

**Identifizierung und Charakterisierung  
zweier für die Produktion extrazellulärer  
Glykolipide verantwortlichen Gencluster  
in *Ustilago maydis***

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

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Sandra Hewald  
aus Dortmund

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Biologie \_\_\_\_\_  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 09.12.2005 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung am 12.12.2005

Die Untersuchungen zur folgenden Arbeit wurden von Mai 2002 bis November 2005 in Marburg am Fachbereich Biologie unter Leitung und Betreuung von Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel: „Identifizierung und Charakterisierung zweier für die Produktion extrazellulärer Glykolipide verantwortlichen Gencluster in *Ustilago maydis*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

---

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Meinen Eltern gewidmet

## Zusammenfassung

*Ustilago maydis* produziert unter Stickstoffmangelbedingungen große Mengen an extrazellulären Glykolipiden, das Cellobioselipid Ustilaginsäure und das Mannosylerythritollipid (Ustilipid). In dieser Arbeit wurden die Biosynthesewege und die biologischen Funktionen beider Glykolipide charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden Deletionsmutanten hergestellt, die einen Defekt in der Glykolipid-Produktion aufwiesen. Es konnte die Glykosyltransferase Emt1 identifiziert werden, die für die Produktion von Ustilipiden (MELs) essentiell ist. Aufgrund der spezifischen Induktion von Emt1 unter Stickstoffmangelbedingungen konnten durch Microarray-Analysen ein Gen-Cluster in *Ustilago maydis* identifiziert werden, das für die MEL-Biosynthese verantwortlich ist. Dieses MEL-Cluster besteht aus fünf Genen, denen eine Funktion in der Biosynthese zugeordnet werden konnte.

Für die Acetyltransferase Mat1 konnte die vorhergesagte Funktion durch einen Enzymassay und massenspektrometrische Messungen bestätigt werden. Durch die Microarray-Analysen konnte auch ein Ustilaginsäure-Cluster und eine weitere Glykosyltransferase (Hgt1) in diesem Cluster identifiziert werden.

Beiden Glykolipiden konnten unterschiedliche biologische Funktionen zugeordnet werden. Es zeigte sich, dass die Ustilaginsäuren wichtig für die Pheromonwahrnehmung sind, und dass sie eine toxische Wirkung gegenüber anderen Mikroorganismen besitzen. Die Ustilipide sind besonders starke oberflächenaktive Substanzen und weisen hämolytische Aktivität auf.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

|                                        |                                                                        |                      |                                             |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------|
| <b>AB</b>                              | Antibiotikum                                                           | <b>PIPES</b>         | Piperazine N-N'-bis<br>(2-Ethansulfonat)    |
| <b>Amp</b>                             | Ampicillin                                                             | <b>PPi</b>           | Peptidyl-prolyl cis-trans<br>Isomerase      |
| <b>ATP</b>                             | Adenosin-Triphosphat                                                   | <b>RNA</b>           | Ribonukleinsäure                            |
| <b>bp</b>                              | Basenpaar                                                              | <b>RNase</b>         | Ribonuklease                                |
| <b>BSA</b>                             | Rinderserumalbumin                                                     | <b>rpm</b>           | Umdrehungen pro Minute                      |
| <b>°C</b>                              | Grad Celsius                                                           | <b>RT</b>            | Raumtemperatur                              |
| <b>Cbx</b>                             | Carboxin                                                               | <b>SDS</b>           | Natrium-Dodecyl-Sulfat                      |
| <b>C-Terminal</b>                      | Carboxy-Terminal                                                       | <b>TEMED</b>         | N,N,N',N'-Tetramethylen<br>Diamin           |
| <b>CTP</b>                             | Cytosin-Triphosphat                                                    | <b>T<sub>m</sub></b> | mittlere Schmelz-<br>temperatur             |
| <b>DNA</b>                             | Desoxyribonukleinsäure                                                 | <b>TTP</b>           | Thymidin-Triphosphat                        |
| <b>DC</b>                              | Dünnschichtchromatographie                                             | <b>U</b>             | Unit (Enzymaktivitäts-<br>einheit)          |
| <b>dNTP</b>                            | Desoxyribonukleosid-Triphosphat                                        | <b>UA</b>            | Ustilaginsäure                              |
| <b>EDTA</b>                            | Ethylendiamintetraacetat                                               | <b>UDP</b>           | Uridindiphosphat                            |
| <b>FTMS</b>                            | Fourier-Transformation-<br>Massenspektrometrie                         | <b>üN</b>            | über Nacht                                  |
| <b>GTP</b>                             | Guanosin-Triphosphat                                                   | <b>UV</b>            | Ultraviolettes Licht                        |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub></b> | zweifach destilliertes Wasser                                          | <b>WT</b>            | Wildtyp                                     |
| <b>Hyg</b>                             | Hygromycin B                                                           | <b>X-GAL</b>         | 5-Bromo-4-chloro-1-indol-<br>β-D-galactosid |
| <b>kb</b>                              | Kilobasen                                                              |                      |                                             |
| <b>kD</b>                              | Kilodalton                                                             |                      |                                             |
| <b>LC</b>                              | Flüssig-Chromatographie                                                |                      |                                             |
| <b>MCS</b>                             | Multiple Cloning Site                                                  |                      |                                             |
| <b>MEL</b>                             | Mannosylerythritollipid                                                |                      |                                             |
| <b>MOPS</b>                            | 3-(N-Morpholino)propansulfonat                                         |                      |                                             |
| <b>N-Terminal</b>                      | Amino-Terminal                                                         |                      |                                             |
| <b>OD<sub>600</sub></b>                | Optische Dichte bei 600 nm                                             |                      |                                             |
| <b>ORF</b>                             | offener Leserahmen                                                     |                      |                                             |
| <b>PCR</b>                             | Polymerase-Kettenreaktion                                              |                      |                                             |
| <b>PD</b>                              | potato dextrose                                                        |                      |                                             |
| <b>PEG</b>                             | Polyethylenglycol                                                      |                      |                                             |
| <b>pH</b>                              | negativer dekadischer Logarithmus der<br>Wasserstoffionenkonzentration |                      |                                             |

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>                                                                                  | <b>I</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE.....</b>                                                                     | <b>II</b> |
| <b>1. EINLEITUNG.....</b>                                                                                    | <b>4</b>  |
| 1.1 Glykolipide in <i>Ustilago maydis</i> .....                                                              | 4         |
| 1.1.1 Ustilaginsäuren.....                                                                                   | 5         |
| 1.1.2 Ustilipide.....                                                                                        | 7         |
| 1.2 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus.....                                                         | 8         |
| 1.3 Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i> .....                                                        | 9         |
| 1.4 Das Kreuzungssystem von <i>Ustilago maydis</i> .....                                                     | 11        |
| 1.5 Biodetergenzien.....                                                                                     | 14        |
| 1.6 Glykosyltransferasen.....                                                                                | 17        |
| 1.7 Cytochrom P450-Monooxygenasen.....                                                                       | 20        |
| 1.8 Zielsetzung der Arbeit.....                                                                              | 21        |
| <b>2. ERGEBNISSE.....</b>                                                                                    | <b>22</b> |
| 2.1 Identifizierung von potentiellen Glykolipidbiosynthesegenen.....                                         | 22        |
| 2.2 Charakterisierung der $\Delta emt1$ Deletionsmutante.....                                                | 26        |
| 2.3 Herstellung einer $\Delta emt1\Delta cyp1$ Doppeldeletionsmutante.....                                   | 29        |
| 2.4 Phänotyp von glykolipiddefizienten Mutanten.....                                                         | 30        |
| 2.5 Die Expression der Glykolipidbiosynthesegene ist unter Stickstoffmangelbedingungen stark induziert.....  | 36        |
| 2.6 Identifizierung eines MEL-Biosynthese-Clusters.....                                                      | 39        |
| 2.7 Nachweis der enzymatischen Aktivität der Acetyltransferase 105_120.....                                  | 43        |
| 2.8 Massenspektrometrische Bestimmung der deacetylierten Glykolipide.....                                    | 45        |
| 2.9 Toxizitätsanalysen mit den aus den Deletionsstämmen gewonnenen extrazellulären Glykolipiden.....         | 54        |
| 2.10 Charakterisierung einer Glykosyltransferase, die für die Ustilaginsäure-Biosynthese essentiell ist..... | 57        |
| <b>3. DISKUSSION.....</b>                                                                                    | <b>60</b> |
| 3.1 Biologische Funktionen von Glykolipiden in <i>U. maydis</i> .....                                        | 60        |
| 3.2 Die Biosynthesegene beider Glykolipidklassen liegen in Clustern vor.....                                 | 65        |
| 3.2.1 Das Gen-Cluster 105 ist für die MEL-Produktion verantwortlich.....                                     | 67        |
| 3.2.2 Die Glykosyltransferase Emt1 besitzt eine entscheidende Funktion in der MEL-Biosynthese.....           | 69        |
| 3.2.3 Gen-Cluster 250 ist für die UA-Produktion verantwortlich.....                                          | 70        |
| 3.2.4 Die Glykosyltransferase Hgt1 besitzt eine entscheidende Funktion in der UA-Biosynthese.....            | 71        |
| 3.3 Biochemische und massenspektrometrische Analyse der deacetylierten MEL-Formen.....                       | 73        |
| <b>4. AUSBLICK.....</b>                                                                                      | <b>74</b> |

|                                                                                          |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5 MATERIAL</b> .....                                                                  | <b>75</b>  |
| 5.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen.....                                        | 75         |
| 5.1.1 <i>Ustilago maydis</i> -Stämme .....                                               | 75         |
| 5.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....                                       | 77         |
| 5.1.3 <i>Escherichia coli</i> -Stämme .....                                              | 77         |
| 5.1.4 Chemikalien.....                                                                   | 77         |
| 5.1.5 Kits .....                                                                         | 79         |
| 5.1.6 Enzyme und Proteine.....                                                           | 80         |
| 5.1.7 Sonstige Materialien.....                                                          | 80         |
| 5.2 Puffer und Lösungen.....                                                             | 81         |
| 5.3 Medien zur Kultivierung von <i>U. maydis</i> .....                                   | 85         |
| 5.4 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....                                     | 86         |
| 5.5 Medien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....                               | 87         |
| 5.6 Nukleinsäuren.....                                                                   | 87         |
| 5.6.1 Plasmide, Plasmidkonstruktionen und Genbanken.....                                 | 87         |
| 5.6.2 DNA-Größenstandards .....                                                          | 88         |
| 5.6.3 Protein-Größenstandard.....                                                        | 89         |
| 5.6.4 Oligonukleotid-Primer .....                                                        | 89         |
| <b>6 METHODEN</b> .....                                                                  | <b>102</b> |
| 6.1 Anzucht von Mikroorganismen.....                                                     | 102        |
| 6.1.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....                                          | 102        |
| 6.1.2 Anzucht von <i>U. maydis</i> .....                                                 | 102        |
| 6.2 Isolierung von Nukleinsäuren .....                                                   | 103        |
| 6.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch „kochende Lyse“.....          | 103        |
| 6.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> alkalische Lyse.....                | 104        |
| 6.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> - präparativer Maßstab.....         | 104        |
| 6.2.4 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>U. maydis</i> für PCR.....                     | 105        |
| 6.2.5 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>U. maydis</i> für Southern-Blot Analysen ..... | 105        |
| 6.2.6 RNA-Isolierung aus <i>U. maydis</i> für Northern-Blot Analysen .....               | 106        |
| 6.3 Amplifikation und Klonierung von DNA.....                                            | 107        |
| 6.3.1 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion.....                          | 107        |
| 6.3.2 Ganz-Zell-PCR aus <i>U. maydis</i> Zellen .....                                    | 108        |
| 6.3.3 Restriktions-Analyse von DNA.....                                                  | 108        |
| 6.3.4 Dephosphorylierung von DNA.....                                                    | 109        |
| 6.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....                                                   | 109        |
| 6.4 Analyse von DNA.....                                                                 | 110        |
| 6.4.1 Bestimmung der DNA-Konzentration.....                                              | 110        |
| 6.4.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....              | 110        |
| 6.4.3 Denaturierende Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA .....        | 111        |
| 6.4.4 Transfer und Detektion von DNA und RNA auf Membranen.....                          | 111        |
| 6.4.5 DNA-Sequenzierung.....                                                             | 113        |
| 6.5 Transformationen.....                                                                | 114        |
| 6.5.1 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....                          | 114        |
| 6.5.2 Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....                        | 114        |
| 6.5.3 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen .....                           | 114        |

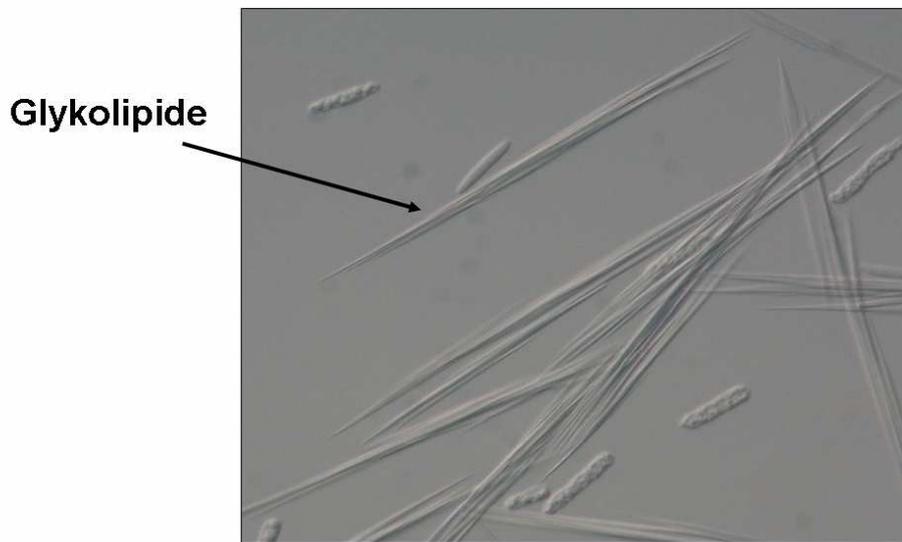
|                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.5.4 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....                 | 115        |
| 6.5.5 Protoplastierung von <i>U. maydis</i> .....                                 | 116        |
| 6.5.6 Transformation von <i>U. maydis</i> -Protoplasten.....                      | 116        |
| 6.6 Isolierung und Nachweis der Ustilaginsäure.....                               | 117        |
| 6.6.1 Kultivierung von <i>Ustilago maydis</i> zur Ustilaginsäure-Produktion ..... | 117        |
| 6.6.2 Isolierung der Ustilaginsäure direkt aus der YNB-Flüssigkultur.....         | 117        |
| 6.6.3 Nachweis der Ustilaginsäure durch Dünnschichtchromatographie (DC) .....     | 118        |
| 6.7 Herstellung von Deletionskonstrukten.....                                     | 118        |
| 6.8 Untersuchung von <i>U. maydis</i> .....                                       | 119        |
| 6.8.1 Infektion von Maispflanzen und Isolierung haploider Nachkommen.....         | 119        |
| 6.8.2 Test des Kreuzungsverhaltens auf Charcoal-PD-Agar .....                     | 120        |
| 6.8.3 Test auf Hämolyse .....                                                     | 121        |
| 6.8.4 Konfrontationstest.....                                                     | 121        |
| 6.8.5 Test auf Oberflächenspannungsaktivität.....                                 | 121        |
| 6.8.6 Test auf Toxizität.....                                                     | 122        |
| 6.8.7 Mikroskopie.....                                                            | 122        |
| 6.9 Expressions-Analysen.....                                                     | 123        |
| 6.9.1 Herstellung der „Microarray-Targets“ .....                                  | 123        |
| Hybridisierung.....                                                               | 125        |
| Datenanalyse.....                                                                 | 125        |
| 6.10 Biochemische Analysen.....                                                   | 126        |
| 6.10.1 Überexpression der Acetyltransferase 105_120 in <i>E. coli</i> .....       | 126        |
| 6.10.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....                                   | 127        |
| 6.10.3 Acetyltransferase-Assay.....                                               | 127        |
| 6.11 Massenspektrometrische Untersuchungen .....                                  | 128        |
| <br>                                                                              |            |
| <b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>                                               | <b>129</b> |
| <br>                                                                              |            |
| <b>DANKSAGUNG.....</b>                                                            | <b>135</b> |
| <br>                                                                              |            |
| <b>LEBENS LAUF .....</b>                                                          | <b>136</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1 Glykolipide in *Ustilago maydis*

Viele Mikroorganismen sekretieren unter bestimmten Bedingungen Sekundärmetabolite, die aufgrund ihrer amphipathischen Struktur oberflächenaktiv sind. Solche Substanzen können Zellen zum Beispiel die Anheftung an hydrophobe Oberflächen erleichtern. Einige dieser Sekundärmetabolite besitzen zudem antibiotische Wirkungen. Zu diesen amphipathischen Substanzen gehören auch die Glykolipide, die aus einem hydrophilen Zuckeranteil und einem lipophilen Fettsäureanteil bestehen.

Die am besten untersuchten extrazellulären Glykolipide sind die bakteriellen Rhamnolipide, die von einigen *Pseudomonas*-Arten produziert werden. Bereits seit den 50er Jahren ist bekannt, dass der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* unter Stickstoffmangelbedingungen große Mengen an extrazellulären Glykolipiden (bis zu 30 g/l) produziert (Spoeckner et al., 1999). Hierbei handelt es sich um zwei unterschiedliche Klassen an Glykolipiden, das Cellobioselipid Ustilaginsäure (UA) und das Mannosylerythritollipid (MEL), beziehungsweise Ustilipid. Diese Glykolipide sind nur schwer löslich in Wasser und bilden in Flüssigmedium nadelförmige Substanzen aus, wobei es sich vermutlich um Gemische der beiden Glykolipidklassen handelt (Abb. 1).



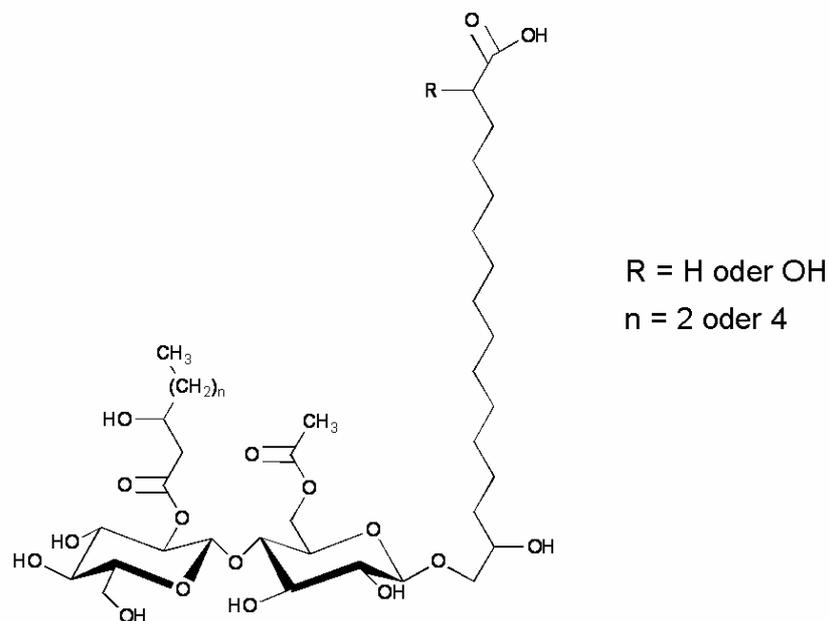
**Abb. 1: Sezernierte Glykolipide von *U. maydis*.** Unter Stickstoffmangelbedingungen produziert *U. maydis* große Mengen an Glykolipiden. Diese sind wasserunlöslich und erscheinen unter dem Mikroskop als nadelförmige Substanzen. Hierbei handelt es sich vermutlich um Gemische der beiden Glykolipidklassen.

### 1.1.1 Ustilaginsäuren

Die Ustilaginsäure wurde in den 50er Jahren zum ersten Mal beschrieben (Lemieux et al., 1951). Es wurden bereits damals antibiotische und antimykotische Eigenschaften dieser Substanz beobachtet (Haskins and Thorn, 1951). Die Ustilaginsäuren bestehen aus dem Disaccharid Cellobiose, das o-glykosidisch an die  $\omega$ -Hydroxylgruppe der 15, 16-Dihydroxypalmitinsäure gebunden ist. Der Cellobioseanteil ist zusätzlich mit einer Acetylgruppe und einer mittellangen Hydroxy-Fettsäure verestert (Abb. 2).

Ustilaginsäuren sind nahezu wasserunlöslich und konnten bisher nur in *U. maydis* und sehr nahe verwandten Pilzen gefunden werden. Aufgrund ihrer antibiotischen Wirkung wurden sie in den 50er Jahren auch auf ihre medizinischen Anwendungsmöglichkeiten untersucht. *In vivo* Versuche an Ratten zeigten jedoch, dass eine orale Applikation nicht möglich war.

Zudem senkt das Blutserum die antibiotische Aktivität um das 4- bis 8-fache, wodurch die aufzunehmende Menge für den therapeutischen Einsatz zu groß wäre (Reed and Holder, 1953). Dies führte dazu, dass das wissenschaftliche Interesse an der Ustilaginsäure nachließ und erst in den letzten Jahren aufgrund ihrer Eigenschaften als biologisch abbaubares Biodetergenz wieder zunahm (Spoeckner et al., 1999) (1.5). Daneben sind verwandte Substanzen, wie zum Beispiel das Flocculosin, als Biocontrolagenzien zum Einsatz gegen phytopathogene Mikroorganismen patentiert worden (Mimee et al., 2005).



**Abb. 2: Chemische Struktur der von *U. maydis* sezernierten Ustilaginsäure.** Die Ustilaginsäure besteht aus einer Cellobioseeinheit, die o-glykosidisch an die 15,16-Dihydroxypalmitinsäure gebunden ist. Die Cellobioseeinheit liegt zudem an zwei Positionen verestert vor.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde versucht, mit Hilfe einer ungerichteten UV-Mutagenese Mutanten zu generieren, die für die Ustilaginsäureproduktion defekt sind. Hierfür wurde ausgenutzt, dass Glykolipide häufig hämolytische Eigenschaften besitzen (Carillo et al., 1996). Mit Hilfe eines solchen Screens konnten Mutanten gefunden werden,

die auf Blutagarplatten keinen deutlichen Hämolysering mehr verursachten. Die dünnschichtchromatographische Analyse erbrachte den Nachweis, dass es in einigen Fällen zu einem vollständigen Ausfall der Glykolipidproduktion gekommen ist. Allerdings gelang es auf diese Weise nicht, die für die UA-Produktion verantwortlichen Gene zu identifizieren (Josephs, 2004).

### 1.1.2 Ustilipide

Die zweite bereits identifizierte Glykolipid-Klasse ist die der Ustilipide. Diese sind auch unter dem Namen Mannosylerythritollipide bekannt (MELs). Sie werden von einer Reihe von Pilzen produziert und bestehen aus einem Disaccharid, welches aus einer Mannose und einem Erythritol zusammengesetzt ist (Fluharty and O'Brien, 1969). Der Mannoseanteil ist an mehreren Positionen mit Acetylgruppen und Fettsäuren unterschiedlicher Länge verestert. Die von *U. maydis* produzierten MELs wurden interessanterweise auch in einem Screen entdeckt, in dem nach Antagonisten von Säugetier-Dopamin-Rezeptoren gesucht wurde (Kurz et al., 2003). Es wurde außerdem gezeigt, dass maligne Melanome, die nur schwach auf die Behandlung mit chemotherapeutischen Reagenzien reagieren, durch Ustilipide an ihrem Wachstum inhibiert werden konnten. Die Exposition von Maus Melanom B 16 Zellen mit Ustilipiden, die mindestens eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aufweisen, verursachen die Kondensation von Chromatin, DNA-Fragmentierung und Arrest in der G1-Phase, was alles Anzeichen für eine beginnende Apoptose sind (Zhao et al., 1999). Außerdem erhöht die Zugabe von MEL-A drastisch die Gentransfektionseffizienz mit Hilfe kationischer Liposomen (Inoh et al., 2001).

Ustilipide werden von den Zellen als ein extrazelluläres Öl ausgeschieden, das schwerer als Wasser ist (Fluharty and O'Brien, 1969), und welches zusammen mit den Ustilaginsäuren als nadelförmige Strukturen ausfällt (Abb. 1).



der nur den Mais (*Zea mays*) und dessen Urform, die Teosinte (*Zea mexicana*), befallen kann. *U. maydis* ist der Auslöser des Maisbeulenbrandes. Er kann alle oberirdischen Pflanzenabschnitte infizieren und bewirkt in manchen Jahren große Ernteschäden. In Mexiko gelten infizierte Maiskolben jedoch als Delikatesse und sind dort unter dem Namen „Huitlacoche“ im Handel erhältlich.

