bereich Maschinen- und Systemtechnik, Westfalia Separator AG, Herdecke Abschluß: Facharbeiterprüfung
<b>Studium</b>	1993-1998 Grund- und Hauptstudiumstudium an der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität-Bochum Abschluß: Diplom in Biologie 1998-1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie mit dem Thema „Untersuchungen zur Expression von ERN1, eines neuen ethylenregulierten Kernproteins in <i>Arabidopsis thaliana</i> “ Betreuer: Prof. Dr. Elmar E. Weiler
<b>Promotion</b>	2000-2004 Doktorarbeit in der Abteilung Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln zum Thema „Identifizierung und Charakterisierung sekretierter Proteine mit Bezug zur Pathogenität in <i>Ustilago maydis</i> “ Betreuer: Prof. Dr. Peter Schreier
<b>Sonstiges</b>	1997-1999 Computer- und Netzwerktechniker der Firma SHS Computer in Hagen 1999-2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität-Bochum