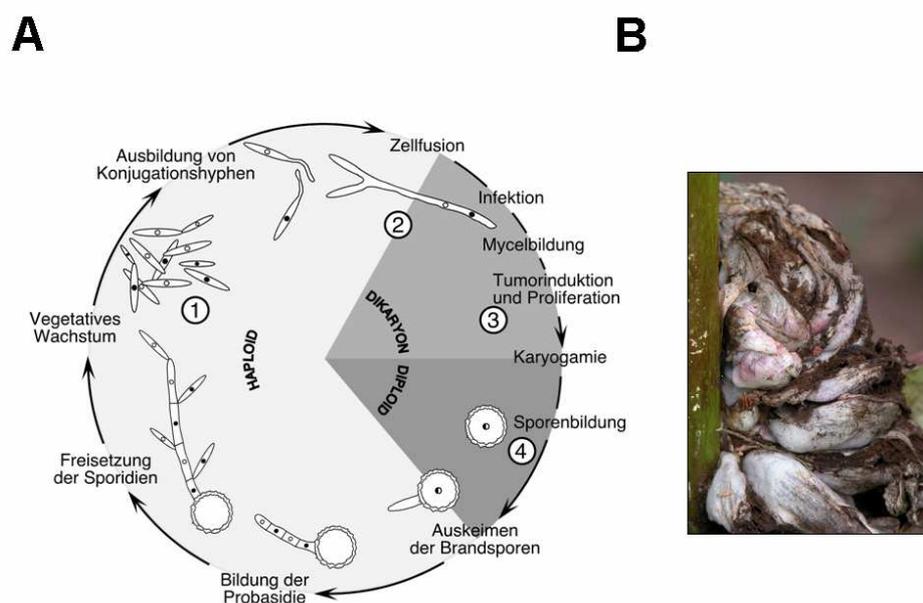
Bei *U. maydis* handelt es sich um einen dimorphen Pilz, dessen Vermehrung vegetativ und sexuell erfolgen kann. Anhand der Untersuchung mitotischer Rekombinationsvorgänge wurden wichtige Erkenntnisse zur Erstellung eines Modells der homologen Rekombination erhalten (Holliday, 1961). Die vegetative Form vermehrt sich hefeartig durch Sprossung, ist leicht kultivierbar und benötigt nur 2 Stunden zur Verdopplung. Aufgrund eines einfachen Transformations-Systems eignet sich die haploide Form für revers genetische Ansätze (Tsukuda et al., 1988). So ist es möglich, innerhalb weniger Tage Deletionsstämme mittels homologer Rekombination zu erzeugen. Zudem existieren stabile diploide Stämme, die die einfache Handhabung von Deletionsstämmen essentieller Gene im heterozygoten Zustand ermöglichen.

### **1.3 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis***

*U. maydis* besitzt einen relativ einfachen Lebenszyklus (Abb. 4). Freigesetzte haploide Basidiosporen vermehren sich in der vegetativen Phase hefeartig durch Knospung und ernähren sich saprophytisch, also von abgestorbenem Material. In dieser Phase sind sie für die Maispflanzen nicht infektiös.

Die dikaryotische filamentöse Form ist pathogen und entsteht durch die Fusion zweier kompatibler haploider Zellen (Snetselaar et al., 1996). Dieser Prozess findet in der Natur auf den Blattoberflächen von Maispflanzen statt. Er kann aber auch unabhängig von Pflanzen auf aktivkohlehaltigen Platten beobachtet werden (Banuett and Herskowitz, 1994). Die dikaryotische Hyphe dringt nach Ausbildung einer appressorienartigen Struktur

durch die Oberfläche junger Blätter oder durch die natürlichen Öffnungen wie Stomata und Blütenorgane in die Pflanze ein. Dort vermehrt sich das Dikaryon und wächst inter- und intrazellulär in Form unregelmäßig verzweigter und gewundener Hyphen (Banuett and Herskowitz, 1996). Bereits einige Tage nach der Infektion können Chlorosen und Anthocyanbildung beobachtet werden. Zudem verursacht das Wachstum des Pilzes auch morphologische Veränderungen bei der Maispflanze. Nach 5-6 Tagen bilden sich am Stängel, an den Blättern und am Kolben Gallen aus (Snetselaar and Mims, 1992).



**Abb. 4: Lebenszyklus von *Ustilago maydis*.** A) Schematische Darstellung des Lebenszyklusses (Brachmann et al., 2001). *Ustilago maydis* ist ein dimorpher Pilz, der sich vegetativ und sexuell vermehren kann. In der vegetativen Phase vermehren sich die haploiden Basidiosporen hefeartig durch Knospung und ernähren sich saprophytisch. Die infektiöse Form ist filamentös und dikaryotisch. Sie entsteht durch die Fusion zweier kompatibler haploider Zellen. B) Tumorbildung an einem Maisstängel. Die dikaryotische Form ist infektiös und führt zur Ausbildung von Tumoren an den oberirdischen Pflanzenteilen.

In den Gallen findet die Vermehrung der Pilzhyphen statt. Nach etwa 10 Tagen kommt es zur Abrundung der Pilzfilamente und zur Verschmelzung der Kerne (Karyogamie). Dies

führt zur Ausbildung von diploiden Brandsporen (Teliosporen) (Snetselaar and Mims, 1994). Die schwarze Färbung der Pflanzengallen („Tumore“) ist auf die dicke pigmentierte Zellwand der Brandsporen zurückzuführen und gab der Infektion durch *U. maydis* den Namen „Maisbeulenbrand“. Nach dem Aufplatzen eines Tumors werden bis zu 200 Milliarden Brandsporen durch Wind und Regen verteilt und können über Jahre hinweg im Boden überdauern (Christensen, 1963). Die Meiose findet dann beim Auskeimen in den Probasidien statt. Die haploiden Kerne wandern in verlängerte Einzelzellen, die Sporidien, die durch die seitliche Abschnürung der septierten Probasidie freigesetzt werden (Snetselaar, 1993).

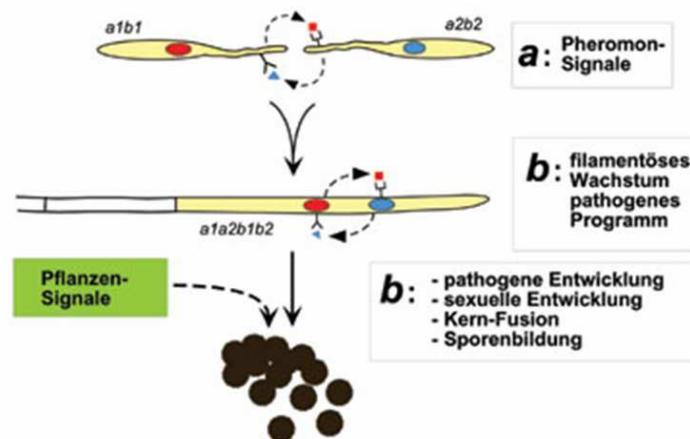
## 1.4 Das Kreuzungssystem von *Ustilago maydis*

Das Kreuzungssystem von *U. maydis* ist komplex. Die Fusion der haploiden Sporidien und die Ausbildung des pathogenen Dikaryons werden durch zwei unabhängige genetische Loci reguliert, dem *a* und dem *b* Locus.

Die Pheromonvorstufen Mfa1 und Mfa2 (Mating factor a), sowie die beiden Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2 (Pheromone receptor a) werden von dem biallelischen *a* Locus kodiert. Die Pheromonrezeptoren detektieren die Anwesenheit der Pheromone des anderen Kreuzungstyps (Bölker et al., 1992; Spellig et al., 1994). Wie bei anderen pilzlichen Pheromonen tragen die Mfa-Vorläuferproteine eine C-terminale Signalsequenz zur Prenylierung (CAAX-Box), an der dann durch Farnesylierung eine posttranslationale Modifikation erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Pra Rezeptoren hohe Sequenzhomologien zu Ste3 zeigen, dem Pheromonrezeptor für den farnesylierten *a*-Faktor der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Bölker et al., 1992).

Die Pheromone von *U. maydis* sind kurze Lipopeptide (9- bzw. 13-Aminosäuren lang), die unter Mangelbedingungen von den Zellen sezerniert werden. Aufgrund ihrer AS-Zusammensetzung und des farnesylierten Cysteinrestes sind sie sehr hydrophob. Wenn

Zellen die Pheromone von Zellen des kompatiblen Kreuzungstyps wahrnehmen, so antworten sie ihrerseits mit einer verstärkten Sekretion von Pheromonen.



**Abb. 5: Systematische Darstellung der Funktion des *a* Kreuzungstyplocus.** Der *a* Locus kodiert für ein Pheromon-Rezeptorsystem. Wenn Pheromone von den Rezeptoren eines kompatiblen Partners erkannt werden, wachsen die beiden Zellen aufeinander zu und verschmelzen an den Spitzen. Das gebildete Dikaryon ist nur stabil, wenn die beiden Zellen außerdem verschiedene Allele des *b* Locus tragen. Nur die Spitzenzelle ist hierbei mit Zytoplasma gefüllt. Für die weitere Vermehrung sind Pflanzensignale notwendig, die bisher jedoch noch unbekannt sind (verändert nach Kämper).

Die wechselseitige Pheromonstimulierung führt zur Ausbildung von Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten wachsen, bis es zur Verschmelzung der Hyphen an den Spitzen kommt (Snetselaar et al., 1996) (Abb. 5). Es kann nur zu einer Ausbildung eines stabilen Dikaryons kommen, wenn sich die Kerne neben dem *a* Locus auch in den Allelen des multiallelischen *b* Locus unterscheiden.

Der *b* Locus kodiert für die beiden Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), welche in entgegengesetzter Richtung transkribiert werden. Wenn die von *bE* und *bW* kodierten Proteine zweier konjugierender Zellen von unterschiedlichen *b*-Allelen stammen, kommt es durch Wechselwirkung der variablen N-terminalen Regionen zu einer Heterodimerisierung (Kämper et al., 1995). Diese nun aktiven *bW/bE*-Heterodimere wirken als

Transkriptionsaktivator oder –repressor und regulieren so die Expression von Genen, die für die Stabilität und Pathogenität des Dikaryons erforderlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression aller Gene der beiden Kreuzungstyploci durch die Pheromonwahrnehmung aktiviert wird. Die entscheidende Rolle spielt der Transkriptionsfaktor Prf1 (Pheromone Response Factor).

Dessen Aktivität wird sowohl vom cAMP-Spiegel, als auch vom Pheromonsignal selber gesteuert (Hartmann et al., 1996; Hartmann et al., 1999). Das Pheromonsignal durchläuft hierbei wahrscheinlich eine MAP-Kinasekaskade und führt außerdem über ein heterotrimeres G-Protein und eine Adenylatcyclase zur Stimulation des cAMP Signalwegs. Der Transkriptionsfaktor Prf1 besitzt sowohl Sequenzmotive für die Phosphorylierung durch cAMP-abhängige Proteinkinasen, als auch typische Erkennungsstellen für MAP Kinasen. Dies sind Hinweise dafür, dass er als Bindeglied zwischen diesen beiden Signalwegen dient (Hartmann et al., 1999). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Glukose ein potentieller Aktivator für die cAMP-Synthese ist („Nutrient signalling“). Die Glukose-Wahrnehmung wird hierbei durch zwei Systeme gesteuert, durch ein G-Protein gekoppeltes Rezeptorsystem und durch einen Phosphorylierungs-abhängigen Mechanismus (Thevelein and de Winde, 1999).

Das Genom von *U. maydis* wurde kürzlich vollständig sequenziert. Dies macht diesen Organismus zu einem geeigneten Modellsystem für genetische Untersuchungen. Die Sequenz liegt in 24 physikalisch verbundenen großen Scaffolds vor, die den 23 Chromosomen entsprechen, wobei Chromosom 4 aufgrund des großen rDNA-Clusters, der nicht vollständig sequenziert werden konnte, in 2 großen Scaffolds vorliegt ([http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago\\_maydis/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/)). Es gibt die Möglichkeit, mit Hilfe einer Datenbank nach bestimmten Genen-oder Proteinsequenzen zu suchen (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/Search/pedantSearch.html>). Für die aus der Genomsequenz abgeleiteten ORFs gibt es eine alte und eine neue Nomenklatur. Die alte Gen-Nomenklatur besteht aus zwei Zahlen, wobei die erste Zahl die Contignumnummer und die zweite Zahl (in Zehnerschritten) das vorhergesagte Gen bezeichnet (z. B. 250\_120). Die

neue Gen-Nomenklatur besteht nur aus einer Zahl (z. B. *um03492*). Da sich die neuen Bezeichnungen bei der laufenden manuellen Annotierung ändern können, wurde in dieser Arbeit überwiegend die alte Nomenklatur verwendet.

Auf der Basis der genomischen DNA-Sequenz von *U. maydis* wurde zudem von der Firma Affymetrix ein DNA-Microarray entwickelt, der es erlaubt, die Expression von fast 93 % aller Gene parallel zu analysieren (AG Kahmann, MPI, Marburg). Dies stellte eine weitere Erleichterung für genetische Analysen dar, da nun die Expression aller *U. maydis*-Gene unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden kann (z. B. die Induktion unter Stickstoffmangelbedingungen).

## 1.5 Biodetergenzien

Bei den von *U. maydis* unter Stickstoffmangel produzierten Glykolipiden handelt es sich um Biodetergenzien. Bei Biodetergenzien handelt es sich um oberflächenaktive Substanzen, welche in ihrer chemischen Struktur sehr unterschiedlich sein können und von einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen produziert werden. Die verschiedenen Gruppen an Biodetergenzien haben unterschiedliche Funktionen für das Wachstum der produzierenden Mikroorganismen. So schaffen manche Substanzen Vorteile für eine bestimmte ökologische Nische bereit (Ron and Rosenberg, 2001). Bestimmte Biotenside besitzen antibakterielle und antimykotische Aktivitäten; andere spielen wiederum eine wichtige Rolle bei der Regulation der Anheftung und Loslösung von Mikroorganismen an und von Oberflächen.

Die Biodetergenzien können in niedermolekulare Substanzen und in solche mit hohem Molekulargewicht unterteilt werden. Polymere mit hohem Molekulargewicht können teilweise sehr fest an Oberflächen binden (Rosenberg and Ron, 1997).

Zu den Biotensiden mit niedrigem Molekulargewicht gehören Lipopeptide und Glykolipide. Das bekannteste oberflächenaktive Lipopeptid ist das von *Bacillus subtilis*

produzierte Surfactin, das stärkste bisher gefundene natürliche Biotensid (Peypoux et al., 1999). Die am besten untersuchten Glykolipid-Biotenside sind die Rhamnolipide, Trehalolipide und Sophorolipide. Hierbei handelt es sich um Disaccharide, welche mit langkettigen Fettsäuren oder Hydroxy-Fettsäuren verbunden sind. Glykolipide wurden in sehr unterschiedlichen Mikroorganismen gefunden, so produzieren zum Beispiel das Bakterium *Rhodococcus erythropolis* (Trehalose-Dimycolat) (Kim et al., 1990) und die Hefe *Torulopsis bombicola* Sophorolipide, welche aus zwei  $\beta$ -1,2 verknüpften Glukoseeinheiten und einem glykosydisch gebundenen Lipidanteil bestehen (Ito and Inoue, 1982). Verschiedene *Pseudomonas*-Stämme produzieren Rhamnolipide, die sich aus ein bis zwei Molekülen Rhamnose und ein bis zwei Molekülen  $\beta$ -Hydroxy-Dekansäure zusammensetzen (Lang and Wullbrandt, 1999). Die Regulation der Rhamnolipid-Produktion konnte auf molekularer Ebene in *P. aeruginosa* aufgeklärt werden (Ochsner et al., 1994; Ochsner and Reiser, 1995). Die Synthesegene liegen in einem Operon vor (*rhLABR*). Außerdem sind noch zusätzliche Gene, wie *rhIG*, beteiligt. Dieses Gen kodiert für eine zur Fettsäuresynthese benötigte NADPH-abhängige  $\beta$ -Ketoacyl-acyl-Carrier-Protein(ACP)-Reduktase (Campos-Garcia et al., 1998; Ren et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass *rhIG*-Deletionsmutanten eine komplette Inhibition der Rhamnolipidsynthese zeigten, aber der Fettsäurestoffwechsel nicht betroffen war. Die Rhamnolipid-Fettsäureeinheit wird demnach unabhängig von der generellen Fettsäuresynthese synthetisiert. Durch biochemische Analysen konnten in dem *rhLABR*-Gencluster Rhamnosyltransferasen identifiziert werden, die für die glykosidische Bindung verantwortlich sind (Ochsner et al., 1994; Ron and Rosenberg, 2001). Daneben befinden sich noch weitere regulative Elemente (*rhIR* und *rhIL*) in dem Gencluster (Latifi et al., 1996; Latifi et al., 1995; Pearson et al., 1997; Pesci et al., 1997).

Da nur für sehr wenige Biodetergenzien bekannt ist, welche Gene für ihre Biosynthese verantwortlich sind, gelang es auch nur für einige Bakterienstämme, Mutantienstämme zu konstruieren, die keine Biotenside mehr produzieren (Koch et al., 1991). In den Fällen, in denen ein genetischer Ansatz zur Charakterisierung der Biodetergenzien nicht möglich war, wurden zumeist die Biotenside biochemisch aufgereinigt und anschließend *in vitro* untersucht.

Über die natürlichen Rolle der Biodetergenzien ist nicht sehr viel bekannt, allerdings weiss man, dass die Wachstumsrate durch die Größe der Oberfläche zwischen Wasser und Öl limitiert wird (Shreve et al., 1995). Dabei können Polymere mit hohem Molekulargewicht als Emulgatoren wirken. Wenn organische Moleküle irreversibel an Oberflächen gebunden sind, ist ihre Biodegradation inhibiert (Van Delden et al., 1998). Biotenside steigern das Wachstum auf gebundenen Substraten durch die Loslösung dieser von den Oberflächen oder durch die Erhöhung ihrer Wasserlöslichkeit (Deziel et al., 1996). Die Grenzspannung erniedrigende Biotenside können also gebundene hydrophobe Moleküle mobilisieren und sie so für die Biodegradation zugänglich machen. Eine wichtige Rolle spielen deshalb Biotenside auch beim mikrobiellen Abbau von Ölverschmutzungen was sie auch für die Biotechnologie und den technischen Umweltschutz interessant macht.

Biotenside können weiterhin die Anheftung und Loslösung von Mikroorganismen an und von hydrophoben Oberflächen regulieren. Sezernierte Biotenside können einen Film auf Grenzflächen ausbilden, um bestimmte Mikroorganismen zu stimulieren, sich an diese Grenzflächen anzuheften. In manchen Fällen wird allerdings auch die Anheftung anderer Mikroorganismen inhibiert (Neu, 1996).

Für Rhamnolipid-Biotenside konnte außerdem gezeigt werden, dass sie bei der bakteriellen Eliminierung von Schwermetallen, wie Cadmium, Blei und Zink, aus kontaminierten Böden eine Rolle spielen (Herman et al., 1995). So können Rhamnolipide zur Eliminierung der Cadmium-Toxizität entscheidend beitragen, wenn sie im Vergleich zum Cadmium einer 10-fach höheren Konzentration zugegeben werden (Sandrin et al., 2000). Dieser Mechanismus beruht vermutlich auf einer Kombination von Cadmium-Komplexierung und einer Interaktion mit der Zelloberfläche zur Cadmiumaufnahme.

Für verschiedene Lipopeptid-Biotensiden konnten antibiotische Wirkungen gezeigt werden (Marahiel et al., 1993; Tsuge et al., 1996; Yakimov et al., 1995). Hierzu gehören zum Beispiel die zyklischen Lipopeptide Surfactin oder Subtilisin von *B. subtilis* (Peypoux et al., 1999), und das Dekapeptid Gramacidin S von *B. brevis* (Krauss and Chan, 1983). Diese Beispiele zeigen, dass Biotenside eine wichtige Rolle für die produzierenden Mikroorganismen spielen. So besitzen die verschiedenen Biotenside auch unterschiedliche

biologische Funktionen. Sie bieten den Mikroorganismen also Vorteile in ihren spezifischen ökologischen Nischen.

## 1.6 Glykosyltransferasen

Bei der Biosynthese von Glykolipid-Biotensiden sind Mitglieder der Familie der Glykosyltransferasen essentiell.

Glykosyltransferasen katalysieren den Transfer eines aktivierten Zuckerrestes (z.B. UDP-Glukose oder GDP-Mannose) auf ein geeignetes Akzeptormolekül, welches ein Lipid, Protein oder Polysaccharid sein kann. Diese Enzyme sind sowohl in Prokaryoten, als auch in Eukaryoten zu finden und sind üblicherweise für den Glykosyldonor und das Akzeptorsubstrat spezifisch.

Die Glykosyltransferasen konnten aufgrund von Aminosäuresequenzähnlichkeiten in verschiedene Familien klassifiziert werden (Coutinho et al., 2003) (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>). Zur Zeit beinhaltet die Datenbank mehr als 12000 bekannte und potentielle Glykosyltransferasesequenzen, welche in 78 Familien unterteilt werden können. Einige Familien setzen sich aus einer großen Anzahl von Sequenzen unterschiedlichen Ursprungs und unterschiedlicher Funktionen zusammen. Die Glykosyltransferase-Familie 2 ist die am besten untersuchte Familie und besteht aus mehr als 3500 Sequenzen aus Tieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien. Mindestens 12 Funktionen konnten bereits charakterisiert werden. Zu dieser Familie gehören Cellulose Synthasen, Chitin Synthasen, Mannosyltransferasen, Glukosyltransferasen, Galactosyltransferasen und Rhamnosyltransferasen. Im Gegensatz dazu stehen monofunktionale Familien, welche nur wenige Sequenzen aufweisen (Breton et al., 2005).

Eine Vorhersage der Substratspezifität von Glykosyltransferasen aufgrund von Sequenzhomologien ist problematisch, da es viele Beispiele für nah verwandte Sequenzen mit unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten gibt. Die Sequenz-basierende

Klassifizierung integriert deshalb auch strukturelle und mechanistische Betrachtungen für jede Familie (Coutinho et al., 2003). Ein Großteil der Enzyme kann zwei Superfamilien zugeordnet werden (Hu and Walker, 2002). Diese beiden Gruppen werden zum Einen durch die Konfiguration der funktionellen Gruppe des Donormoleküls und zum Anderen durch die Konfiguration der entstehenden glykosidischen Bindung definiert. Bei den nichtinvertierenden Glykosyltransferasen wird das Asymmetriezentrum am Zucker beibehalten, während bei den invertierenden Glykosyltransferasen die sterische Konfiguration während der Reaktion umgedreht wird (Kapitonov and Yu, 1999). Es konnte für invertierende Glykosyltransferasen eine konservierte Domäne identifiziert werden, die vermutlich für die Erkennung des aktivierten Zuckers benötigt wird. Sie wurde „Nucleotide Recognition Domain 1 $\beta$ “ (NRD 1 $\beta$ ) genannt. In nichtinvertierenden Glykosyltransferasen konnte eine abweichende Form dieser Erkennungsregion (NRD 1 $\alpha$ ) gefunden werden. Die zentrale Domäne ist bei beiden Nukleotid-Erkennungsbereichen ähnlich. Eine dritte konservierte Domäne (NRD 2) ist für membrangebundene Glykosyltransferasen charakteristisch. Alle drei Domänen konnten in Glykosyltransferasen von Archaea, Eubakterien und Eukaryoten identifiziert werden (Kapitonov and Yu, 1999). Außerdem muss jede Glykosyltransferase eine eigene Domäne für die Substrat-Erkennung besitzen, da die Glykosylierungsreaktionen auch bezüglich der Substraterkennung hoch spezifisch sind.

Eine wichtige Funktion spielen Glykosyltransferasen bei der Modifizierung sekretierter Proteine. Glykane, die aus einem naszierenden Protein und einem glykosidisch gebundenem Oligosaccharid bestehen, werden für die richtige Faltung, Qualität und Verteilung des Proteins benötigt. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt die Prozessierung der Proteine, und im Golgi-Apparat gibt es weitere Modifikationen. Aufgrund dieser terminalen Glykosylierung findet man eine große Funktionsvielfalt bei reifen Glykoproteinen vor (Helenius and Aebi, 2001).

Bei Glykoproteinen kann zwischen O-gebundenen und N-gebundenen Oligosacchariden unterschieden werden. Die Bindung der O-gebundenen Oligosaccharide findet an der Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin-, Threonin- oder Hydroxylysin statt. Die

Zuckerketten sind meistens sehr kurz, die Bindung an das Akzeptorprotein erfolgt in einem Schritt, und jeder Zuckertransfer wird durch unterschiedliche Glykosyltransferasen katalysiert. Die Synthese der N-gebundenen Oligosaccharide ist komplexer und beginnt an der cytosolischen Seite des ER durch den Transfer der Zuckerreste an ein Dolicholphosphat. Sobald zwei N-Acetylglukosamine und fünf Mannosereste angehängt sind, dreht sich dieser Komplex in das Lumen des ER. Von Lipid-Vorgängern werden sieben weitere Zuckerreste angehängt, wodurch das Oligosaccharid reift und dann vom Dolichol-Donorlipid auf den Asparaginrest des naszierenden Proteins übertragen wird (Aebi and Hennet, 2001).

Glykosylierungsreaktionen von Glykolipiden und die daran beteiligten Glykosyltransferasen sind hochspezifisch hinsichtlich der Substrat- und Akzeptorlipiderkennung. Für einige Glykosyltransferasen konnte ein hochkonserviertes Aminosäure-Motiv identifiziert werden (D...D(x)D), welches mit UDP interagiert (Charnock et al., 2001). Jedoch konnte bisher noch keine Nukleotid-Bindungsdomäne für eine Glykolipid-Glykosyltransferase identifiziert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Gene bekannt, die an der Biosynthese der Ustilipide oder der Ustilaginsäuren beteiligt sind. Im Fall der Ustilipide wurde deshalb nach einer Glykosyltransferase gesucht, die den Transfer der GDP-Mannose an das Erythritol katalysiert. Die Bildung dieses Disaccharids ist die für dieses Glykolipid charakteristische Reaktion. Für die Ustilaginsäuren wurde nach einem Enzym gesucht, welches die Cellobioseeinheit auf den Lipidanteil überträgt und vermutlich auch für die Bindung zwischen den beiden Glukose-Einheiten verantwortlich ist.

Eine zweite interessante Enzymfamilie für die Synthese der Ustilaginsäure ist die Familie der Cytochrom P450-Monooxygenasen, da diese für die Hydroxylierung der Palmitinsäure verantwortlich sein können.

## 1.7 Cytochrom P450-Monooxygenasen

Die Ustilaginsäure besitzt einen langen Fettsäureanteil, der zwei benachbarte Hydroxylgruppen trägt. Da bekannt ist, dass die Hydroxylierung von Fettsäure von der Familie der Cytochrom P450-Monooxygenasen katalysiert wird, stellen diese Enzyme eine weitere interessante Enzymfamilie dar, die an der Synthese der Ustilaginsäure beteiligt sein könnte.

Bei P450-Cytochromen handelt es sich um eine Superfamilie, die aus Häm-Proteinen besteht und bei einer Bindung von Kohlenstoffmonoxid an die reduzierte Form ein Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzt. Diese Enzymklasse katalysiert Hydroxylierungsreaktionen hydrophober Verbindungen unter Verbrauch eines der beiden Sauerstoffatome aus molekularem Sauerstoff. Das andere Sauerstoffatom wird durch die Oxidation von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  zu Wasser reduziert. Die Reduktionsäquivalente werden von einer NADPH-Reduktase bereitgestellt. Eukaryotische P450-Monooxygenasen sind meistens in der Membran des ER verankert (Iida et al., 2000) und unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität. Es sind bisher über 500 verschiedene Cytochrom P450 Enzyme bekannt (P450-Webseite von Dr. Watson).

Wenn verschiedene n-Alkan-assimilierende Hefen (*Candida maltosa* und *Yarrowia lipolytica*) mit Alkanen als Kohlenstoffquelle gefüttert werden, werden Enzyme der CYP52 Familie induziert. Diese katalysieren möglicherweise die terminale Monooxygenierung von n-Alkanen und Fettsäuren (Iida et al., 1998). *U. maydis* besitzt 20 potentielle Cytochrom P450-Monooxygenasen. Neben den Glykosyltransferasen standen diese P450-Monooxygenasen im Mittelpunkt unseres Interesses, da sie ebenfalls eine essentielle Rolle in der Biosynthese der Ustilaginsäure spielen konnten.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der biologischen Funktionen der beiden von *U. maydis* unter Stickstoffmangelbedingungen in großen Mengen produzierten extrazellulären Glykolipide. Nach Aufklärung der Biosynthesewege sollte versucht werden, durch Ausschalten von Schlüsselenzymen Mutanten zu erzeugen, die keine Glykolipide mehr produzieren können.

Da zu Beginn dieser Arbeit das Genom von *Ustilago maydis* bereits sequenziert war, wurde ein revers genetischer Ansatz ausgewählt. Hierzu sollten mit Hilfe von Sequenzvergleichen Gene identifiziert werden, die an der Biosynthese beteiligt sein könnten. Von diesen Kandidatengenen sollten Deletionsstämme mittels homologer Rekombination generiert werden, um diese auf ihre Fähigkeit, Glykolipide zu produzieren, zu überprüfen. Dabei standen solche Gene im Mittelpunkt des Interesses, deren Deletion zu einem kompletten Verlust der Produktion eines der beiden Glykolipide oder zu veränderten Glykolipidformen führen. Mit Hilfe dieser Deletionsstämme sollte es möglich sein, den beiden Glykolipidklassen bestimmte biologische Funktionen zuzuordnen.

## 2. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Genen, die an der Biosynthese der beiden von *U. maydis* sekretierten Glykolipide beteiligt sind. Neben der Untersuchung des Biosyntheseweges war die Aufklärung der biologischen Funktionen ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt. Hierzu sollten Deletionsmutanten, die einen Defekt in der Glykolipidproduktion zeigten, auf ihren Phänotyp untersucht und charakterisiert werden.

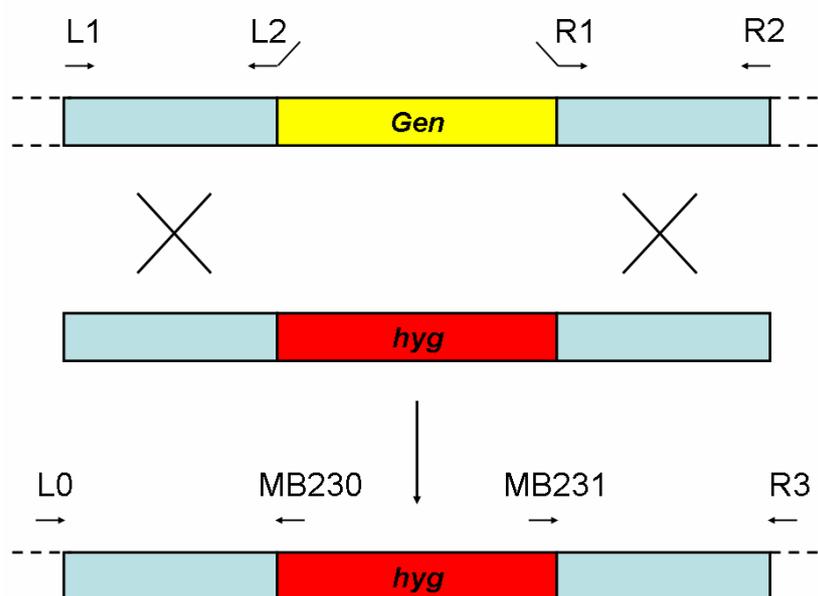
### 2.1 Identifizierung von potentiellen Glykolipidbiosynthesegenen

Um Gene zu identifizieren, die an der Biosynthese der Ustilipide und der Ustilaginsäure beteiligt sind, wurde ein revers genetischer Ansatz gewählt. Durch homologe Rekombination sollte das Kandidatengen durch eine Hygromycinresistenzkassette ersetzt werden. Zwei unterschiedliche Enzymklassen standen im Mittelpunkt der Analyse, die Glykosyltransferasen und die Cytochrom P450-Monooxygenasen. Glykosyltransferasen sind vermutlich für die Übertragung der Mannose auf das Erythritol der Ustilipide und für die Bildung der glykosidischen Bindung zwischen der Cellobiose und der Hydroxypalmitinsäure in Ustilaginsäure verantwortlich. Außerdem wurde vermutet, dass eine Cytochrom P450-Monooxygenase an der Hydroxylierung der Palmitinsäure während der Ustilaginsäurebildung beteiligt ist.

Die *U. maydis* Genomsequenz wurde nach potentiellen Glykosyltransferasen und Cytochrom P450-Monooxygenasen durchsucht. Es zeigte sich, dass es über 40 potentielle

Glykosyltransferasen und 20 potentielle Cytochrom P450-Monooxygenasen in *Ustilago maydis* gibt.

Durch Homologievergleiche konnten zahlreiche Kandidatengene identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um Glykosyltransferasen, welche nicht an bereits bekannten Prozessen, wie Polysaccharidbildung, Proteinglykosylierung im ER oder Bildung von Sphingolipiden beteiligt sind.



**Abb. 6: Knock-out Strategie.** Dargestellt sind die für die Amplifikation eingesetzten Primer L1 und L2, für das stromaufwärts liegende Fragment, und R1 und R2, für das stromabwärts liegende Fragment. Nach dem *SfiI*-Verdau und der Ligation mit der ebenfalls mit *SfiI* hydrolysierten Hygromycinresistenzkassette wurde das komplette Deletionskonstrukt mit den beiden Außenprimern L1 und R2 mittels PCR angereichert und in *U. maydis* Protoplasten transformiert. Die Transformanten wurden anschließend durch PCR mit den Kontrollprimern L0 und MB230 (linke Flanke) und MB231 und R3 (rechte Flanke) überprüft.

Zur Herstellung von Deletionsmutanten wurden jeweils etwa 1 kb grosse flankierende Fragmente stromaufwärts und stromabwärts des ausgewählten Gens mittels PCR amplifiziert. Die aus dem Gen herauslesenden Primer (L2 und R1) trugen zudem eine

spezifische *Sfi*I Erkennungssequenz, über die die Flanken mit einer Hygromycinresistenzkassette ligiert wurden. Dies erlaubt die einfache Herstellung der Deletionskonstrukte durch gerichtete Ligation (Kamper, 2004). Das daraus resultierende etwa 4 kb große Deletionskonstrukt wurde anschließend unter Verwendung der beiden Außenprimer (L1 und R2) amplifiziert. Diese amplifizierte DNA wurde in die beiden haploiden und kompatiblen Wildtypstämme FB1 (*a1 b1*) und MB215 (*a2 b13*) transformiert. Der Stamm MB215 wurde verwendet, da er besonders große Mengen an Ustilipiden und Ustilaginsäuren unter Stickstoffmangelbedingungen synthetisiert (Josephs, 2004). Durch homologe Rekombination sollte das ausgewählte Gen durch die Hygromycinresistenzkassette ersetzt werden, die als Selektionsmarker dient (Abb. 6).

Die erhaltenen Transformanten wurden zunächst durch zwei Kontroll-PCRs und anschließend durch Southern-Blot-Analysen auf ihre Richtigkeit überprüft (Daten nicht gezeigt). Für die Kontroll-PCRs wurden Primer verwendet, die aus der Hygromycinkassette herauslesen (MB230 und MB231), und Oligonukleotide, welche außerhalb der linken und der rechten Flanke liegen (L0 und R3) (Abb. 6). Hierdurch kann nicht nur untersucht werden, ob die Resistenzkassette in das Genom eingebaut wurde, sondern auch, ob die Integration an der richtigen Position erfolgt ist.

Die Tabelle 1 zeigt eine Auflistung der Glykosyltransferasen, deren Gene durch homologe Rekombination deletiert wurden.

Nach Kontroll-PCR bestätigte Deletionsmutanten wurden zunächst mikroskopisch überprüft. Unter den 9 getesteten Glykosyltransferasemutanten zeigte nur eine ( $\Delta 105_{150}$ ) unter dem Mikroskop bei Stickstoffmangel einen sichtbaren Defekt (Tab. 1). Ustilaginsäuren und Ustilipide fallen in Flüssigmedium als lange, nadelförmige Strukturen aus. Die Deletionsmutante  $\Delta 105_{150}$  zeigte deutlich veränderte, kleinere Strukturen (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 1: Auflistung von potentiellen Glykosyltransferasegenen, für die Deletionsstämme erzeugt wurden.**

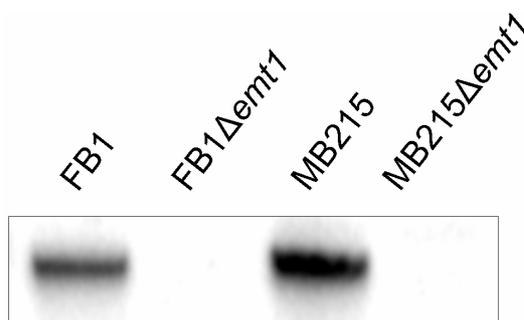
| MIPS (alte und neue Nomenklatur) | Beschreibung                            | Homolog                                             | Phänotyp*    |
|----------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------|
| 13_630 (00605)                   | Glykosyltransferase                     | <i>S. cerevisiae</i> : ALG8 ( $3 \times 10^{-17}$ ) | WT           |
| 154_170 (04353)                  | Glykosyltransferase                     | <i>B. cereus</i> ATCC ( $2 \times 10^{-14}$ )       | WT           |
| 159_110 (04496)                  | UDP-Glukose-Ceramid-Glykosyltransferase | <i>P. pastoris</i> ( $1 \times 10^{-68}$ )          | WT           |
| 2_1550 (00167)                   | Glykosyltransferase                     | <i>Nostoc sp.</i> PCC ( $4 \times 10^{-35}$ )       | WT           |
| 230_230 (06120)                  | Glykosyltransferase                     | <i>G. zeae</i> ( $1 \times 10^{-111}$ )             | WT           |
| 88_90 (02624)                    | Glykosyltransferase                     | <i>S. pombe</i> : OCH1 ( $7 \times 10^{-16}$ )      | WT           |
| 126_390 (03779)                  | Galactinol-Synthase                     | <i>M. sativa</i> : corF ( $1 \times 10^{-14}$ )     | WT           |
| 34_320 (01009)                   | Glykogen-Synthase                       | <i>A. nidulans</i> (0)                              | WT           |
| 105_150 (03117)                  | Glykosyltransferase                     | <i>S. natalensis</i> : PimK ( $7 \times 10^{-13}$ ) | kurze Nadeln |

\*WT: Kein Unterschied zur Glykolipidproduktion des Wildtyps.

Bei diesem Kandidaten handelt es sich um eine Glykosyltransferase, die Emt1 genannt wurde und Sequenzähnlichkeit zu prokaryotischen Enzymen besitzt. Zu den am nächsten verwandten Proteinen gehören Glykosyltransferasen von Actinomyceten. Diese sind an der Glykosylierung von Macrolidantibiotika beteiligt, wie zum Beispiel bei der Bildung von Amphotericin B in *Streptomyces nodosus*. Das AmphDI Protein katalysiert den Transfer eines Mycosaminrestes auf das Ringsystem (Caffrey et al., 2001)(Caffrey et al., 2001). Das GDP-aktivierte Mycosamin ist von GDP-Mannose abgeleitet. Deshalb war es denkbar, dass Emt1 bei der Synthese der Ustilipide für die Übertragung der GDP-Mannose auf das Erythritol verantwortlich sein könnte.

## 2.2 Charakterisierung der $\Delta emt1$ Deletionsmutante

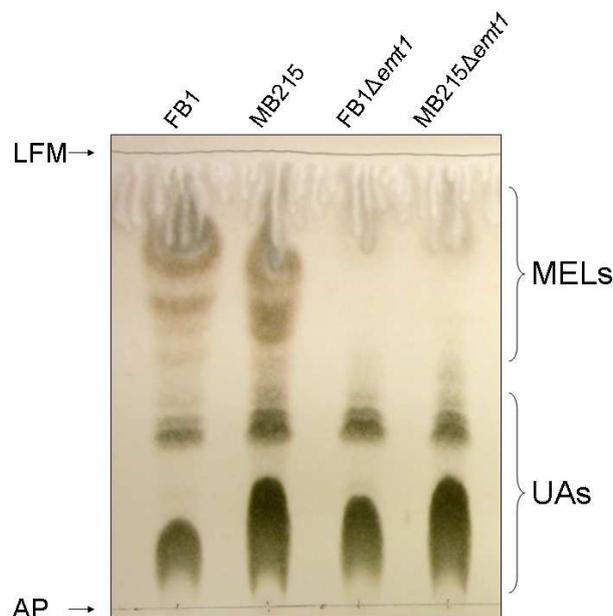
Um sicherzustellen, dass es sich bei der *emt1* Mutante um eine Deletionsmutante handelt, wurde sie durch Southern-Blot-Analysen überprüft (Abb. 7).



**Abb. 7: Southern-Blot Analysen der  $\Delta emt1$ -Mutanten.** Extrahierte genomische DNA der Wildtyp- und Deletionsstämme wurde mit *Bam*HI geschnitten und mit einer internen 1 kb *emt1* Sonde hybridisiert.

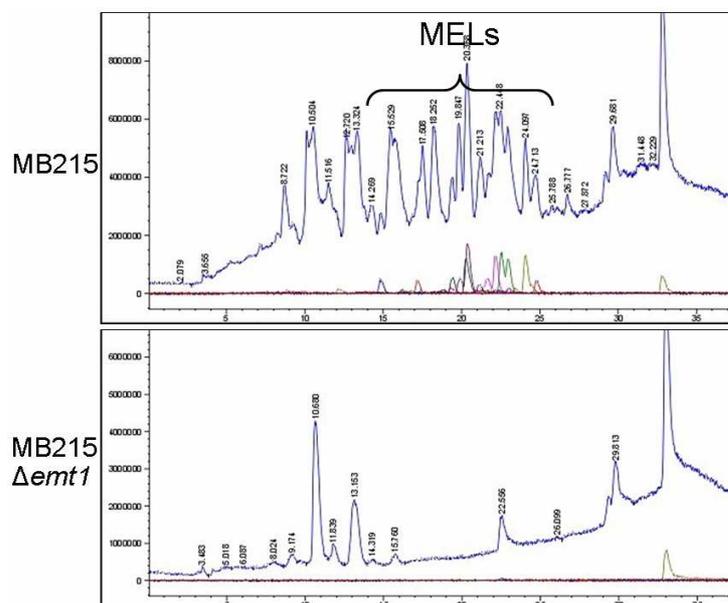
Als Sonde wurde ein internes Fragment des *emt1* ORFs gewählt und mit dem Blot hybridisiert. In den Wildtyp-DNA Spuren konnte wie erwartet eine 4,5 kb Bande identifiziert werden, während die beiden *emt1* Deletionsstämme keine Bande zeigten. Dies ließ den Schluss zu, dass in diesen Stämmen das *emt1* Gen durch die Hygromycinresistenzkassette ausgetauscht werden konnte.

Die Deletionsmutanten wurden auf ihre Glykolipidproduktion untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie (DC) (Abb. 8). Hierzu wurden Wildtypstämme (FB1 und MB215) und die  $\Delta emt1$  Deletionsstämme unter Stickstoffmangelbedingungen für 5 Tage angezogen. Nach einer Ethylacetatextraktion wurden die Glykolipide getrocknet, in Methanol aufgenommen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetropft. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Chloroform : Methanol : H<sub>2</sub>O (65:25:4) eingesetzt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Anisaldehyd (siehe M+M). Hierbei werden spezifisch die Zuckerreste angefärbt und somit nur die Glykolipide sichtbar gemacht.



**Abb. 8: Dünnschichtchromatographie zur Analyse der Glykolipidproduktion der  $\Delta emt1$  Deletionsstämme.** Ethylacetatextrakte von extrazellulären Glykolipiden wurden zur Analyse eingesetzt. Die Extrakte der beiden Wildtypstämme FB1 und MB215 besaßen sowohl die Mannosylerythritolipidbanden (MELs), als auch die Ustilaginsäurebanden (UAs). Die beiden *emt1* Deletionsmutanten sind nicht mehr in der Lage, MELs zu produzieren. Die UA-Produktion ist nicht beeinträchtigt (AP, Auftragspunkte; LFM, Laufmittelfront).

Es zeigte sich, dass die *emt1* Deletionsstämme einen kompletten Verlust der MEL-Produktion aufwiesen. In beiden Stämmen (FB1 und MB215) fehlten alle MEL-Banden, während die Ustilaginsäureproduktion keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte. Um zu überprüfen, ob es in den Deletionsstämmen tatsächlich zu einem vollständigen Verlust der MEL-Produktion gekommen ist, wurde eine Flüssigkeitschromatographie mit angeschlossener Massenspektrometrie (LC/MS) durchgeführt (Abb. 9). Zur Massentrennung wurden Quadrupolfilter verwendet. Die Quadrupol-Analysatoren bestehen aus vier Stabelektroden, die ein elektrisches Wechselfeld bilden. Ein Hochfrequenzfeld und ein Gleichstrompotential werden übereinander gelegt, wodurch einzelne  $m/z$ -Verhältnisse herausgefiltert werden können (Massenfilter).



**Abb. 9: LC/MS Untersuchungen der Mannosylerythritolipide (MELs).** Die MS-Analysen des Glykolipid-Ethylacetatextraktes der *emt1* Deletionsmutante zeigten, dass alle MEL-Modifikationsformen fehlen, während diese in dem Wildtyp-Extrakt gefunden wurden (dargestellt durch die farbigen Kurven).

Aus der Literatur waren bereits die Massen einiger MEL-Varianten bekannt und so konnte spezifisch nach ihnen gesucht werden (Kurz et al., 2003). Die Massenanalysen zeigten, dass alle bekannten MEL-Derivate in der MB215 $\Delta$ *emt1* Deletionsmutante fehlten.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass Emt1 an der Synthese von Ustilipiden beteiligt ist und dabei vermutlich für den Transfer der GDP-Mannose auf das Erythritol verantwortlich ist. Des Weiteren wurden die Mutanten auf ihren Phänotyp hinsichtlich ihrer Pathogenität überprüft. Es konnten hierbei keine Unterschiede zu den Wildtypstämmen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Fähigkeit, mit kompatiblen Stämmen zu kreuzen und ein infektiöses Dikaryon zu bilden, ist in den Glykosyltransferase-Deletionsmutanten also nicht beeinträchtigt.

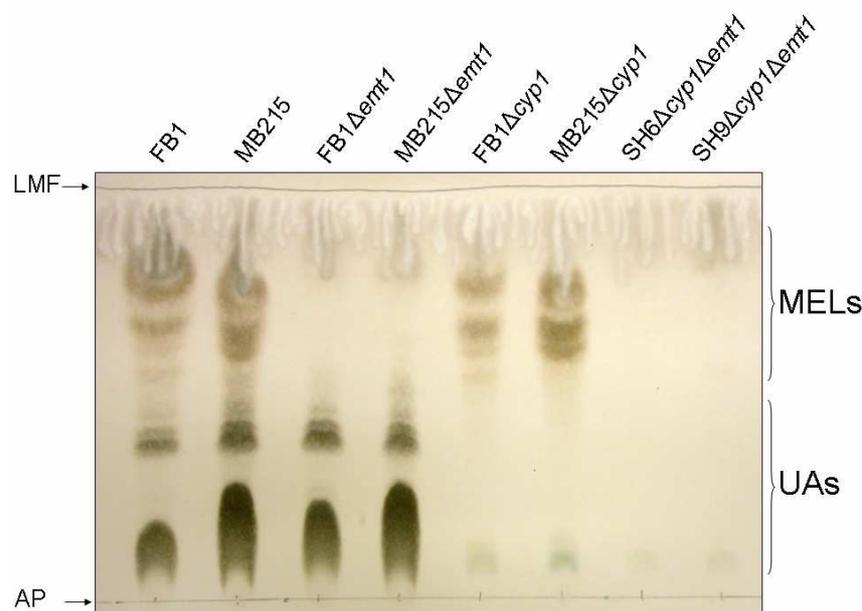
Eine zweite, für die Biosynthese vieler Sekundärmetaboliten interessante Enzymklasse stellen die Cytochrom P450-Monooxygenasen dar, da diese für den Transfer der terminalen

oder subterminalen Hydroxylgruppen auf die langkettige Fettsäure der Ustilaginsäure verantwortlich sein könnten. Von den 20 in der Genomsequenz vorhergesagten Monooxygenasen wurden einige Kandidaten nach Vergleichen mit der Genbank für eine Deletion ausgewählt. So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Deletionsstamm für das potentielle P450-Monooxygenasegen *66\_400* (*um01723*) generiert, der in der Glykolipidproduktion jedoch keinen veränderten Phänotyp zeigte.

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde von B. Teichmann das Gen *250\_130* (*cyp1*, *um06463*) ausgeschaltet. Durch Dünnschichtchromatographie konnte das Fehlen aller Ustilaginsäurebanden festgestellt werden, während die Produktion der MELs nicht beeinträchtigt war (Abb. 10) (Hewald et al., 2005). Auch diese Deletionsstämme wurden auf Pathogenität untersucht. Wie bei den  $\Delta emt1$  Stämmen konnte auch hier kein Unterschied zu den Wildtypstämmen festgestellt werden (Teichmann, 2005).

### 2.3 Herstellung einer $\Delta emt1\Delta cyp1$ Doppeldeletionsmutante

Um Doppelmutanten zu erhalten, die keines der beiden Glykolipide mehr sekretieren, wurde eine Kreuzung der beiden kompatiblen Stämme  $FB1\Delta emt1$  und  $MB215\Delta cyp1$  durchgeführt. Hierzu wurden Maispflanzen mit einem Gemisch dieser Deletionsstämme infiziert, so dass es zu einer Kreuzung in der Pflanze kommen konnte. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:4 sollte bei den Nachkommen ein kompletter Verlust der Glykolipidproduktion auftreten, da diese Nachkommen eine Deletion beider Gene (*emt1* und *cyp1*) aufweisen. Es wurden 12 Nachkommen auf ihre Glykolipidbiosynthese und ihren Kreuzungstyp (Daten nicht gezeigt) untersucht. Von den untersuchten Nachkommen zeigten vier den erwarteten Phänotyp (Abb. 10). Zur weiteren Charakterisierung wurden zwei Doppelmutanten ausgewählt, welche kompatible Kreuzungstypen aufwiesen.  $SH6\Delta emt1\Delta cyp1$  besitzt den Kreuzungstyp *a2 b1*, und  $SH9\Delta emt1\Delta cyp1$  zeigte den Kreuzungstyp *a1 b13*.

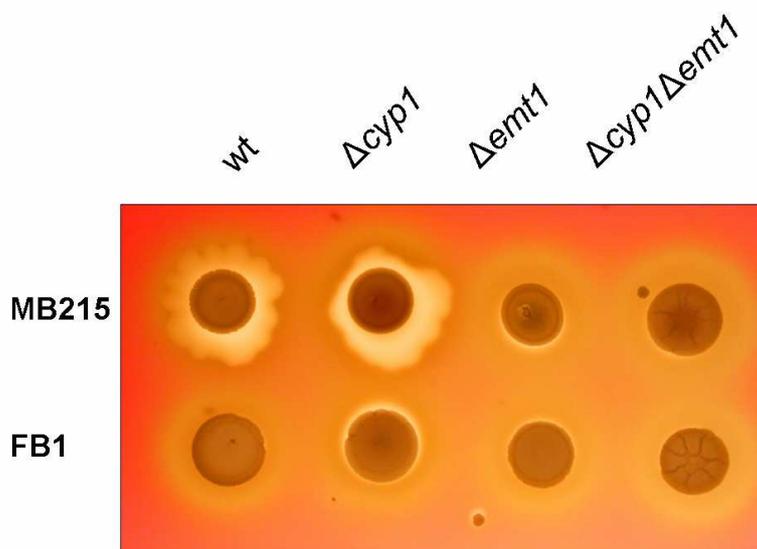


**Abb. 10: Nachweis der Glykolipidproduktion der Wildtypstämme, der Deletions- und Doppelmутanten mittels Dünnschichtchromatographie.** Die beiden Wildtypstämme zeigten Mannosylerythritollipid (MEL)- und Ustilaginsäureproduktion (UA). Der  $\Delta emt1$  Stamm zeigte nur noch UA-Produktion, während der  $\Delta cyp1$  Stamm nur noch MEL-Produktion aufwies. Doppelmутanten von *emt1* und *cyp1* produzieren keine extrazellulären Glykolipide mehr (AP, Auftragspunkte; LMF, Laufmittelfront).

## 2.4 Phänotyp von glykolipiddefizienten Mutanten

Mit Hilfe dieser Stämme konnte nun nach weiteren Phänotyp-Unterschieden gesucht werden, um Hinweise auf die biologischen Funktionen der Glykolipide zu erhalten. Aus der Literatur (Carillo et al., 1996) war bereits bekannt, dass Glykolipide aufgrund ihrer Oberflächenaktivität auf Blutagarplatten eine hämolytische Wirkung besitzen können. Hierbei kommt es zum Platzen der Erythrozyten, wodurch ein klarer Hof um die Kolonie entsteht. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis des Hämolysetests. Es wurden die beiden

Wildtypstämme FB1 und MB215 und die jeweiligen Deletions- und Doppelmutanten untersucht.

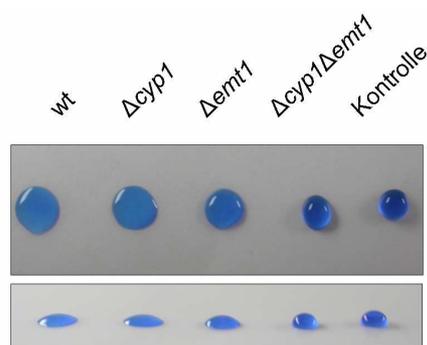


**Abb. 11: Untersuchung der hämolytischen Aktivität der Wildtypstämmen, der Deletions- und Doppelmutanten.** Die Hämolyse wurde nach zwei Tagen Inkubation auf Blutagarplatten untersucht. Bei den Wildtypstämmen und den  $\Delta cyp1$  Deletionsmutanten konnte eine deutliche Hämolyse beobachtet werden.

Die beiden Wildtypstämme zeigten Hämolyse, wobei die hämolytische Wirkung von MB215 wesentlich stärker war als die von FB1. Dieses Ergebnis korrelierte mit der erhöhten Glykolipidproduktion von MB215 im Vergleich zu der von FB1 (Hewald et al., 2005). Die Deletion von *cyp1* bewirkte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Wildtypstämmen. Im Gegensatz dazu zeigten die  $\Delta emt1$  und die  $\Delta emt1\Delta cyp1$  Stämme nur noch eine sehr schwache Hämolyse auf den Blutagarplatten. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Ustilaginsäure keine signifikante hämolytische Aktivität aufweist, während die Mannosylerythritollipide eine starke hämolytische Wirkung besitzen. Die Restaktivität der  $\Delta emt1$  und der  $\Delta emt1\Delta cyp1$  Stämme ist vermutlich auf andere Substanzen, wie hämolytisch wirkende Proteine, zurückzuführen.

Glykolipide setzen als amphipathische Substanzen die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten herab. Dies wurde in einem Test für die zur Verfügung stehenden Deletions- und Wildtypstämme überprüft (Abb. 12) (Kuiper et al., 2004).

Hierzu wurden die verschiedenen MB215 Deletionstämme, der Wildtypstamm und eine Doppelmutante ( $\text{SH6}\Delta\text{emt1}\Delta\text{cyp1}$ ) unter Stickstoffmangel für fünf Tage inkubiert. Von den Kulturüberständen der verschiedenen Ansätze wurde jeweils ein Aliquot abgenommen, mit dem Farbstoff Xylencyanol angefärbt und auf eine hydrophobe Oberfläche (Parafilm) getropft. Der Farbstoff hatte hierbei keine Auswirkungen auf die Form der Tropfen und wurde nur zur besseren Visualisierung verwendet. Als Kontrolle wurde zudem frisches Medium getropft.

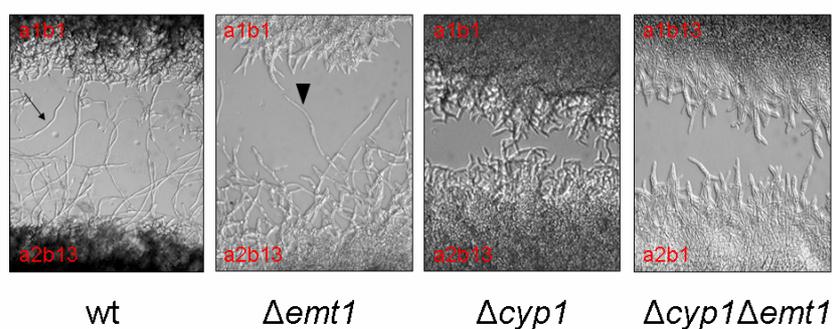


**Abb. 12: Untersuchung der Oberflächenaktivität der sekretierten Glykolipide.** Extrazelluläre Glykolipide sind in der Lage, die Oberflächenspannung von Kulturüberständen zu reduzieren. Kulturüberstände wurden auf eine hydrophobe Oberfläche getropft (Parafilm). Bei einer flachen Tropfenform liegt eine niedrige Oberflächenspannung und bei einer runden Tropfenform liegt eine hohe Oberflächenspannung vor. Frisches Medium diente als Kontrolle. Der Überstand der *emt1* Deletionsmutante zeigte eine sichtbare Reduzierung der Oberflächenspannung, allerdings bewirkten die Überstände der *cyp1* Deletionsmutante und des Wildtypstammes eine deutlich stärkere Reduzierung der Oberflächenspannung.

Es zeigte sich, dass der Kulturüberstand des Wildtyp-Stammes MB215 eine sehr niedrige Oberflächenspannung aufwies. Der Überstand einer  $\Delta\text{cyp1}$  Kultur zeigte eine fast ebenso starke Reduzierung. Im Gegensatz dazu konnte man für den Überstand des  $\Delta\text{emt1}$  Stammes nur eine leichte reduzierte Oberflächenspannung erkennen. Der Überstand der

Doppelmutante, wie auch das glykolipidfreie Medium wiesen eine normale, starke Oberflächenspannung auf. Die Ustilaginsäure hat also eine geringere Auswirkung auf die Oberflächenspannung, als die sekretierten Mannosylerythritollipide.

Eine weitere potentielle Funktion der amphiphatischen Glykolipide könnte in einer Unterstützung der Ausbreitung der hydrophoben Pheromone über größere Distanzen auf hydrophoben Oberflächen liegen (wie zum Beispiel auf der Blattoberfläche von Maispflanzen)). Dies wurde in einem Konfrontationstest überprüft (Snetselaar et al., 1996). Hierzu wurden angereicherte Kulturen der zu untersuchenden Stämme auf Wasseragar (hydrophil) aufgetropft und mit Paraffinöl (hydrophob) bedeckt. Dies sollte die natürliche Umgebung widerspiegeln, da dort ähnliche Grenzflächen zwischen der hydrophoben Pflanzenoberfläche und dem mit Wasser gefüllten Blattwirtel zu finden sind. Die kompatiblen Wildtyp- und Deletionsstämme wurden in  $<1$  mm Abstand angeordnet. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse nach einer 16-stündigen Inkubation. Die beiden kompatiblen Wildtypstämme FB1 und MB215 bildeten deutlich Konjugationshyphen aus, die auf dem Wasseragar gerichtet aufeinander zuwachsen können (Abb. 13, Pfeil).



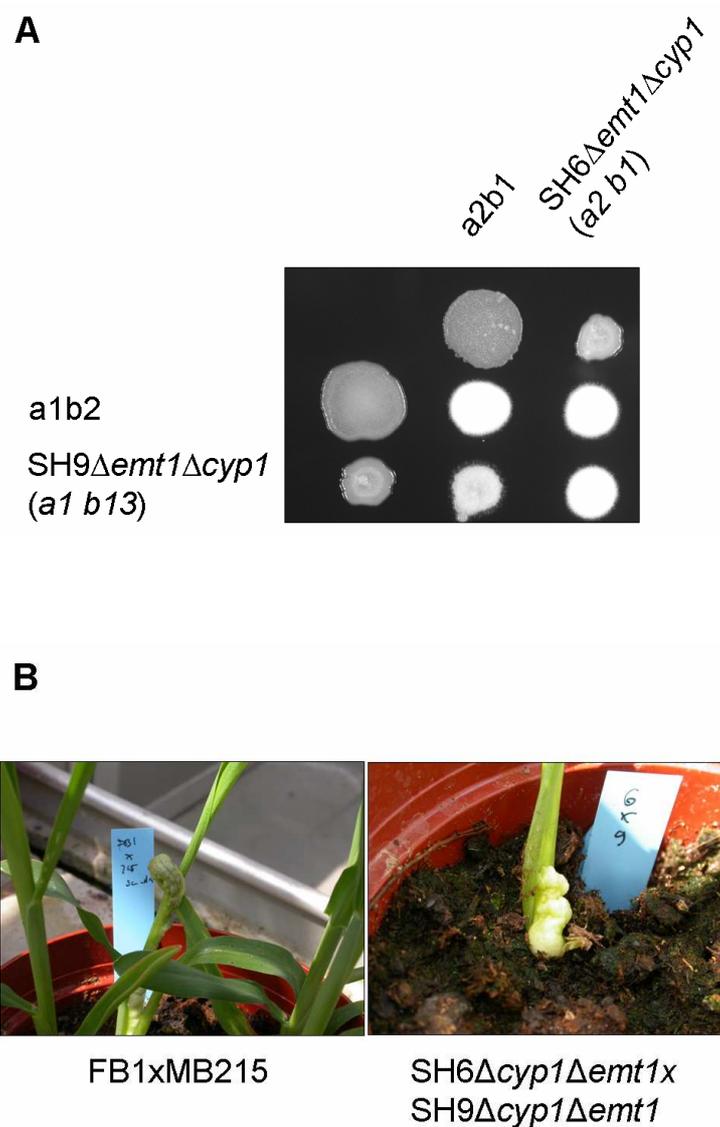
**Abb. 13: Konfrontationstest zur Überprüfung der Pheromonausbreitung über große Distanzen.** Kompatible Stämme wurden auf Wasseragar in sehr geringer Entfernung aufgetropft und mit Paraffinöl bedeckt. Die Ausbildung von gerichteten Konjugationshyphen konnte nur bei den Wildtypstämmen (FB1 und MB215) und den  $\Delta emt1$  Stämmen beobachtet werden.

Die beiden kompatiblen *emt1* Deletionsstämme waren ebenfalls in der Lage, aufeinander zuwachsende Konjugationshyphen auszubilden (Abb. 13, Pfeilspitze), welche jedoch im Vergleich zu den Hyphen der Wildtypstämme im Bereich der Kolonien verklebt erschienen.

Die beiden kompatiblen *cyp1* Deletionsstämme waren nicht mehr in der Lage, aufeinander zuwachsende Konjugationshyphen auszubilden.

Interessanterweise zeigten die beiden Doppeldeletionsmutanten, welche ebenfalls unterschiedliche Kreuzungstypen besitzen, eine Kombination beider Phänotypen. So konnten die Konjugationshyphen nicht gerichtet aufeinander zuwachsen, und die schienen genauso verklebt zu sein, wie die Hyphen der  $\Delta emt1$  Mutanten. Diese Ergebnisse zeigten, dass der Ustilaginsäure vermutlich eine größere Bedeutung für die Ausbreitung der hydrophoben Pheromone über große Distanzen zukommt als den Ustilipiden.

Bei Kreuzungs- und dem Pathogenitätstests konnten keinerlei Unterschiede zwischen den Wildtypstämmen FB1 und MB215 und den kompatiblen Doppelmutanten SH6 $\Delta emt1\Delta cyp1$  und SH9 $\Delta emt1\Delta cyp1$  festgestellt werden (Abb. 14 A; 14 B und Tab. 2). So waren die Doppelmutanten genauso wie die Wildtypstämme in der Lage, auf aktivkohlehaltigen Agarplatten miteinander zu kreuzen, was an dem gebildeten weißlichen Myzel, den dikaryotischen Filamenten, zu erkennen war. Zudem gab es keine signifikanten Unterschiede bei der Tumorausbildung. Der Verlust der Glykolipidproduktion scheint also keine Auswirkungen auf die Pathogenität zu haben.



**Abb. 14: Überprüfung des Kreuzungsverhaltens der Doppeldeletionsmutanten (A).** Die Doppeldeletionsmutanten zeigten keinen Unterschied in ihrem Kreuzungsverhalten im Vergleich zu den Wildtypstämmen. Sie sind immer noch kreuzungsfähig. **Test auf Pathogenität (B).** Die Doppelmutanten zeigten im Vergleich zu den Wildtypstämmen keine Unterschiede in der Tumorausbildung.

Tab. 2: Übersicht über den Pathogenitätstest der beiden Wildtypstämme FB1 und MB215 und der Doppeldeletionstämmen  $\Delta emt1\Delta cyp1$ .

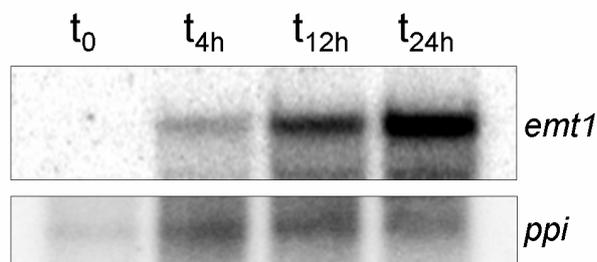
| Stämme                                                        | Anzahl der infizierten Pflanzen | Anzahl der Tumore |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| FB1 x MB215                                                   | 15                              | 6 (40 %)          |
| FB1 $\Delta emt1$ x MB215 $\Delta emt1$                       | 25                              | 10 (40 %)         |
| FB1 $\Delta cyp1$ x MB215 $\Delta cyp1$                       | 16                              | 9 (56 %)          |
| FB1 $\Delta emt1\Delta cyp1$ x MB215 $\Delta emt1\Delta cyp1$ | 32                              | 12 (37 %)         |

## 2.5 Die Expression der Glykolipidbiosynthesegene ist unter Stickstoffmangelbedingungen stark induziert

Da Emt1 eine essentielle Rolle bei der Ustilipid-Biosynthese spielt, sollte durch Northern-Blot Analysen überprüft werden, ob *emt1* unter Stickstoffmangelbedingungen, also unter Glykolipidproduktionsbedingungen, überexprimiert wird. Hierzu wurde der Stamm MB215 verwendet. MB215 Wildtyp-Zellen wurden zunächst in einem Vollmedium bis zu einer OD von 0,4 angezogen und dann in ein Stickstoffmangelmedium überführt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die RNA extrahiert. Als Sonde wurde ein internes 1 kb Fragment aus dem *emt1* ORF gewählt.

Das *emt1* Gen (*105\_150*, *um03117*) wird in Vollmedium nicht exprimiert, jedoch konnte bereits nach vier Stunden Inkubation unter Stickstoffmangel eine deutliche Induktion festgestellt werden, die sich nach 24 Stunden noch wesentlich verstärkte (Abb. 15). Als

Kontrolle wurde eine Sonde gegen den ORF des konstitutiv exprimierten peptidyl-prolyl *cis-trans* Isomerase-Gens (*ppi*) eingesetzt.



**Abb. 15: Northern-Blot Analysen des *emt1* Gens.** MB215 Wildtypzellen wurden in ein stickstofffreies Medium überführt. Die RNA wurde zu den aufgeführten Zeitpunkten extrahiert. Als Sonde wurde ein internes 1 kb *emt1* Fragment verwendet. Als Kontrolle diente die Expression des konstitutiv exprimierten *ppi* Gens (peptidyl-prolyl *cis-trans* Isomerase).

Neben *emt1* wird auch das P450-Monooxygenasegen *cyp1* unter Stickstoffmangel stark exprimiert (Daten nicht gezeigt). Um weitere potentielle Kandidatengene zu identifizieren, die an der Glykolipidbiosynthese beteiligt sind, wurden in Zusammenarbeit mit der AG Kämper (MPI, Marburg) DNA-Microarrayanalysen durchgeführt. Hierzu wurde RNA aus dem Stamm MB215 extrahiert, nachdem er für 24 h unter Stickstoffmangel angezogen wurde. Durch Vergleich mit dem Expressionsmuster in Gegenwart einer Stickstoffquelle konnten Gene identifiziert werden, die eine starke Induktion unter Stickstoffmangelbedingungen aufwiesen (Tab. 3). Diese Gene sind potentielle Kandidaten, da sie aufgrund ihres Expressionsmusters an der Glykolipidbiosynthese beteiligt sein können. Interessanterweise wies *emt1* die stärkste Induktion aller auf dem Microarray vertretenen Gene auf (25,48 x).

Neben einer Cytochrom P450-Monooxygenase (*250\_90*, *um06459*), die in enger Nachbarschaft zu dem bereits identifizierten P450-Enzym Cyp1 (*250\_130*, *um06463*) liegt, zeigte eine weitere Glykosyltransferase eine starke Induktion (*242\_560*, *um06334*).

**Tab. 3: Microarrayanalysen zur Identifizierung weiterer Gene, die an der Glykolipidbiosynthese beteiligt sein können.**

| Induction | ORF     | Annotation                                                                           |
|-----------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 25,48     | 105_150 | PIMK PROTEIN (Glycosyltransferase)                                                   |
| 20,07     | 250_90  | CYTOCHROME P450 3A31 (EC 1.14.14.1) (CYP3A31) (P450 SH3A-1).                         |
| 18,53     | 140_240 | PEPTIDE TRANSPORTER MTD1.                                                            |
| 16,57     | 94_320  | MEMBRANE PROTEIN (TRANSPORTER?) DEHYDRATION INDUCED                                  |
| 16,47     | 154_90  | SEXUAL DIFFERENTIATION PROCESS PROTEIN ISP4.                                         |
| 16,40     | 160_60  | ALPHA-GALACTOSIDASE (EC 3.2.1.22). (Melibiase) Secreted                              |
| 16,21     | 248_290 | DOPAMINE DEHYDROGENASE, CELLOBIOSE OXIDASE (?)                                       |
| 15,06     | 148_340 | ROT1 SUPPRESSOR OF TOR2 MUTATIONS, SIMILAR TO UM05717                                |
| 14,93     | 227_290 | GLUTAMATE DECARBOXYLASE (EC 4.1.1.15).                                               |
| 14,52     | 154_320 | EXO-1,3-BETA-GLUCANASE PRECURSOR (EC 3.2.1.58).                                      |
| 14,04     | 89_140  | NO SIMILARITY                                                                        |
| 13,59     | 112_140 | CIPC (A. NIDULANS) CONCANAMYCIN INDUCED                                              |
| 13,48     | 91_110  | LYSOZYME                                                                             |
| 12,53     | 27_270  | D-ARABINITOL 2-DEHYDROGENASE [RIBULOSE FORMING] (EC 1.1.1.250) (ARDH).               |
| 12,49     | 73_40   | PREDICTED HYDROLASE/ACYLTRANSFERASE SIMILAR TO AKT2 AK-TOXIN (ALTERNARIA)            |
| 12,30     | 262_10  | NO SIMILARITY                                                                        |
| 11,74     | 242_590 | ENDOGLUCANASE?                                                                       |
| 11,54     | 208_80  | ROT1 SUPPRESSOR OF TOR2 MUTATIONS, SIMILAR TO UM04171                                |
| 11,28     | 70_600  | METABOLITE TRANSPORT PROTEIN. (potential glycerophosphoinositol permease)            |
| 11,08     | 247_490 | ACYL-COA DEHYDROGENASE FAMILY PROTEIN.                                               |
| 10,89     | 169_270 | DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHASE (EC 4.2.1.52) (DHDP5).                                  |
| 10,79     | 89_20   | CHITIN DEACETYLASE PRECURSOR (EC 3.5.1.41).                                          |
| 10,33     | 172_380 | STOMATIN-LIKE PROTEIN.                                                               |
| 10,15     | 79_1070 | NO SIMILARITY                                                                        |
| 10,14     | 63_280  | SUGAR TRANSPORTER STL1.                                                              |
| 10,13     | 25_10   | BETA-GLUCAN SYNTHESIS-ASSOCIATED PROTEIN SKN1.                                       |
| 9,97      | 250_80  | CONSERVED FUNGAL PROTEIN (NOT IN S.CEREV) MEIOTIC EXPRESSION UPREGULATED PROTEIN 26. |
| 9,96      | 141_150 | MITOCHONDRIAL DICARBOXYLATE CARRIER.                                                 |
| 9,53      | 2_650   | PURINE PERMEASE.                                                                     |
| 9,00      | 103_650 | PUTATIVE 5 NUCLEOTIDASE FAMILY PROTEIN,                                              |
| 8,66      | 225_40  | AMINO ACID TRANSPORTER.                                                              |
| 8,62      | 157_480 | G1/S-SPECIFIC CYCLIN PCL1 (CYCLIN HCS26). PCL2                                       |
| 8,54      | 188_310 | CARBOXYLIC ACID TRANSPORT PROTEIN.                                                   |
| 8,47      | 103_380 | N AMINO ACID TRANSPORT SYSTEM PROTEIN (METHYLTRYPTOPHAN RESISTANCE PROTEIN).         |
| 8,42      | 71_190  | 4-COUMARATE:COA LIGASE (EC 6.2.1.12).                                                |
| 8,23      | 115_290 | XYNA_ASPAK ENDO-1,4-BETA-XYLANASE A PRECURSOR (XYLANASE A) (1,4-BETA-D-XYLAN         |
| 8,14      | 72_180  | CYANATE HYDRATASE (EC 4.2.1.104) (CYANASE) (CYANATE LYASE) (CYANATE HYDROLASE).      |
| 7,90      | 7_120   | PUTATIVE GTP CYCLOHYDROLASE, RIBOFLAVIN BIOSYNTHESIS.                                |
| 7,42      | 79_960  | ACYL-COA OXIDASE (EC 1.3.3.6) (AT4G16760/DL4405C).                                   |
| 7,42      | 242_560 | EGGHEAD PROTEIN (ZESTE-WHITE 4 PROTEIN). (Glycosyltransferase)                       |
| 7,36      | 52_200  | ACYL-COA DEHYDROGENASE, SHORT-CHAIN SPECIFIC,                                        |

Von diesen und anderen Kandidatengenen, die möglicherweise an der Glykolipidbildung beteiligt sein könnten, wurden Knock-out-Stämme hergestellt. Tabelle 4 zeigt eine Auflistung der Gene, die aufgrund der Microarraydaten in *U. maydis* deletiert wurden. Alle in dieser Tabelle aufgelisteten Deletionsstämme zeigten keinen signifikanten Phänotyp, und die Glykolipidproduktion war nicht beeinträchtigt.

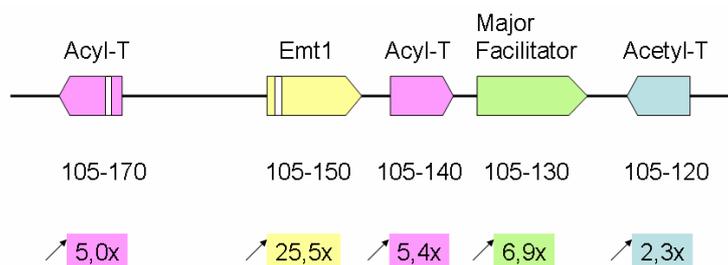
Tab. 4: Liste deletierter Gene, die aufgrund der Microarray-Analysen ausgewählt wurden.

| Proteinfamilie      | MIPS (alte und neue Nomenklatur) | Beschreibung                                                                       | Induktion | Phänotyp* |
|---------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
| Glykosyltransferase | 242_560 (06334)                  | Egghead-Protein                                                                    | 7,42 x    | WT        |
| Dehydrogenase       | 27_270 (06061)                   | D-Arabinol 2-Dehydrogenase                                                         | 12,53 x   | WT        |
| Acyltransferase     | 73_40 (04759)                    | Acyltransferase                                                                    | 12,49 x   | WT        |
| Glucanase           | 154_320 (04364)                  | Exo-1,3-beta-Glucanase                                                             | 14,52 x   | WT        |
| 5'Nucleotidase      | 103_650 (03076)                  | 5'Nucleotidase (möglicherweise in die Degradation externer UDP-Glukose involviert) | 9 x       | WT        |

\*WT: Kein Unterschied zur Glykolipidproduktion des Wildtyps.

## 2.6 Identifizierung eines MEL-Biosynthese-Clusters

Bei der Auswertung der Microarray Daten fiel auf, dass neben dem am stärksten induzierten Gen *emt1* (ORF *105\_120*) vier weitere, direkt benachbarte Gene unter diesen Bedingungen hochreguliert werden. Hierbei handelte es sich um einen Major Facilitator (*105\_130*, *um03115*), zwei potentielle Acyltransferasen (*105\_140*, *um03116* und *105\_170*, *um03119*) und eine Acetyltransferase (*105\_120*, *um03114*). Diese Gene zeigten eine zwei- bis siebenfache Erhöhung der Expression (nicht gezeigt).

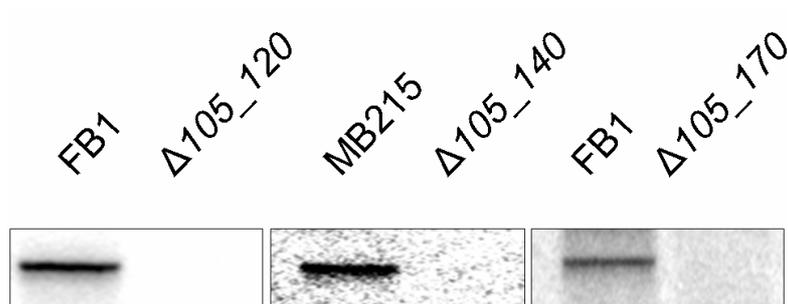


**Abb. 16: Identifizierung eines Mannosylerythritollipid (MEL)-Clusters.** Alle Gene, die an der Mannosylerythritollipidbiosynthese beteiligt sind, sind unter Stickstoffmangelbedingungen mindestens um das zweifache hochreguliert. Der ORF *105\_160*, der der Genomsequenz vorhergesagt wurde, zeigt keine Expression und ist vermutlich auf einer fehlerhaften Annotation zurückzuführen.

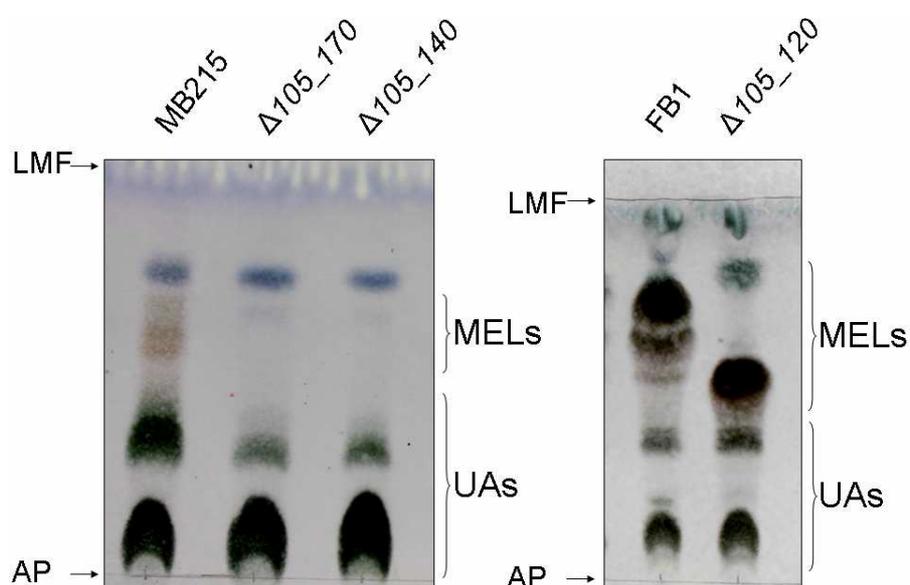
Diese Ergebnisse deuteten auf einen Gen-Cluster hin, der für die Biosynthese der Ustilipide benötigt wird (Abb. 16). Um dies zu überprüfen, wurden von diesen Genen Deletionsmutanten erzeugt und mittels Southern-Blot Analysen überprüft. Für alle Gene mit Ausnahme von *105\_130* gelang es, entsprechende Knock-out-Stämme herzustellen (Abb. 17).

Für den Major Facilitator konnte jedoch bislang kein Deletionsstamm erzeugt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Deletion auf die Zellen letal wirkt, da der Major Facilitator als Transporter bei der Sekretion der MELs eine Rolle spielen könnte. In diesem Fall müsste man annehmen, dass es beim Ausfall dieses Exportsystems zu einer toxischen Anreicherung der oberflächenaktiven MEL-Glykolipide innerhalb der Zellen kommt.

Die Deletionsstämme wurden auf ihre Glykolipidproduktion untersucht. Die beiden Acyltransferase-Deletionsstämme  $\Delta 105_140$  und  $\Delta 105_170$  haben spezifisch die Fähigkeit der MEL-Produktion verloren, zeigten aber keinen Phänotyp hinsichtlich der UA-Produktion (Abb. 18, links). Interessanterweise wies der Acetyltransferase-Deletionsstamm ( $\Delta 105_120$ ) eine Veränderung im MEL-Bandenmuster auf (Abb. 18, rechts).



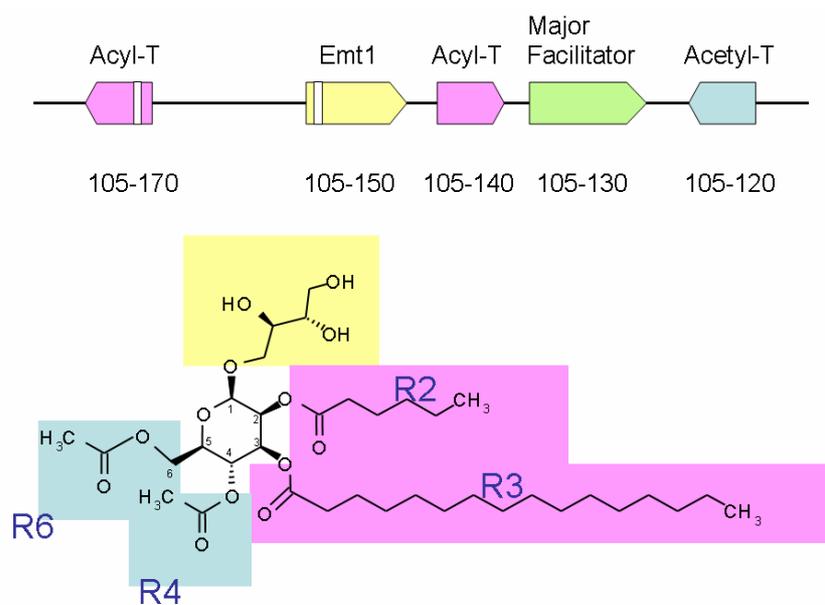
**Abb. 17: Southern-Blot Analysen der Mannosylerythritollipid (MEL)-Cluster Gene.** Extrahierte genomische DNA der Wildtyp- und Deletionsstämme wurden mit *Bgl*II ( $\Delta 105-120$ ), *Stu*I ( $\Delta 105-130$ ), *Hpa*I ( $\Delta 105-140$ ) und *Eco*RI ( $\Delta 105-170$ ) geschnitten und jeweils mit einer internen Sonde hybridisiert.



**Abb. 18: Analyse der Glykolipidproduktion der Deletionsstämme des Mannosylerythritollipid-Clusters.** Ethylacetatextrakte von extrazellulären Glykolipiden wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Extrakte der beiden Wildtypstämme FB1 und MB215 zeigten sowohl die Mannosylerythritollipidbanden (MEL), als auch die Ustilaginsäurebanden (UA). Die beiden Acyltransferase-Deletionsmutanten *105\_140* und *105\_170* zeigten keine MEL-Produktion mehr, während die UA-Produktion nicht beeinträchtigt war. Bei der *105\_120* Acetyltransferase-Deletionsmutante konnte bei den MELs ein verändertes Bandenmuster beobachtet werden. So verschwanden ein Teil der Banden, während die am langsamsten laufende unterste MEL-Bande besonders intensiv war. Auch hier war die UA-Produktion nicht betroffen (AP, Auftragspunkte; LMF, Laufmittelfront).

Diese Ergebnisse führten zu dem Modell, dass die beiden postulierten Acyltransferasen 105\_140 und 105\_170 für den Transfer der beiden längeren Fettsäuren an R2 und R3 auf die Mannose verantwortlich sind, wobei bisher noch nicht gezeigt werden konnte, welche Acyltransferase für welche Fettsäure zuständig ist. Ohne diese Acylierungen kann es anscheinend nicht zu einer nachweisbaren Sekretion von MEL-Glykolipiden kommen.

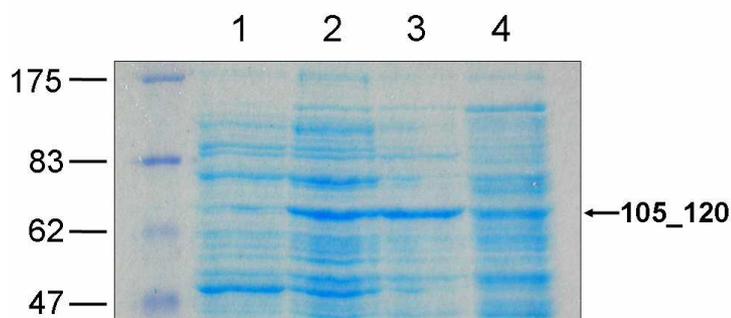
Interessanterweise führt die Deletion des Acetyltransferasegens *105\_120* nicht zu einem kompletten Verlust der MEL-Produktion, sondern zu einem veränderten Bandenmuster. Dies deutet daraufhin, dass dieses Enzym den Transfer von einer oder von beiden Acetylgruppen auf die Position R4 und R6 der Mannose katalysiert. Fehlt die Acetyltransferase, ist die Zelle anscheinend noch in der Lage, deacetylierte MEL-Formen zu sezernieren. Die Abbildung 19 fasst dieses Modell zusammen.



**Abb. 19: Überblick über die möglichen Funktionen der verschiedenen Gene des Mannosylerythritolglykolipid-Clusters.** Emt1 (105\_150) ist höchstwahrscheinlich für die Verknüpfung der Mannose mit dem Erythritol verantwortlich (gelb unterlegt). Die beiden Acyltransferasen 105\_140 und 105\_170 katalysieren für den Transfer der beiden Fettsäuren (violett unterlegt), und die Acetyltransferase 105\_120 bewirkt den Transfer der Acetylgruppen auf das Mannosylerythritolgrundgerüst (blau unterlegt). Der Major Facilitator 105\_130 ist vermutlich für den Export der MELs aus der Zelle verantwortlich.

## 2.7 Nachweis der enzymatischen Aktivität der Acetyltransferase 105\_120

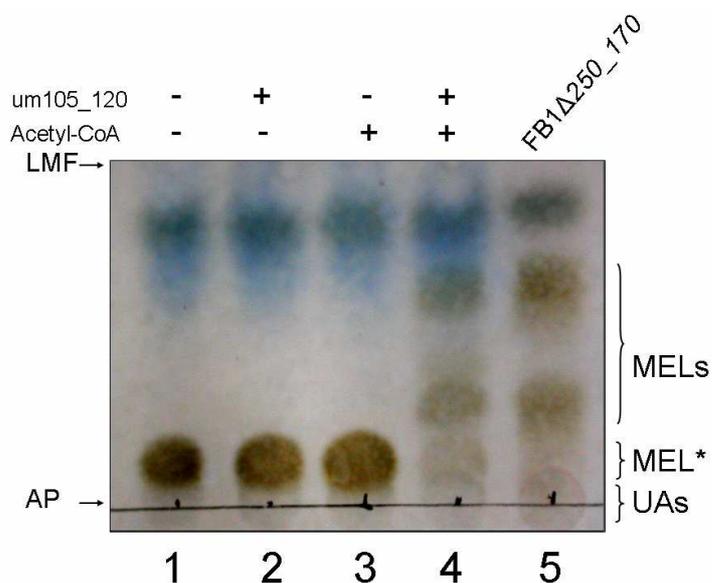
Die Frage, ob es sich bei dem Genprodukt des ORFs *105\_120* wirklich um eine Acetyltransferase handelt, die direkt den Transfer der Acetylgruppen auf das Mannosylerythritolgerüst katalysiert, sollte durch einen Enzymassay bestätigt werden. Hierzu wurde der ORF von *105\_120* amplifiziert und in den Expressionsvektor pET-15b kloniert und in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert. Die Expression der Acetyltransferase wurde für zwei Stunden mit IPTG induziert. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Zelllysate für den Enzymassay eingesetzt (Kimura et al., 1998). Zur Überprüfung der Überexpression und des Aufschlusses wurden die Extrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Hierbei zeigte sich, dass sich ein Großteil des Proteins im Zellpellet befand (Abb. 20). Es wurde dennoch mit dem Zelllysate weitergearbeitet, das eine deutlich sichtbare Proteinbande der erwarteten Größe aufwies.



**Abb. 20: Überexpression von *105\_120* in *E. coli*.** Die Proteine wurden auf einer 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt, die Markerpositionen sind in Kilodaltons angegeben. Spur 1 zeigt den Rohextrakt aus nicht induzierten Zellen, Spur 2 zeigt den Rohextrakt von induzierten Zellen, in Spur 3 wurde das Pellet von induzierten Zellen aufgetragen, und in Spur 4 wurde der lösliche Zellextrakt von induzierten Zellen aufgetragen.

Für die Acetyltransferaseassays wurden die deacetylierten MELs (MEL\*) als Substrat und Acetyl-CoA eingesetzt. Zur Gewinnung der deacetylierten MEL-Formen wurden Nachkommen einer Kreuzung von MB215 $\Delta$ *cyp1* und FB1 $\Delta$ 105\_120 eingesetzt. Diese Doppelmutanten produzieren nur deacetylierte MELs und außerdem keine Ustilaginsäuren mehr. Die deacetylierten Glykolipide wurden durch Ethylacetatextraktion gewonnen und zusammen mit Zellysaten der in *E. coli* überproduzierten Acetyltransferase eingesetzt. Neben dem 105\_120 Zellysat wurde zur Kontrolle Zellysat eingesetzt, das aus untransformierten, induzierten Zellen gewonnen wurde. Sofern 105\_120 aktiv ist, sollte das entsprechende Zellysat das eingesetzte Substrat durch die Übertragung der Acetylgruppen modifizieren und damit die Wildtyp MEL-Formen erzeugen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C (Kimura et al., 1998) wurden die Glykolipide durch eine Ethylacetatextraktion isoliert und mittels einer Dünnschichtchromatographie analysiert. Hierzu wurde ein hydrophoberes Laufmittel verwendet, welches für die Auftrennung von Ustilipiden geeigneter ist (Abb. 21). Das MEL-Bandenmuster des Ethylacetatextraktes des Acetyltransferaseassays entsprach dem des Wildtypextraktes.

Die Kontrollen zeigten kein Wildtypbandenmuster, weil hier keine Acetylgruppen auf das Mannosylerythritolgrundgerüst übertragen werden. Durch diesen Acetyltransferaseassay konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Protein 105\_120 um eine Acetyl-CoA abhängige Acetyltransferase handelt, die in den Biosyntheseweg der MELs eingeordnet werden kann. Dabei ist 105\_120 an der Acetylierung des Mannosylerythritols an den Positionen R4 und R6 beteiligt. Das entsprechende Gen *105\_120* wurde deshalb *mat1* genannt (Mannosylerythritol-Acetyltransferase).



**Abb. 21: Dünnschichtchromatographische-Analysen der Produkte des Acetyltransferase-Assays.** Spur 5 zeigt den Ethylacetatextrakt von extrazellulären Glykolipiden eines für die Ustilagsäure- (UA) defizienten Deletionsstammes ( $\Delta 250_{170}$ ), Spur 4 zeigt den Ethylacetatextrakt der modifizierten Mannosylerythritollipid- (MEL) Formen inkubiert mit dem Enzymextrakt von induzierten *E. coli* Zellen und Acetyl-CoA, in Spur 3 wurde der Ethylacetatextrakt der modifizierten MEL-Formen aufgetragen, welcher mit dem Kontrolleextrakt und Acetyl-CoA inkubiert wurde. Spur 2 zeigt den Ethylacetatextrakt der modifizierten MEL-Formen, die mit dem Enzymextrakt von induzierten *E. coli* Zellen aber ohne Acetyl-CoA inkubiert wurde. Spur 1 zeigt die deacetylierte Form von MEL ohne Zugabe von Enzym und Acetyl-CoA (AP, Auftragspunkte; LMF, Laufmittelfront).

## 2.8 Massenspektrometrische Bestimmung der deacetylierten Glykolipide

Die Ergebnisse aus dem Enzymassay sollten zusätzlich noch durch eine massenspektrometrische Untersuchung (MS) bestätigt werden. Es sollte überprüft werden, ob es sich bei den sezernierten, modifizierten Glykolipidformen der  $\Delta mat1$  Deletionsmutante tatsächlich um komplett deacetylierte MEL-Formen handelt, oder ob

möglicherweise nur eine Acetylgruppe betroffen ist. Es wurden Tandemanalysen ( $MS^2$ - beziehungsweise  $MS^3$ ) durchgeführt, um durch Fragmentierung der Moleküle einen Aufschluss über die Identität der Seitengruppen zu erhalten. Bei  $MS^3$ -Analysen kann eine durch Fragmentierung erhaltene Masse für eine weitere Fragmentierung ausgewählt werden. Für die  $MS^2$ -Analysen wurde kein Quadrupolfilter eingesetzt, sondern eine Ionenfalle. Das Prinzip einer Ionenfalle ist ähnlich dem von Quadrupol-Analysatoren, wobei das Hochfrequenzfeld hier dreidimensional aufgebaut wird. Der Vorteil einer Ionenfalle gegenüber den Quadrupol-Analysatoren besteht darin, dass die zu bestimmende Masse über Tage hinweg in der Ionenfalle gefangen und gespeichert werden kann, bevor weitere Messungen an ihr durchgeführt werden. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden positiv geladene Ionen detektiert, wobei bei der Ionisation von Glykolipiden typischerweise ein  $Na^+$ -Ion mitfliegt ( $+Na^+$ ). Es wurde hierbei die Nanospray-Ionisation verwendet. Bei diesem Verfahren wird eine Lösung des Analyten bei Atmosphärendruck aus einer Kapillare in ein starkes elektrisches Feld versprüht, wodurch eine effektive Ionisierung und Ladungstrennung erfolgt.

Die Glykolipid-Ethylacetatextrakte des Stammes FB1 $\Delta cyp1$ , der keine UA, aber Wildtyp-MEL-Formen produziert, wurden mit Extrakten der Acetyltransferase-Deletionsmutante verglichen. Zur Vereinfachung der Analyse wurden solche Massen ausgewählt, von denen bekannt war, dass sie nur in einer bestimmten Form auftreten, und somit nicht verschiedenen Strukturen mit gleicher Gesamtmasse zugeordnet werden mussten (Tab. 5). Zudem wurden solche Wildtyp-MEL-Formen ausgesucht, die beide Acetylgruppen tragen, so dass für die Deletionsmutante Derivate erwartet wurden, denen beide Acetylgruppen fehlen. Dies entspricht einem Verlust von 84 Da. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass ein Massenvergleich der unterschiedlichen Ustilipid-Formen äußerst schwierig ist, da sechs Methylengruppen ebenfalls einer Masse von etwa 84 Da entsprechen. Allerdings unterscheidet sich die Masse von  $-C=O$  (28,0104 Da) von der Masse von  $-C_2H_4$  (28,0538 Da) in der zweiten Nachkommastelle. Mit Hilfe der FTMS ist es allerdings möglich, Massen bis auf die dritte Nachkommastelle zu bestimmen und damit direkt

zwischen der Masse zweier Acetylgruppen und der von drei Methylengruppen zu unterscheiden.

**Tab. 5: Für die MS<sup>3</sup>-Analysen ausgewählte Massen von Wildtypglykolipid- und Deletionsmutantenglykolipidextrakten.**

| Ustilipid <sup>a)</sup> | Summenformel                                    | M.W. <sup>b)</sup> | R2             | R3               | R4 | R6 | M. W. <sup>c)</sup><br>wt (+Na <sup>+</sup> ) | M. W. <sup>c)</sup><br>$\Delta mat1$<br>(+Na <sup>+</sup> ) |
|-------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|----------------|------------------|----|----|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Ustilipid A             | C <sub>36</sub> H <sub>64</sub> O <sub>13</sub> | 704                | C6             | C16              | Ac | Ac | 727                                           | 643                                                         |
| Ustilipid C             | C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>12</sub> | 634                | C6             | C14              | Ac | Ac | 699                                           | 615                                                         |
| Ustilipid               | C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>13</sub> | 592                | C2<br>C4<br>C6 | C12<br>C10<br>C8 | Ac | Ac | 615                                           | -                                                           |

<sup>a)</sup> Bezeichnung der Ustilipide A und C nach Kurz et al. (Kurz et al., 2003)

<sup>b)</sup> M. W.: Molekulargewicht

<sup>c)</sup> in rot sind die in dieser Arbeit näher untersuchten Massen angegeben

Zunächst wurde das Ustilipid C (Kurz et al., 2003) untersucht (Abb. 22). Ustilipid C besitzt eine Masse von 699 Da (+Na<sup>+</sup>), somit wurde für die  $\Delta mat1$ -Mutante eine Masse von 615 Da erwartet (+Na<sup>+</sup>) (siehe Tab. 5).

Durch Fragmentierung der 699 Da Masse konnten zwei Fragmente identifiziert werden. Bei dem 471 Da Fragment handelt es sich um das Glykolipid ohne C14-Fettsäurekette (R3) am Mannosylerythritolgerüst (Kurz et al., 2003). Außerdem konnte eine 639 Da Masse detektiert werden. Dieser Masse fehlen 60 Da, was der Abspaltung einer Acetylgruppe als Essigsäure entspricht. Da für Ustilipid C bekannt war, dass es an allen vier variablen Positionen (R2, R3, R4 und R6) acyliert ist, blieben somit zwei Positionen weiterhin unbekannt.

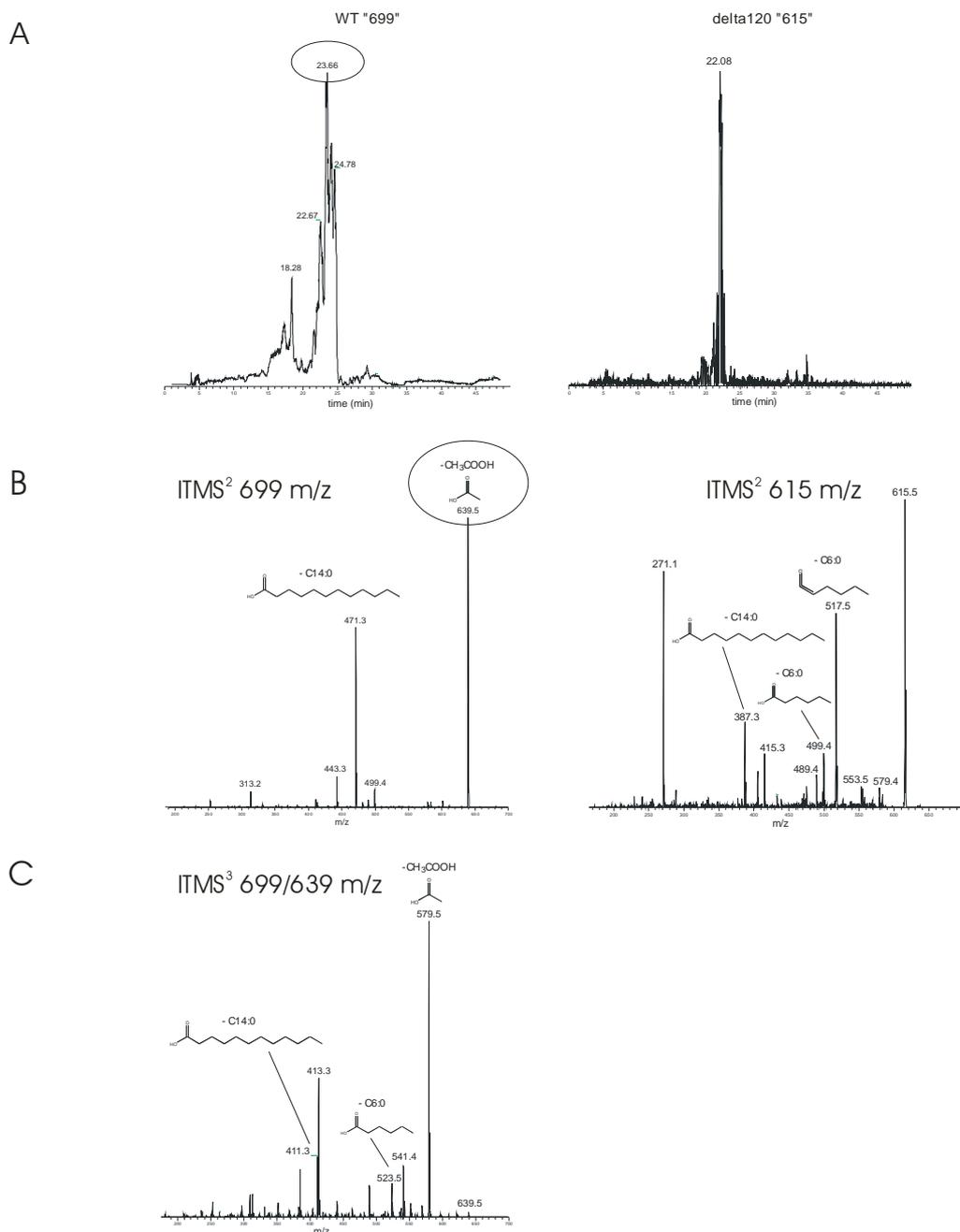
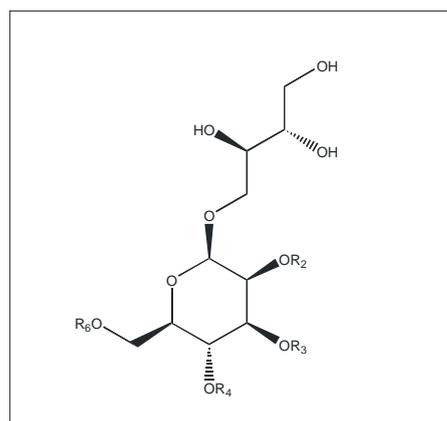


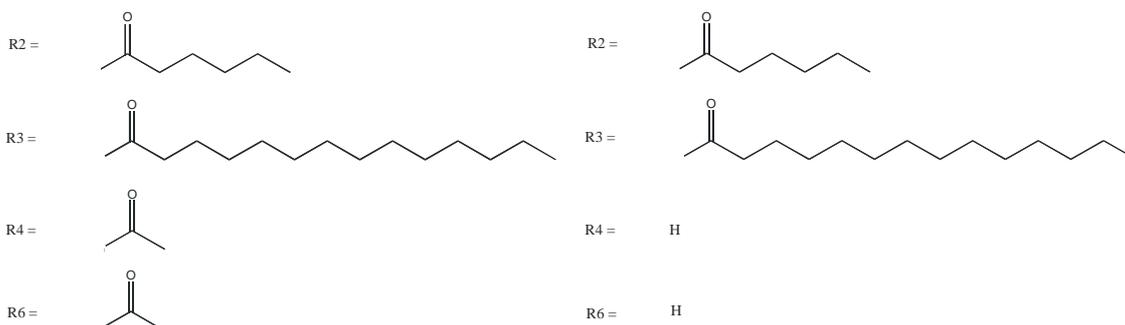
Abb. 22: MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Messungen der 699 Da Masse (Ustilipid C) des Wildtyp-Ethylacetatextraktes und der 615 Da Masse des  $\Delta mat1$  Deletionsmutanten-Extraktes. Es konnte für beide Massen eine komplette Strukturaufklärung erzielt werden.

Das 699 Da Wildtyp-Molekül trägt an der R2 Position eine C6-Fettsäurekette, an der R3 Position eine C14-Kette und an R4 und R6 jeweils eine Acetylgruppe (B und C). Für das 615 Da grosse Deletionsmutanten-Molekül konnten an der R2 und R3 Position die gleichen Fettsäureketten wie für die 699 Da Masse identifiziert werden (B). Die Positionen R4 und R6 liegen hierbei jedoch deacetyliert vor.



WT: 699 Da

Mutante: 615 Da



**Abb. 23: Vergleich der acetylierten und der deacetylierten Form des MEL mit der Masse 699 bzw. 615 Da.** Die Positionen R2 und R3 sind für beide Formen identisch. Während die Wildtyp-Form an R4 und R6 acetyliert ist, ist die Mutanten-Form an diesen Positionen deacetyliert. Bei dieser MEL-Form handelt es sich um eine komplett deacetylierte Ustilipid C-Form.

Aus diesem Grund wurde für die Masse 639 Da eine MS<sup>3</sup>-Analyse durchgeführt. Dabei konnte ein Fragment (413 Da) identifiziert werden, welcher die C14-Kette an der R3 Position fehlt. Zusätzlich konnte eine 541 Da Masse detektiert werden. Dieser Form fehlt

die C6-Kette an der R2 Position des Mannosylerythritolgerüsts. Außerdem konnte eine weitere Acetylgruppe abgespalten werden (579 Da Fragment) (Abb. 22, C). Damit konnte mit Hilfe der MS<sup>3</sup>-Analyse eine komplette Strukturaufklärung des MEL-Derivats mit der Masse 699 Da erfolgen. Es konnten alle vier Positionen eindeutig bestimmt werden (Abbildung 18). Die detektierten Fragmente stimmen mit der bereits beschriebenen MEL-Variante „Ustilipid C“ überein (Kurz et al., 2003).

Für die Acetyltransferase-Deletionsmutante wurde die Masse 615 Da untersucht, da dies der Masse des entsprechenden deacetylierten Ustilipids entspricht. Nach einer MS<sup>2</sup>-Analyse konnte eine vollständige Fragmentierung des Moleküls erzielt werden. Es konnten ebenfalls Moleküle identifiziert werden, von denen eine C14- und eine C6-Fettsäurekette abgespalten werden konnte (387 und 499 Da Fragmente) (Abb. 22, B). Aber es konnte keine Masse detektiert werden, die einer Mannosylerythritol-Form entspricht, der nur eine Acetylgruppe fehlt. Bei dieser MEL-Form (615 Da) handelt es sich also um komplett deacetyliertes Ustilipid C.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob eine deacetylierte Form von Ustilipid C mit der Masse 615 Da auch im Wildtypextrakt zu finden ist (Abb. 24 und 25). Die LC/MS Daten zeigten, dass zwar in beiden Extrakten eine Komponente mit dieser Masse zu finden ist, allerdings war die Retentionszeit dieser Peaks verschoben (16 min für den Wildtyp und 22 min für die Mutante), was die Schlussfolgerung zulässt, dass es sich hier um unterschiedliche Substanzen gleicher Masse handelt (Abb. 24).

Durch FTMS (Fourier-Transformation) war eine präzise Massenbestimmung (bis zur vierten Nachkommastelle) möglich. Sie betrug für den Wildtyp 615,2984 Da. Aufgrund dieser genauen Bestimmung konnte zunächst die Summenformel für dieses Molekül vorhergesagt werden (C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O<sub>13</sub>Na) (kalkulierte Masse: 615,2987 Da). Da 13 Sauerstoffatome enthalten sind, müssen in der Wildtypform alle vier variablen Positionen des Grundgerüsts acyliert sein. Die detektierte Masse für das Ustilipid der Mutante betrug 615,3724 Da, und die berechnete Summenformel war C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>O<sub>11</sub>Na (kalkulierte Masse: 615,3715 Da). In diesem Fall konnten nur 11 Sauerstoffatome nachgewiesen werden. Somit können nur zwei der vier variablen Positionen acyliert vorliegen.

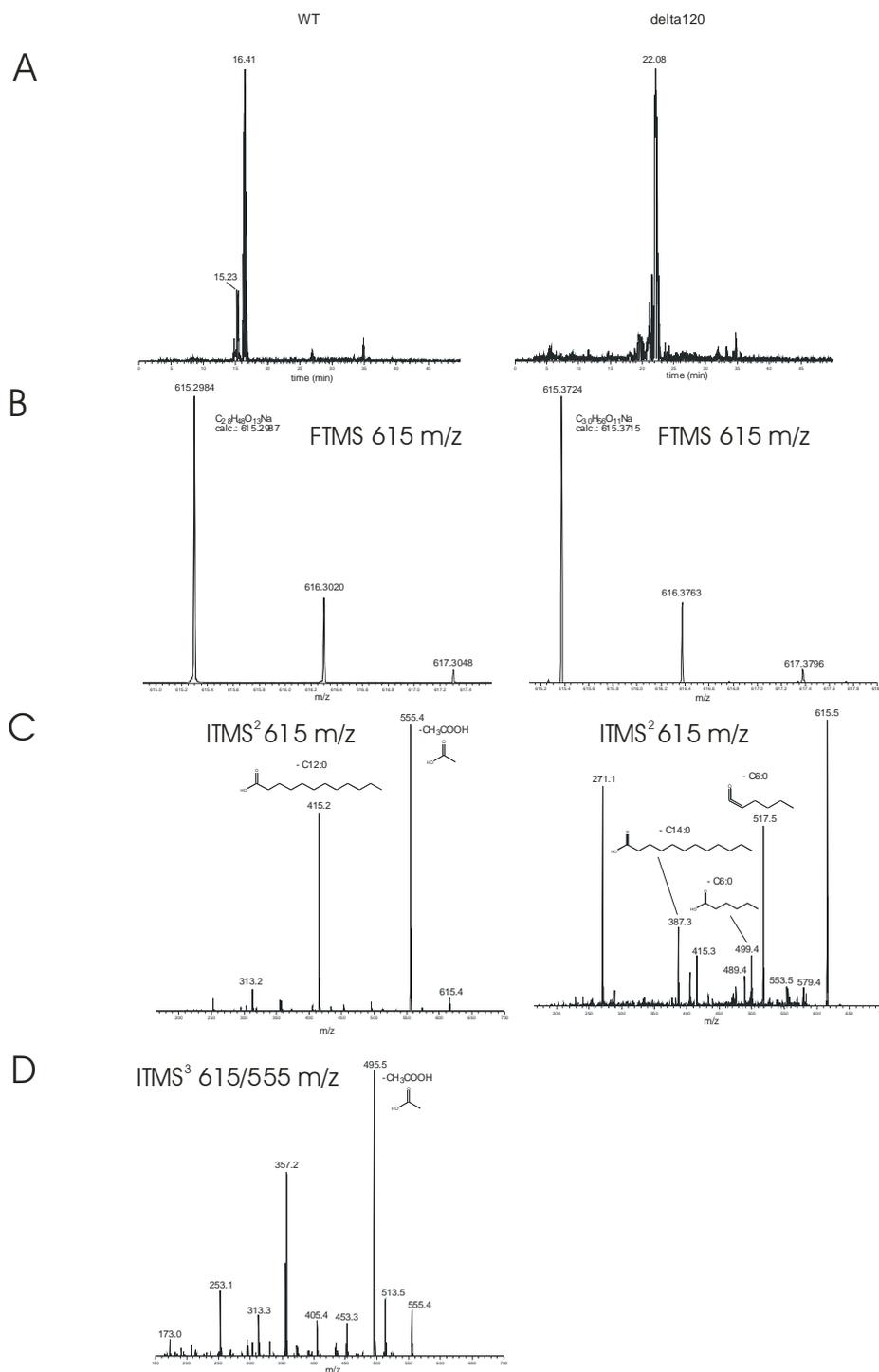
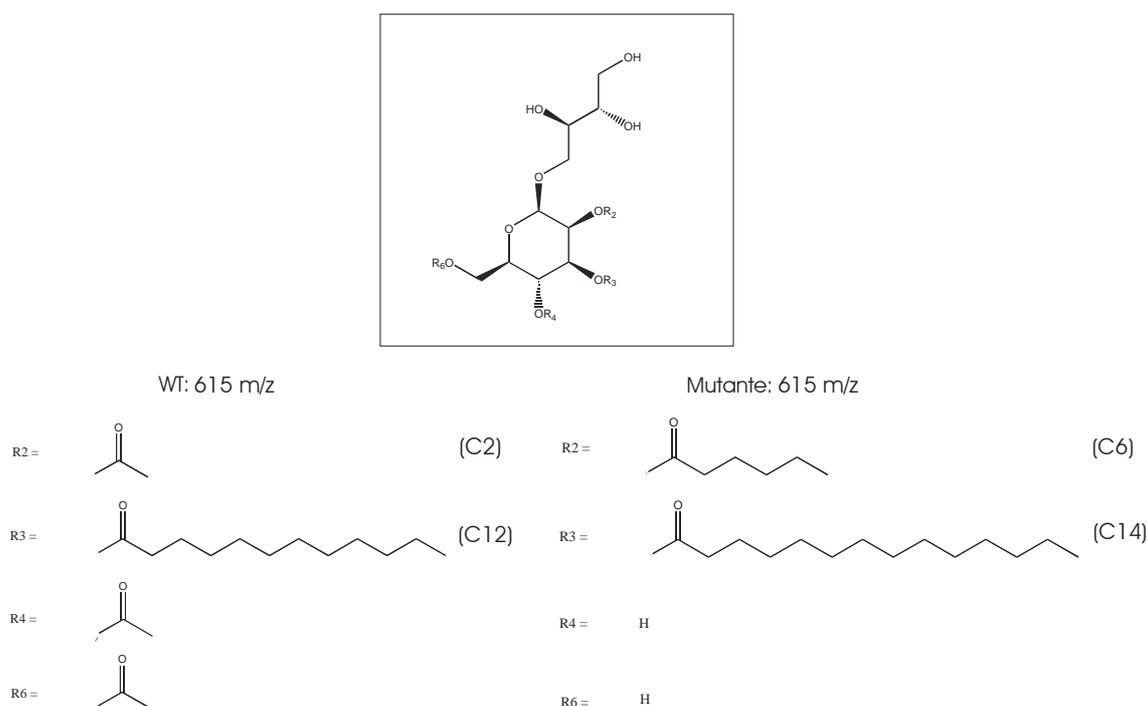


Abb. 24: MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Messungen der 615 Da Masse des Wildtyp-Ethylacetatextraktes und des  $\Delta mat1$  Deletionsmutanten-Extraktes. Das 615 Da

Wildtyp-Molekül trägt an der R2 Position eine Acetylgruppe, an der R3 Position eine C12-Fettsäurekette und an der R4 und R6 Position ebenfalls eine Acetylgruppe (C und D). Für das 615 Da grosse Deletionsmutanten-Molekül konnte an der R2 Position eine C6-Fettsäurekette und an der R3 Position eine C14-Fettsäurekette identifiziert werden (C). Die Positionen R4 und R6 liegen deacetyliert vor.



**Abb. 25: Vergleich einer acetylierten und der deacetylierten Form des MEL mit der Masse 615 Da.** Es konnte eine komplette Strukturaufklärung erzielt werden. Es handelt sich um zwei unterschiedliche Moleküle gleicher Masse. Die Positionen R2 und R3 sind für beide Formen verschieden. Während die Wildtyp-Form an R4 und R6 acetyliert ist, ist die Mutanten-Form an diesen Positionen deacetyliert.

Für die Wildtyp-Probe konnten nach der MS<sup>2</sup>-Messung zwei Fragmente identifiziert werden (415 Da und 555 Da). Die Masse 415 Da lässt sich dadurch erklären, dass eine C12-Fettsäurekette abgespalten wurde. Es war aus der Literatur bereits bekannt, dass sich diese an der Position R3 des Mannosylerythritolgerüsts befindet. Außerdem konnte eine Masse von 555 Da nachgewiesen werden, welche um 60 Da kleiner war als die

Ausgangsmasse (615 Da). Dies war der Nachweis dafür, dass es sich hierbei um eine einfach deacetylierte MEL-Form handelt.

Jedoch konnte man nach der MS<sup>2</sup>-Messung keine Aussage darüber machen, ob sich an dem Mannosylerythritolgerüst weitere Acetylgruppen befinden. Aufgrund einer möglichen unvollständigen Fragmentierung wurde eine MS<sup>3</sup>-Analyse von der 555 Da Masse durchgeführt. Tatsächlich konnte diese in eine 495 Da Masse fragmentiert werden, was dem Verlust einer weiteren Acetylgruppe (-60 Da) entspricht. Dies zeigt, dass diese Wildtyp-MEL-Form sowohl an der R4, als auch an der R6 Position eine Acetylgruppe besitzt. Die komplette MEL-Struktur konnte durch diese MS-Analysen also bis auf die Position R2 fragmentiert werden. Dies war aber auch nicht nötig, da man aufgrund der Kenntnis der Summenformel folgern kann, dass sich an dieser Position ebenfalls eine Acetylgruppe (C2) befinden muss.

Für die Mutanten-Probe konnte wie bereits beschrieben nach der MS<sup>2</sup>-Messung die komplett deacetylierte Ustilipid C-Form identifiziert werden. Während für die Mutanten-Probe nur eine MEL-Form für die 615 Da Masse identifiziert werden konnte, konnten für die Wildtyp-Probe zwei weitere Formen identifiziert werden, die sich in der LC allerdings in ihrem Laufverhalten unterschieden. So gab es noch eine Modifikationsform, bei der sich an der R3 Position eine C10-Fettsäurekette und an der R2 Position eine C4-Fettsäurekette befindet (Retentionszeit etwa 15 min). Und nach einer Retentionszeit von etwa 14 Minuten gab es eine MEL-Form mit einer C6-Fettsäurekette an der Position R2 und einer C8-Fettsäurekette an der Position R3. Diese beiden MEL-Formen waren aus der Literatur ebenfalls bereits bekannt (siehe Tab. 5).

Mittels massenspektrometrischer Analysen war es also möglich, eine komplette Stukturaufklärung für die Massen 699 Da und 615 Da durchzuführen (Abb. 25). Es konnte nachgewiesen werden, dass das von  $\Delta mat1$  Mutanten produzierte Glykolipid mit der Masse 615 Da komplett deacetyliert ist, während die vom Wildtyp produzierten MEL-Varianten mit den Massen 615 Da und 699 Da an den Positionen R4 und R6 jeweils Acetylgruppen besitzen. Im Wildtypextrakt konnten keine deacetylierten Formen der MEL-Glykolipide

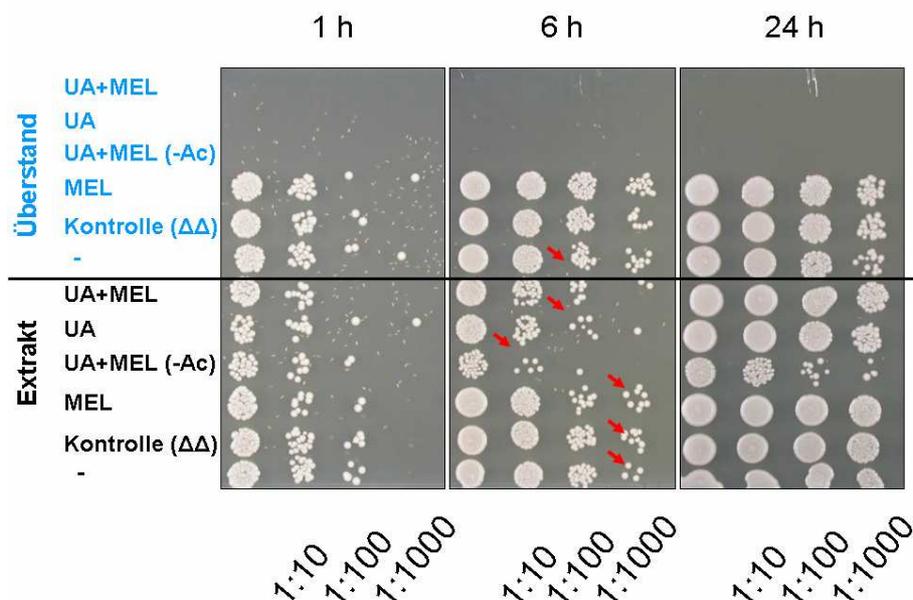
nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Position R4 und R6 normalerweise immer vollständig acetyliert vorliegen.

Die identifizierte Acetyltransferase Mat1 (ORF 105\_120) ist daher vermutlich für den Transfer beider Acetylgruppen verantwortlich. Dieses Modell konnte ebenfalls durch eine massenspektrometrische Analyse der *in vitro* acetylierten MELs (siehe 2.7) bestätigt werden. Die Messungen zeigten, dass diese Formen tatsächlich wieder beide Acetylgruppen tragen (Daten nicht gezeigt).

## 2.9 Toxizitätsanalysen mit den aus den Deletionsstämmen gewonnenen extrazellulären Glykolipiden

Aus der Literatur war bekannt, dass die Ustilaginsäure eine starke antibiotische Wirkung gegenüber anderen Mikroorganismen, darunter sowohl Bakterien als auch Pilze, wie zum Beispiel die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, aufweist (Haskins and Thorn, 1951). Für die von *U. maydis* produzierten Mannosylerythritolipide waren hingegen bisher keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt worden. Um die in dieser Arbeit hergestellten Deletionsstämme auf ihre antibiotische Aktivität zu überprüfen, wurden zwei unterschiedliche Tests zur Untersuchung der Toxizität der verschiedenen Glykolipide entwickelt. Dazu wurde in einem Test der Kulturüberstand und in einem anderen Test die extrahierten Glykolipide eingesetzt. Hierfür wurden verschiedene Deletionsstämme (MB215 $\Delta$ *cyp1*, MB215 $\Delta$ *mat1*, MB215 $\Delta$ *emt1* und SH6 $\Delta$ *emt1* $\Delta$ *cyp1*) und der Wildtypstamm MB215 für drei Tage unter Stickstoffmangelbedingungen angezogen. Nachdem die *U. maydis* Zellen durch Hitze abgetötet worden waren, wurde eine Hälfte der Kultur (5 ml) abzentrifugiert, und der Überstand mit 5 ml frischem Medium vermischt, das 0,2 % Ammoniumsulfat enthielt. Mit der anderen Hälfte des Ansatzes wurde eine Ethylacetat-Extraktion durchgeführt. Die Glykolipide wurden anschließend in Methanol aufgenommen

und in YEPS-Medium gegeben. Diese Ansätze wurden mit einer kommerziell gekauften Hefekultur angeimpft. Nach verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 6 h und 24 h) wurden Proben entnommen und eine Verdünnungsreihe auf YPD-Platten aufgetropft (Abb. 26).

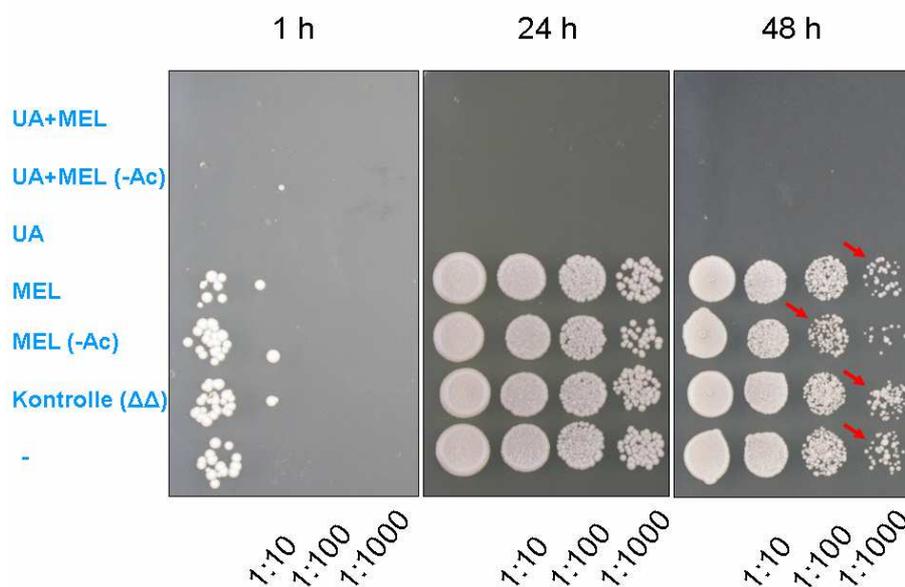


**Abb. 26: Toxizitätstest mit Hefe.** Hefe wurde für 1, 6 und 24 h mit verschiedenen Glykolipidüberständen (blau unterlegt) und mit in Methanol gelösten extrahierten extrazellulären Glykolipiden in YEPS (schwarz unterlegt) inkubiert. Es wurden Verdünnungsreihen auf YPD-Platten aufgetropft. Die Auswertung erfolgte nach zwei Tagen Inkubation. Die roten Pfeile zeigen Verdünnungen mit vergleichbarer Zellzahl.

Hefezellen, die mit Kulturüberständen inkubiert wurden, die UA enthielten, waren bereits nach einer Stunde Inkubation vollständig abgetötet, wohingegen die Glykolipidüberstände ohne UA keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefe hatten (Abb. 26, obere Hälfte). Die Hefen, die in YEPS-Medium den extrahierten und in Methanol gelösten Glykolipiden ausgesetzt waren, überlebten. Die zugesetzte Ustilaginsäure verursachte jedoch in diesem Fall ein etwa um das 10-fache geringeres Hefe-Wachstum (Abb. 26, unten, Pfeile). Überraschenderweise hatte das vom Stamm FB1 $\Delta$ *mat1* produzierte Glykolipidgemisch (UA+MEL<sub>deacet.</sub>) den größten Einfluss auf das Hefe-Wachstum (siehe die 24 Stunden-

Probe). Die deacetylierten MEL-Formen scheinen deshalb die toxische Aktivität der UA zu verstärken oder selbst toxische Eigenschaften zu besitzen.

Um dies zu überprüfen, wurde der Test mit den glykolipidhaltigen Kulturüberständen noch einmal durchgeführt mit dem Unterschied, dass dieses Mal auch der Glykolipidüberstand der Doppelmutante ( $\Delta mat1\Delta cyp1$ ) eingesetzt wurde, die aus einer Kreuzung von  $FB1\Delta mat1$  und  $MB215\Delta cyp1$  erzeugt worden war (Abb. 27). Dieser Überstand enthielt also keine UA mehr, sondern nur noch die deacetylierten MEL-Formen. Zudem wurde für diesen Test ein standardisierter Labor-Hefestamm eingesetzt, mit bekanntem Genotyp (YHUM 0455). Dieser Stamm wuchs jedoch deutlich langsamer als die vorher verwendete, kommerziell erworbene Bäckerhefe.



**Abb. 27: Toxizitätstest mit Hefe.** Hefe wurde für 1, 24 und 48 h mit verschiedenen Glykolipidüberständen (blau unterlegt) inkubiert. Es wurden Verdünnungsreihen auf YPD-Platten aufgetropft, und nach zwei Tagen ausgewertet. Die roten Pfeile zeigen Verdünnungen mit gleicher Zellzahl.

Wie bereits bei dem vorher verwendeten Stamm war die Anwesenheit von UA toxisch für das Hefewachstum (Abb. 27, oben). Für die deacetylierten Ustilipide war nach 24 Stunden Inkubation kein Einfluss auf das Hefewachstum festzustellen. Nach einer 48-stündigen

Inkubation konnte ein geringerer Wachstumsdefekt für die Hefe beobachtet werden, welche in den Überstand mit den deacetylierten MEL-Formen angeimpft wurde.

Dieses Ergebnis bestätigte, dass die deacetylierten MEL-Formen eine sehr schwache toxische Aktivität besitzen.

## 2.10 Charakterisierung einer Glykosyltransferase, die für die Ustilaginsäure-Biosynthese essentiell ist

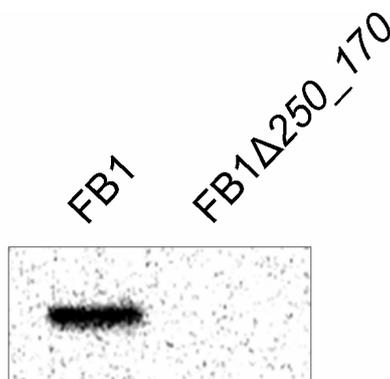
Nachdem es gelang, mit Hilfe der Microarrayanalysen den Ustilipid-Biosyntheseweg aufzuklären, stand die Identifizierung von Ustilaginsäure-Biosynthesegenen im Mittelpunkt. Zu diesem Zweck wurden die Microarray-Daten dahingegen überprüft. Die Analysen zeigten, dass zwei benachbarte Gene des an der UA-Biosynthese beteiligten *cyp1*-Gens (*250\_130*) ebenfalls unter Stickstoffmangelbedingungen stark induziert sind (Tab. 2). Ein Vergleich mit der Datenbank ergab, dass es sich hierbei um eine weitere Cytochrom P450 Monooxygenase handelt (*250\_90*, *um06459*). Dieses Gen wurde *cyp2* genannt und zeigte mit einer über 20-fachen Induktion die zweitstärkste Induktion aller auf dem Microarray vorhandenen Gene. Das zu *cyp2* unmittelbar benachbarte Gen *250\_80* (*um06458*), welches als Protein mit Ähnlichkeit zu einem *Schizosaccharomyces pombe* während der Meiose hochregulierten Protein ohne bekannte Funktion annotiert ist, zeigte ebenfalls unter diesen Bedingungen eine fast 10-fach erhöhte Induktion. Interessanterweise befand sich *cyp1*, welches im Northern-Blot ebenfalls eine sehr starke Induktion zeigte (Daten nicht gezeigt), nicht auf der Microarray-Liste der hochregulierten Gene. Es stellte sich heraus, dass die Gene stromabwärts von *250\_90* (*cyp2*) nicht auf dem Affymetrix-Microarraychip vertreten sind (Jörg Kämper, persönl. Mitteilung).

Um zu überprüfen, ob es sich hierbei auch um einen Gencluster wie bei der MEL-Biosynthese handelt, hat Beate Teichmann in ihrer Diplomarbeit die Expression der weiteren Gene des Contigs 250 mittels Northern-Blot-Analysen überprüft. Es zeigte sich,

dass alle Gene dieses Clusters von *250\_80* bis zum Gen *250\_190* (*um06469*) unter Stickstoffmangelbedingungen hochreguliert werden.

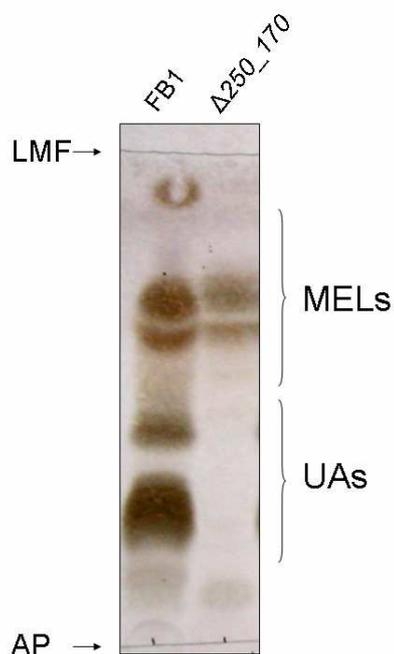
Ein besonders interessanter Kandidat innerhalb dieses Clusters war das Gen *250\_170* (*um06467*), da dieses Gen als eine Glykosyltransferase annotiert ist. Diese könnte den Transfer der Cellobioseeinheit auf die Palmitinsäure katalysieren.

Das Gen *250\_170* wurde mittels homologer Rekombination deletiert und die Deletionsmutante durch Southern-Blot-Analysen überprüft (Abb. 28). Die Sonde detektierte wie erwartet in der Wildtypspur ein etwa 3,7 kb großes Fragment, während in der  $\Delta 250_170$  Spur keine Bande zu beobachten war.



**Abb. 28: Southern-Blot Analysen der Deletionsmutante  $FB1\Delta 250_170$ .** Extrahierte genomische DNA des Wildtyp- und Deletionsstammes wurden mit *EcoRI* verdaut und mit einem internen 500 bp Fragment hybridisiert.

Dann wurde untersucht, ob die Deletion einen Einfluss auf die UA-Synthese hat. Abbildung 29 zeigt die Dünnschichtchromatographie; Ethylacetatextrakte des Wildtystammes und der  $\Delta 250_170$  Mutante wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Der Extrakt der Deletionsmutante zeigte den kompletten Verlust der Ustilaginsäure, während die MEL-Produktion nicht beeinträchtigt war.



**Abb. 29: Dünnschichtchromatographie zur Analyse der Glykolipidproduktion des Glykosyltransferase-Deletionsstammes *250\_170*.** Ethylacetatextrakte von extrazellulären Glykolipiden des Deletionsstammes und des Wildtypstammes FB1 wurden zur Analyse eingesetzt. Die Mannosylerythritollipid-Produktion des Deletionsstammes zeigte keine Unterschiede zu dem Wildtypstamm, aber es kommt zu einem völligen Verlust der Ustilaginsäure-Produktion (AP, Auftragspunkte; LMF, Laufmittelfront).

Dies zeigt, dass diese Glykosyltransferase vermutlich für die O-glykosidische Bindung zwischen der Cellobioseeinheit und der 15, 16 Dihydroxy-Palmitinsäure verantwortlich ist. Das entsprechende Gen (*250\_170*, *um06467*) wurde deshalb *hgt1* genannt (Hydroxypalmitinsäure-Glucosyltransferase)

### 3. Diskussion

In dieser Arbeit konnten mit Hilfe eines revers genetischen Ansatzes zwei in die Glykolipidproduktion von *U. maydis* involvierte Gencluster identifiziert werden, das Ustilaginsäure- und das Ustilipidcluster. Die innerhalb des Ustilipid-Genclusters liegenden Gene wurden durch homologe Rekombination deletiert. Damit konnte der Ustilipid-Biosyntheseweg aufgeklärt werden. Die in dieser Arbeit generierten Deletionsstämme wurden mit Hilfe verschiedener Assays mit den Wildtypstämmen verglichen; dadurch konnten neue Erkenntnisse über die biologischen Funktionen der von *U. maydis* produzierten extrazellulären Glykolipide gewonnen und zugeordnet werden.

#### 3.1 Biologische Funktionen von Glykolipiden in *U. maydis*

Über die biologische Funktion der Glykolipide aus *Ustilago maydis* war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur wenig bekannt. So war vermutet worden, dass Glykolipide eine mögliche Funktion beim Transport der hydrophoben Pheromone über große Distanzen auf der hydrophoben Maisblattoberfläche haben könnten. Aufgrund ihrer amphipatischen Eigenschaft könnten sie auch die Anheftung der Zellen an die wachsartige, hydrophobe Kutikula der Maisblätter erleichtern. Zudem könnte die für Ustilaginsäure nachgewiesene antibiotische Wirkung *U. maydis* einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen in seiner natürlichen Umgebung verschaffen. Eine vierte potentielle Funktion könnte die Reduzierung von Oberflächenspannungen sein, die zur Erleichterung der Aufnahme hydrophober Nahrungsquellen beitragen kann. Um zu überprüfen, welche dieser Eigenschaften auf die beiden von *U. maydis* produzierten Glykolipidklassen zutrifft,

wurden Deletionsmutanten hergestellt, die einen Defekt in der Biosynthese der jeweiligen Sekundärmetabolite zeigten.

Beide Glykolipidklassen wurden auf ihre Oberflächenaktivität überprüft, da dies eine typische Eigenschaft von Biotensiden ist. So sind zum Beispiel mehrere *Pseudomonas*-Sämme fähig, oberflächenaktive Substanzen zu produzieren, welche die Oberflächenspannung von Medien deutlich senken können. Der *Pseudomonas putida*-Stamm PCL1445 synthetisiert zum Beispiel die Lipopeptide Putisolvin I und II (Kuiper et al., 2004), und der *Pseudomonas putida*-Stamm 21BN produziert Rhamnolipide (Tuleva et al., 2002), denen diese Eigenschaft nachgewiesen werden konnte. In *Bacillus subtilis* konnte mit dem Lipopeptid Surfactin die bisher stärkste oberflächenaktive Natursubstanz nachgewiesen werden (Marahiel et al., 1993). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich auch bei beiden *Ustilago maydis* Glykolipidklassen um oberflächenaktive Substanzen handelt, wobei die MELs zu einer stärkeren Reduzierung der Oberflächenspannung führten als die UAs.

Diese Eigenschaft könnte die MELs auch für die Industrie interessant machen, da oberflächenaktive Substanzen als Biodetergenzien eingesetzt werden. Besonders im Mittelpunkt steht hierbei der Einsatz der Biotenside zur Ölrückgewinnung (Parkinson, 1985). Wenn eine Methode zur kostengünstigen Gewinnung in großen Mengen erarbeitet wird, könnten die MELs hier eine Alternative zu chemischen Detergenzien darstellen.

Eine weitere Möglichkeit oberflächenaktive Substanzen zu testen, ist die Verwendung von Hämolyse-Plattenassays, wobei es aufgrund der Oberflächenaktivität zum Platzen der Erythrozyten kommt (Carillo et al., 1996). Dieser Test zeigte, dass die Ustilaginsäure keinerlei hämolytische Aktivität besitzt, während die Mannosylerythritollipide einen deutlichen Hämolysehof auf den Blutagarplatten verursachten. Dies war in der Literatur anders beschrieben worden. Demnach sollten die Ustilipide nur eine sehr geringe hämolytische Aktivität aufweisen (Kurz et al., 2003). Unsere Ergebnisse zeigen dagegen, dass Ustilipide zumindest eine sehr viel stärkere hämolytische Aktivität als die Ustilaginsäure ausüben. Die Doppelmutanten zeigten ebenfalls noch eine schwache

hämolytische Wirkung, was bedeutet, dass es noch weitere Substanzen geben muss, die für diese Restaktivität verantwortlich sein könnten. Dabei könnte es sich um sekretierte Proteine mit hämolytischer Wirkung handeln.

Die Tatsache, dass die Ustilaginsäure keine hämolytische Aktivität auf Blutagarplatten zeigt, erklärt die Beobachtung, dass es in einer vorhergehenden Arbeit nicht möglich war, mit Hilfe einer UV-Mutagenese Mutanten zu generieren, die einen Defekt der Ustilaginsäureproduktion zeigten. Da dabei die hämolytische Aktivität als Screeningmethode eingesetzt wurde, war es mit dieser Methode nicht möglich, für die UA-Produktion defiziente Mutanten zu identifizieren. Unsere Ergebnisse bestätigten, dass sich mit dieser Screeningmethode nur solche Mutanten finden lassen, die für die Ustilipidproduktion defekt sind.

Mit Hilfe von Toxizitätstests wurden die beiden Glykolipidklassen auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber anderen Mikroorganismen überprüft. Die Tests zeigten, dass die Ustilaginsäure eine starke antibiotische Wirkung gegenüber der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt. Mannosylerythritollipiden fehlt im Gegensatz dazu diese Aktivität, nur die deacetylierten MEL-Formen der Acetyltransferase-Mutante  $\Delta mat1$  zeigt eine schwache toxische Wirkung, die jedoch nicht so stark ist, wie die der Ustilaginsäure. Unsere Beobachtungen stärken die Annahme, dass eine treibende Kraft für die Evolution vieler Sekundärmetabolite der dadurch errungene Vorteil gegenüber biologischen Konkurrenten ist (Challis and Hopwood, 2003). Für das Cellobioselipid Microcin aus *Cryptococcus humicola*, das in seiner Struktur der Ustilaginsäure sehr ähnlich ist, konnte der Wirkmechanismus genauer bestimmt werden (Puchkov et al., 2001). Das Glykolipid Microcin wirkt auf die Zytoplasmamembran anderer Mikroorganismen, indem es sich dort einlagert. Nach der Ausbildung von Mikroläsionen kommt es zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität und einem verstärkten Protonenaustritt. Dies führt zu einer Veränderung des Membranpotentials, und die Zellen aktivieren zur Kompensation ATPasen. Diese pumpen zum Ausgleich Protonen in die Zelle, was zu einer starken Ansäuerung des Zytoplasmas führt. Als Konsequenz kommt es zu einer Inaktivierung der Zytoplasma-Enzyme und

schließlich zum Tod der Zellen (Puchkov et al., 2001). Es wird angenommen, dass der Wirkmechanismus der Ustilaginsäure analog verläuft.

Es ist bekannt, dass die toxische Wirkung von Glykolipiden häufig abhängig vom pH-Wert des Mediums ist (Kulakovskaya et al., 2003). So liegt das Wirkungsoptimum von Microcin bei pH 4 bis 4,5. Wurde der pH-Wert der glykolipidhaltigen Kulturüberstände gemessen, mit denen die Hefen versetzt wurden, ergab sich ein pH-Wert zwischen 2 und 4. Im Gegensatz dazu blieb der pH-Wert der Ansätze nahezu neutral, wenn die Hefen in das YEPS-Medium mit den in Methanol gelösten Glykolipiden gegeben wurden. Diese Tatsache erklärt unsere Beobachtung, dass die Glykolipidüberstände wesentlich aktiver waren als die in Methanol aufgenommenen und in YEPS-Medium gegebenen Glykolipide.

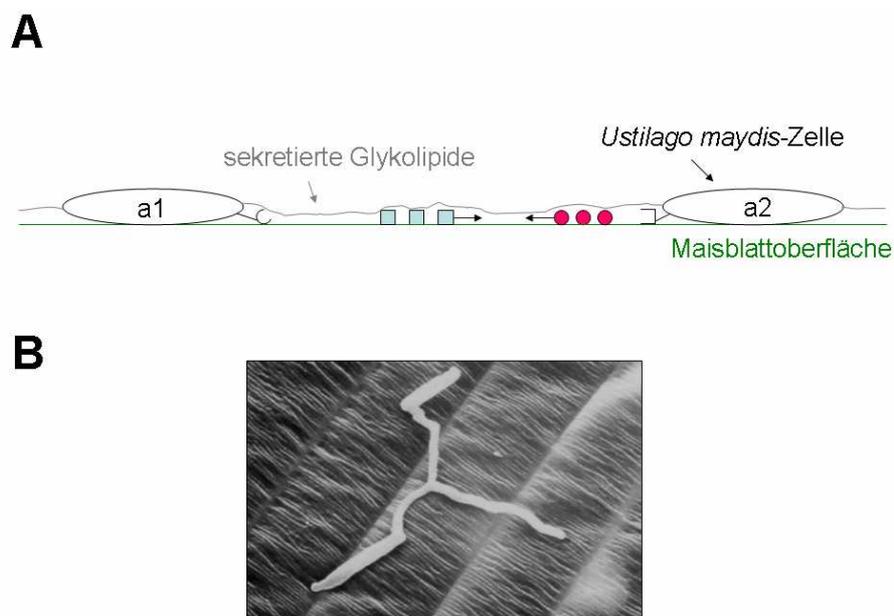
Da das YEPS-Medium als Vollmedium aufgrund der reichlichen Aminosäuren ein gutes Puffersystem darstellt, bleibt dieses Medium auch nach längerer Inkubation mit Hefe neutral. In dieser neutralen Umgebung können die ATPasen möglicherweise nicht mehr so viele Protonen in die Zelle pumpen. Dies könnte dazu führen, dass das Zytoplasma nicht so stark angesäuert wird, und so die Enzyme nicht inaktiviert werden können.

Dieser Test zeigte, dass die UAs eine stärkere toxische Aktivität besitzen als die MELs. Interessanterweise konnte Beate Teichmann in ihrer Diplomarbeit eine Deletionsmutante erzeugen ( $\Delta cyp2$ ), bei der modifizierte Ustilaginsäurebanden auftreten, die vermutlich auf das Fehlen einer Hydroxylgruppe der Dihydroxy-Palmitinsäure zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigten diese modifizierten UAs in dem Toxizitätstest keinerlei antibiotische Wirkung. Diese nicht toxischen UA-Varianten sind ein Hinweis dafür, dass die toxische Aktivität sehr spezifisch ist und nicht einfach auf der Oberflächenaktivität dieser Substanzen beruhen. Es ist denkbar, dass modifizierten UA-Varianten nicht mehr in der Lage sind, sich so in die Zytoplasmamembran einzulagern, dass es zu einer Schädigung der Membran führt.

Mit Hilfe der Konfrontationstests konnten wir zeigen, dass die Ustilaginsäure eine wichtigere Rolle bei der Ausbildung der gerichteten Konjugationshyphen hat als die Ustilipide. So waren die  $\Delta cyp1$ -Deletionsstämme im Gegensatz zu den Wildtypstämmen

nicht mehr in der Lage, Konjugationshyphen auszubilden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Ustilaginsäure für die Pheromonwahrnehmung über große Entfernungen essentiell ist (siehe auch Abb. 30). Wir vermuten, dass sich die hydrophoben Pheromone durch zweidimensionale Diffusion innerhalb der amphipatischen Glykolipidschicht ausbreiten, die sich auf der hydrophoben Maisblattoberfläche ausbildet. Damit können sich die *U. maydis* Zellen auch für weiter entfernte kompatible Kreuzungspartner bemerkbar machen.

Um dieses Modell zu überprüfen, müsste ein Test statt auf Wasseragar auf der natürlichen Umgebung von *U. maydis*, also auf der hydrophoben Maisblattoberfläche, durchgeführt werden.



**Abb. 30: Pheromonwahrnehmung bei *Ustilago maydis*.** Schematische Darstellung der durch den *a*-Locus gesteuerten Pheromonwahrnehmung und die biologische Rolle der sezernierten Glykolipide (A). Ausbildung eines Dikaryons auf einer Maisblattoberfläche (Snetselaar, 1993) (B).

Aufgrund der Erkenntnisse, die wir aus den Konfrontationsassays gewonnen haben, könnte es möglich sein, dass sich die Deletionsmutanten auch durch ein verändertes Verhalten hinsichtlich ihrer Pathogenität auszeichnen. Es wurde vermutet, dass die Fähigkeit zur Konjugationshyphen-Ausbildung der  $\Delta cyp1$ -Stämme so weit gestört ist, dass es in der Pflanze nicht mehr zur Fusion zweier kompatibler Stämme und Bildung eines Dikaryons kommen kann. Bei dem Pathogenitätstest konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den miteinander gekreuzten Wildtypstämmen und den beiden Doppelmutanten SH6 $\Delta emt1\Delta cyp1$  und SH9 $\Delta emt1\Delta cyp1$  beobachtet werden. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte die große Zahl der in diesem Versuch eingesetzten Zellen sein ( $>10^7$  Zellen). Auch unterschiedliche Verdünnungen (bis 1:10000), führten jedoch zu den gleichen Resultaten (Daten nicht gezeigt). Anscheinend ist der Pathogenitätstest nicht sensitiv genug, um Unterschiede bei der Pheromonwahrnehmung aufzuzeigen. Da die Kulturen vor der Injektion vermischt werden, können sie bei der Infektion aufgrund der geringen Entfernung zueinander relativ leicht in Kontakt treten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ustilaginsäure eine wichtige Rolle in der Pheromonwahrnehmung und der Konkurrenz gegenüber anderen Mikroorganismen spielt, während die Mannosylerythritollipide als starke oberflächenaktive Substanzen wirken. Den beiden Glykolipidklassen konnten somit unterschiedliche biologische Funktionen nachgewiesen werden, die *Ustilago maydis* vermutlich Selektionsvorteile in seiner natürlichen Umgebung bringen.

### **3.2 Die Biosynthesegene beider Glykolipidklassen liegen in Clustern vor**

Die für die Biosynthese der beiden unterschiedlichen Glykolipidklassen in *Ustilago maydis* verantwortlichen Gene liegen in zwei verschiedenen Clustern vor, dem

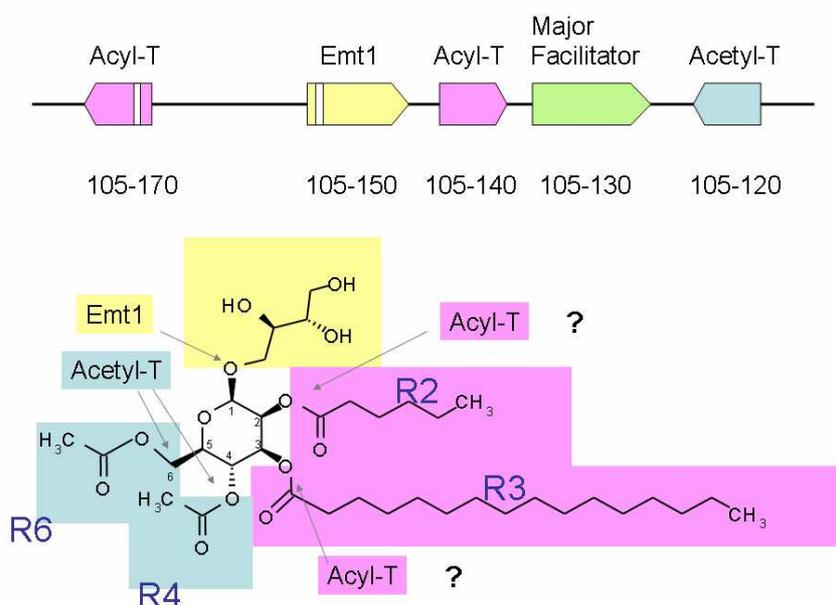
Mannosylerythritollipid-Cluster und dem Ustilaginsäure-Cluster. Während das MEL-Cluster (18 kb) aus fünf Genen besteht und sich auf dem Chromosom 7 befindet, setzt sich das UA-Cluster aus wesentlich mehr Genen zusammen. Dieses Cluster befindet sich am Ende des Chromosoms 23, und die genaue Zahl der Gene ist hierbei noch nicht bekannt. Zumindest konnte in dieser Arbeit und von Beate Teichmann gezeigt werden, dass 11 Gene des Ustilaginsäuregenclusters unter Stickstoffmangelbedingungen hochreguliert sind. Von einigen dieser Gene sind bereits Deletionsstämme erzeugt worden, die Veränderungen in der Ustilaginsäurebiosynthese zur Folge hatten ( $\Delta 250_{80}$ ,  $\Delta 250_{90}$ ,  $\Delta 250_{130}$  (Teichmann, 2005) und  $\Delta hgt1$ , (diese Arbeit)).

In *U. maydis* wurde bisher erst ein Gen-Cluster identifiziert. Hierbei handelt es sich um das mig2 Gen-Cluster, welches speziell während der biotrophen Phase in der Maispflanze exprimiert wird (Basse et al., 2002) (Farfsing et al., 2005). Dieses Cluster besteht aus fünf hoch homologen und ähnlich regulierten Genen.

Es wurde vermutet, dass die für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten verantwortlichen Gene häufig in einem Cluster vorliegen, was auf ihren Ursprung durch horizontalen Gentransfer hinweist (Walton, 2000). So liegen die Aflatoxin-Biosynthesegene aus *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* beispielsweise ebenfalls in einem Gencluster vor (Yu et al., 2002). Das Gencluster ist 70 kb groß und besteht aus 24 identifizierten Genen, einem Transkriptionsaktivator, Cytochrom P450 Monooxygenasen, Dehydrogenasen, Oxidasen, Methyltransferasen, einer Polyketid-Synthase und zwei Fettsäure-Synthasen. Ebenso ist für *Gibberella fujikuroi* bekannt, dass dieser Spezies-Komplex viele verschiedene Sekundärmetabolite produziert. Die Gibberellinbiosynthese ist jedoch auf die Mating-Population C von *Fusarium fujikuroi* beschränkt, und auch hier liegen die an der Biosynthese beteiligten Gene in einem Gencluster vor (Malonek et al., 2005).

### 3.2.1 Das Gen-Cluster 105 ist für die MEL-Produktion verantwortlich

Die Microarray-Daten haben gezeigt, dass vier benachbarte Gene von *emt1* (*105\_150*) unter Stickstoffmangelbedingungen ebenfalls hochreguliert sind. Dies führte zu der Vermutung, dass es sich hierbei um einen Gen-Cluster handelt, das für die MEL-Produktion verantwortlich ist. Die Phänotypen von Deletionsmutanten einzelner Clustergene und die Ähnlichkeit der von diesen Genen kodierten Proteinen erlaubten es, den meisten Genen des Clusters eine bestimmte Funktion bei der Biosynthese der Mannosylerythritollipide zuzuordnen (Abb. 31).



**Abb. 31: Übersicht über die Mannosylerythritollipid-Biosynthese.** Emt1 ist für den Transfer der GDP-Mannose auf das Erythritol (gelb unterlegt), die Acyltransferasen für den Transfer der beiden Fettsäuren auf die Mannose (violett unterlegt), die Acetyltransferase für den Transfer der Acetylgruppen (blau unterlegt) und der Major Facilitator ist vermutlich für den Transport der MELs aus der Zelle heraus verantwortlich.

Emt1 katalysiert vermutlich den Transfer der GDP-Mannose auf das Erythritol, die Acetyltransferase Mat1 überträgt die Acetylgruppen auf die Mannose und die beiden Acyltransferasen 105\_140 und 105\_170 sind für den Transfer der beiden längeren Fettsäuren auf die Mannose verantwortlich. Hierbei ist noch nicht bekannt, welche Acyltransferase für die Übertragung der kürzeren Ketten (C2:0-C8:0) auf R2 und welche für die Übertragung der längeren Ketten (C12:0-C18:0) auf R3 verantwortlich ist.

Bisher war es noch nicht möglich, eine Deletionsmutante für den Major Facilitator 105\_130 herzustellen. Für dieses Protein haben wir als Funktion den Transport der MELs aus den Zellen heraus postuliert. Dies könnte bedeuten, dass eine solche Deletion letal wirkt, da die in großer Menge produzierten Ustilipide in einer Major Facilitator Deletionsmutante vermutlich nicht mehr aus der Zelle heraus transportiert werden können. Für diesen Transporter kann somit postuliert werden, die Zellen vor der toxischen Wirkung größerer Mengen an MEL innerhalb der Zelle zu schützen.

Es fällt auf, dass im MEL-Cluster drei intronlose Gene (*105\_120*, *105\_130*, *105\_140*) vorhanden sind, was ebenfalls auf einen Ursprung durch horizontalen Gentransfer hindeuten könnte (Brakhage et al., 2005).

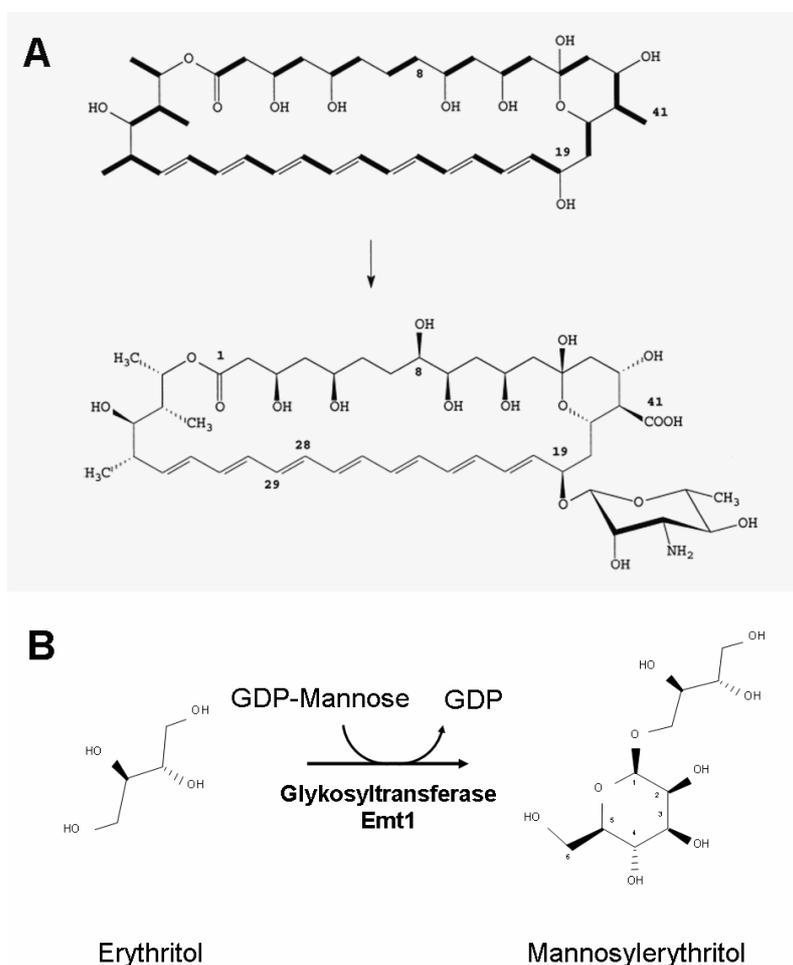
Zudem zeigt die Glykosyltransferase Emt1 die größte Ähnlichkeit zu bakteriellen Glykosyltransferasen, wie PimK (*Streptomyces natalensis*) und AmphDI (siehe Abb. 32). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass das MEL-Cluster ursprünglich aus einem Bakterienstamm stammt und dann durch einen horizontalen Gentransfer in *Ustilago maydis* gelangt ist.

|                   |                                                                     |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|
| U.maydis_Emt1     | VRFTRWVHDQRSIYKHPALRVV IHHGGGNSFNEAVHYALPQMI LSQWFDTHEYAI LAERFG    |
| A.nidulans_ORF    | IRLTSWIQHQQSIYTHRALKAFVHHGGGNSFNEAVHFAPQLVLSQWLDTHEYGLYAEKFG        |
| S.natalensis_PimK | LRVESWVPSQMDVLAHPHVKVFVTHGGGNGFNEMGYFGKPLVVRPLWVDCYDQAVRGQDFG       |
| S.nodosus_AmphDI  | LRIESWVPSQLDVL AHPNVKVFVTHAGGNGYHGBLYFGKPLVVRPLWVDCDDQAVRGQDFG      |
|                   | :* . * : * . : * : . . . * .***. :*. : . . * : . : * . * : . : **   |
| U.maydis_Emt1     | I GLRSKHAPKI DENDLVNMTMTRLLQGPEAEKI RRNAKVWSI RSRNAGGAPAAAARLIEAQAM |
| A.nidulans_ORF    | LGLRSRNPRI EADDIRLKI ETLLG-PKWDEYKSNCRAWAFRSQIAGGPAAAAKI VLFHAE     |
| S.natalensis_PimK | LSLTLDRPQTI DVNDVVDKLRVLTGTP---SFYEKAERRAALMR SAGGRETAAGLVL SLPA    |
| S.nodosus_AmphDI  | VSLTVDRPETVDTDDVLDKI TRVLNES---SFTERAEYYAGLLKAAGGRTAAADLLLGLPV      |
|                   | ::* .. : : * : : * . . . . : : *** ** : .                           |

**Abb. 32: Ähnlichkeit des C-Terminalen Bereichs von Emt1 mit bakteriellen Glykosyltransferasen.** Die größten Sequenzähnlichkeiten bestehen zu einem offenen Leserahmen in *Aspergillus nidulans* und den C-Terminalen Bereichen von PimK und AmphDI aus Actinomyceten.

### 3.2.2 Die Glykosyltransferase Emt1 besitzt eine entscheidende Funktion in der MEL-Biosynthese

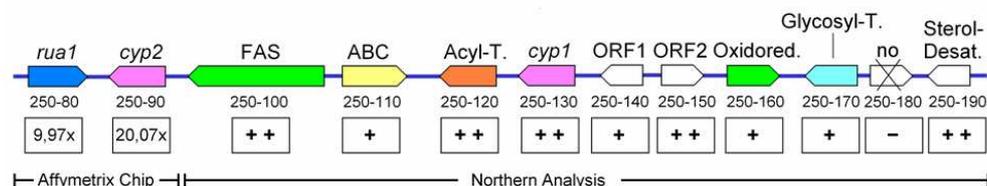
AmphDI aus *Streptomyces nodosus* ist für den Transfer eines Mycosaminrestes auf das Macrolid-Ringsystem von Amphotericin B (Caffrey et al., 2001) verantwortlich (Abbildung 33 A). Da das GDP-aktivierte Mycosamin aus GDP-Mannose hervorgeht, vermuten wir, dass es sich bei Emt1 um eine GDP-Mannose abhängige Glykosyltransferase handelt, die den Transfer von Mannose auf Erythritol katalysiert (siehe Abb. 33 B).



**Abb. 33: Vergleich der Glykosyltransferaseaktivität bei der Biosynthese von Amphotericin B und Mannosylethritol.** (A) AmphDI katalysiert den Transfer eines Mycosaminrestes auf das Macrolid-Ringsystem (übernommen von Caffrey et al., 2001). (B). Emt1 katalysiert vermutlich den Transfer der GDP-Mannose auf Erythritol.

### 3.2.3 Gen-Cluster 250 ist für die UA-Produktion verantwortlich

Durch die Microarray-Analysen war es nicht nur möglich, das MEL-Cluster, sondern auch das Ustilaginsäure-Cluster zu identifizieren. Die Beobachtung, dass das für die Cytochrom P450-Monooxygenase 250\_130 kodierende Gen, welches essentiell für die Ustilaginsäure-Biosynthese ist, nicht bei den unter Stickstoffmangelbedingungen hochregulierten Genen zu finden war, ließ sich dadurch erklären, dass sich dieses Gen nicht auf dem Microarray-Chip befindet. Aufgrund der bereits generierten Deletionsmutante war bekannt, dass eine Deletion dieses Gens einen kompletten Verlust der UA-Produktion zur Folge hatte. Zudem konnte durch Northern-Blot-Analysen gezeigt werden, dass dieses Gen unter Stickstoffmangelbedingungen stark hochreguliert ist. Die Auswertung der Microarray-Analysen zeigte, dass die zwei stromaufwärts liegenden Gene (250\_80 und 250\_90) unter diesen Bedingungen induziert waren. Das Gen 250\_80 kodiert vermutlich für einen potentiellen Transkriptionsfaktor (B. Teichmann, nicht publiziert), während das Gen 250\_90 die größten Sequenzähnlichkeiten zu Cytochrom P450-Monooxygenasen aufweist. Alle übrigen Gene, die stromabwärts davon liegen (250\_100 bis 250\_190), befinden sich nicht auf dem Microarray-Chip (Jörg Kämper, persönl. Mitteilung). Beate Teichmann konnte in ihrer Diplomarbeit durch Northern-Blot-Analysen zeigen, dass neun von diesen Genen unter Stickstoffmangel induziert sind. Für diese Glykolipidklasse konnte so ebenfalls ein Gen-Cluster nachgewiesen werden. Aufgrund von Datenbankvergleichen konnten wir auch für einige der übrigen Gene spezifische Funktionen vermuten (Abb. 34). So kodiert 250\_100 für eine Fettsäuresynthase, 250\_110 kodiert für einen ABC-Transporter, 250\_120 für eine Acyltransferase, 250\_140 und 250\_150 sind zwei noch nicht zuzuordnende offene Leserahmen, 250\_160 kodiert für eine Oxidoreduktase und 250\_190 für eine Sterol-Desaturase. Die Fettsäuresynthase könnte für die Synthese der Palmitinsäure, der ABC-Transporter könnte für den Export der UA, die Acyltransferase für den Transfer der beiden Acylgruppen an die Glukose-Einheiten und die Sterol-Desaturase könnte für die Ausbildung von Doppelbindungen in der langkettigen Fettsäure verantwortlich sein.



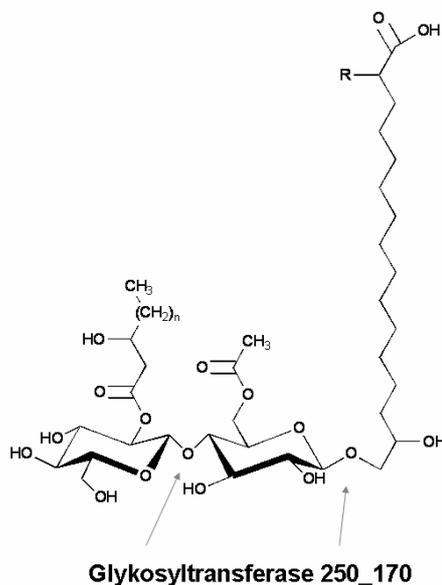
**Abb. 34: Darstellung des Ustilaginsäure-Clusters bestehend aus elf Genen (Teichmann, 2005).** Gezeigt sind die durch BLAST-Analysen zugeordneten Protein-Funktionen. Unten sind jeweils die Induktionen in den Microarray-Analysen, beziehungsweise die Northern-Blot-Expressionen aufgezeigt.

### 3.2.4 Die Glykosyltransferase Hgt1 besitzt eine entscheidende Funktion in der UA-Biosynthese

In dem Ustilaginsäure-Cluster kodiert ein Gen zudem für eine potentielle Glykosyltransferase (*hgt1*). Eine Deletion dieses Gens führte zu einem kompletten Verlust der UA-Biosynthese. Dieses Enzym ist vermutlich für die glykosidische Übertragung der Cellobiose-Einheit auf den Lipidanteil, der 15,16-Dihydroxy-Palmitinsäure, verantwortlich (Abb. 35). Möglicherweise ist sie auch in die Katalyse der Bindung zwischen den beiden Glukose-Molekülen involviert.

Ein Vergleich mit der Datenbank zeigte, dass Hgt1 die größte Ähnlichkeit zu einer Flavonoid-Glykosyltransferase aus *Vitis vinifera* besitzt. Diese Glykosyltransferase (UFGT) ist in die Anthocyan-Biosynthese von Rotweinträumen involviert (Kobayashi et al., 2002), wo sie durch eine Glykosylierungsreaktion für die Pigmentierung und somit für die rötliche Färbung der Beere verantwortlich ist. Zudem konnte ein Homolog dieses Enzyms in der Maispflanze gefunden werden, der Mais Bronze-1 Locus (Ford et al., 1998). Dieses Enzym ist ebenfalls für die Glykosylierung von Anthocyanidin verantwortlich. Durch diese Glykosylierungsreaktion wird Anthocyanidin in Anthocyan umgewandelt. Daher besteht

die Möglichkeit, dass das Gen des Bronze-1 Locus möglicherweise über horizontalen Gentransfer in den maispathogenen Pilz *U. maydis* gelangt ist.



**Abb. 35: Vorhergesagte Funktionen der Glykosyltransferase 250\_170.** Dieses Protein ist vermutlich für den Transfer der Cellobiose-Einheit auf die 15,16 Dihydroxy-Palmitinsäure verantwortlich und möglicherweise auch für die Bindung zwischen den beiden Glukose-Molekülen.

Während die Glykosyltransferase Emt1 also die größten Sequenzähnlichkeiten zu prokaryotischen Enzymen besitzt, hat die Glykosyltransferase aus dem UA-Cluster die größte Ähnlichkeit zu pflanzlichen Proteinen.

Dies führt zu dem Modell, dass das MEL-Cluster 105 durch einen horizontalen Gentransfer aus einem *Streptomyces*-Stamm in *U. maydis* gelangt ist, während das UA-Cluster 250 möglicherweise pflanzlichen Ursprungs ist. Hierfür spricht außerdem, dass neben der Glykosyltransferase 250\_170 auch Cyp1 (250\_130) seine größten Sequenzähnlichkeiten zu pflanzlichen Proteinen hat, und auch 250\_160 hohe Ähnlichkeit zu pflanzlichen Dihydroflavonolreduktasen aufweist.

### 3.3 Biochemische und massenspektrometrische Analyse der deacetylierten MEL-Formen

Neben den genetischen Ansätzen wurden in dieser Doktorarbeit auch biochemische und analytische Methoden eingesetzt. So konnte durch einen Enzymassay die postulierte Funktion der Acetyltransferase Mat1 bestätigt werden. In diesem Assay konnten nach Zugabe von Acetyl-CoA und des überproduzierten Proteins aus den deacetylierten MEL-Formen das Wildtyp-Glykolipid erhalten werden.

Die massenspektrometrischen Analysen haben uns zunächst gezeigt, dass es sich bei den sezernierten Glykolipiden um Gemische aus unterschiedlichen MEL-Varianten handelt. Dennoch war es mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse möglich, eine genaue Strukturaufklärung zu betreiben. So konnten Literaturdaten (Kurz et al., 2003) bezüglich der Fettsäurekettenlänge bestätigt werden. Die Fettsäurekette der MEL-Formen an der Position R2 schwankt zwischen einer Länge von C2 bis C8, und die Fettsäurekette an der Position R3 schwankt zwischen einer Länge von C12 bis C18. Zudem war es durch MS<sup>3</sup>-Analysen mittels Ionenfalle möglich, die Funktion der Acetyltransferase Mat1 *in vitro* zu bestätigen. Es konnte für mehrere ausgewählte Massen eindeutig gezeigt werden, dass die Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp komplett deacetyliert ist.

Interessant war außerdem die Feststellung, dass neben den gesättigten Fettsäuren auch hydroxylierte ungesättigte Fettsäuren existieren, die bisher noch nicht beschrieben waren. Diese unterschiedlichen Formen können chromatographisch nicht getrennt werden, so dass eine Unterscheidung nur durch massenspektrometrische Analysen möglich ist. Gezeigt werden konnte dies für die Masse 615 Da.

## 4 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in dieser Arbeit möglich war, durch Microarray-Analysen einen Mannosylerythritollipid-Cluster in *Ustilago maydis* zu identifizieren. Dieses MEL-Cluster besteht vermutlich aus fünf Genen. Zudem war es möglich, diesen Proteinen eine Funktion in der Biosynthese zuzuordnen. Außerdem konnte für die Acetyltransferase Mat1 die vorhergesagte Funktion durch einen Enzymassay und massenspektrometrische Messungen bestätigt werden. Durch die Microarray-Analysen konnte auch das Ustilaginsäure-Cluster identifiziert werden.

Beiden Glykolipidklassen konnten unterschiedliche biologische Funktionen nachgewiesen werden. Die UAs sind wichtig für die Pheromonwahrnehmung und besitzen eine toxische Wirkung gegenüber anderen Mikroorganismen, und die MELs sind besonders starke oberflächenaktive Substanzen.

Für die Zukunft wäre es noch wichtig herauszufinden, welche Acyltransferase für den Transfer welcher Fettsäure verantwortlich ist. Zudem ist es von Interesse in welcher Reihenfolge die Biosynthese der Mannosylerythritollipide erfolgt. So vermuten wir, dass zunächst die Synthese des Mannosylerythritols erfolgt. Bisher kann noch nicht vorhergesagt werden, ob zuerst die Acetylgruppen oder erst die Fettsäuren auf die Mannose übertragen werden. Wenn jedoch zuerst die Fettsäuren und dann die Acetylgruppen transferiert werden, dann sollte es möglich sein, durch eine Extraktion von Acyltransferase-Deletionsstämmen das deacetylierte Mannosylerythritol-Zwischenprodukt zu extrahieren, da die Synthese in diesen Mutanten bei diesem Schritt abbrechen müsste.

Zudem könnte das gesamte MEL-Cluster in nah verwandte Organismen gebracht werden, wie zum Beispiel *Ustilago hordei* und *Sporisorium reilianum*, um zu testen, ob die 5 identifizierten Gene des MEL-Clusters tatsächlich für eine Ustilipidproduktion ausreichend sind.

## 5 Material

### 5.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen

#### 5.1.1 *Ustilago maydis*-Stämme

Tab. 6: Verwendete *U. maydis*-Stämme

| Stamm                      | Genotyp | Kernphase/Resistenz | Referenz                       |
|----------------------------|---------|---------------------|--------------------------------|
| FB1                        | a1 b1   | haploid/ -          | (Banuett and Herskowitz, 1989) |
| FB2                        | a2 b2   | haploid/ -          | (Banuett and Herskowitz, 1989) |
| FB6a                       | a2b1    | haploid/ -          | (Banuett and Herskowitz, 1989) |
| MB133                      | a1b2    | haploid/ -          | M. Bölker, pers. Mitteilung    |
| MB215                      | a2 b13  | haploid/ -          | M. Bölker, pers. Mitteilung    |
| MB215 $\Delta$ <i>cyp1</i> | a2 b13  | haploid/ -          | B. Teichmann, pers. Mitteilung |

Tab. 7: in der Arbeit hergestellte Stämme

| Stamm                                         | Genotyp | Resistenz  | Vorläufer  |
|-----------------------------------------------|---------|------------|------------|
| MB215 $\Delta$ <i>emt1</i>                    | a2 b13  | Hygromycin | MB215      |
| FB1 $\Delta$ <i>emt1</i>                      | a1 b1   | Hygromycin | FB1        |
| SH6 $\Delta$ <i>emt1</i> $\Delta$ <i>cyp1</i> | a2 b1   | Hygromycin | MB215, FB1 |

---

|                                                                        |        |            |                   |
|------------------------------------------------------------------------|--------|------------|-------------------|
| <b>SH9<math>\Delta</math><i>emt1</i><math>\Delta</math><i>cyp1</i></b> | a1 b13 | Hygromycin | <b>MB215, FB1</b> |
| <b>FB1<math>\Delta</math>103_650</b>                                   | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>FB1<math>\Delta</math>105_120</b>                                   | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>MB215<math>\Delta</math>105_140</b>                                 | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>MB215<math>\Delta</math>105_170</b>                                 | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>FB1<math>\Delta</math>105_170</b>                                   | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>MB215<math>\Delta</math>126_390</b>                                 | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>FB1<math>\Delta</math>126_390</b>                                   | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>MB215<math>\Delta</math>13_630</b>                                  | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>FB1<math>\Delta</math>13_630</b>                                    | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>MB215<math>\Delta</math>154_170</b>                                 | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>FB1<math>\Delta</math>154_320</b>                                   | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>FB1<math>\Delta</math>154_360</b>                                   | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>MB215<math>\Delta</math>159_110</b>                                 | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>FB1<math>\Delta</math>159_110</b>                                   | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>MB215<math>\Delta</math>2_1550</b>                                  | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>MB215<math>\Delta</math>242_560</b>                                 | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>FB1<math>\Delta</math>250_170</b>                                   | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>FB1<math>\Delta</math>27_270</b>                                    | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |
| <b>MB215<math>\Delta</math>27_270</b>                                  | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>FB2<math>\Delta</math>34_320</b>                                    | a2 b2  | Hygromycin | <b>FB2</b>        |
| <b>MB215<math>\Delta</math>73_40</b>                                   | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>MB215<math>\Delta</math>88_90</b>                                   | a2 b13 | Hygromycin | <b>MB215</b>      |
| <b>FB1<math>\Delta</math>88_90</b>                                     | a1 b1  | Hygromycin | <b>FB1</b>        |

---

### 5.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Es wurden zwei verschiedene *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme benutzt. Zum einen wurde Bäckerhefe verwendet, die von der Deutschen Hefewerke GmbH (Nürnberg) produziert wurde, und zum anderen wurde der haploide Stamm YHUM 0455 ( $\sigma$ 12-78b) eingesetzt (persönliche Mitteilung von H. U. Mösch).

### 5.1.3 *Escherichia coli*-Stämme

Für Klonierungen ohne nähere Angaben wurde der Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Bei DH5 $\alpha$  handelt es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern: F-, endA1, hsdR-, hsdM+, sup44, thi-1, gyrA1, gyrA96, relA1, recA1, lacZ $\Delta$ M15. Als Expressionsvektor wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) verwendet.

Für PCR-Klonierungen unter Verwendung des TOPO TA Cloning® Kits von Invitrogen wurde der *E. coli*-Stamm TOP10 verwendet: F-, mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74, recA1, deoR, araD139,  $\Delta$ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (StrR), endA1, nupG. Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach Demerec (Demerec et al., 1966).

### 5.1.4 Chemikalien

**Tab. 8:** Verwendete Chemikalien

| Name                                | Bezugsquelle                     |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dATP     | Hartmann Analytic (Braunschweig) |
| $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP     | Hartmann Analytic (Braunschweig) |
| Acetyl-Coenzym A (C2:0)             | Sigma (Deisenhofen)              |
| Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (40:1) | Roth (Karlsruhe)                 |

|                                                   |                                         |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Agar-Agar                                         | Roth (Karlsruhe)                        |
| Agarose für DNA-Gele                              | Biozym (Hessisch Oldendorf)             |
| Agarose für RNA-Gele                              | GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein) |
| Ammoniumacetat                                    | Roth (Karlsruhe)                        |
| Ammoniumsulfat                                    | Roth (Karlsruhe)                        |
| Ampicillin                                        | Roth (Karlsruhe)                        |
| Anisaldyhyd                                       | Sigma (Deisenhofen)                     |
| APS                                               | Roth (Karlsruhe)                        |
| Bacto-Agar                                        | Becton, Dickinson (Frankreich)          |
| Bacto Pepton                                      | Becton, Dickinson (Frankreich)          |
| Bacto Yeast Extract                               | Becton, Dickinson (Frankreich)          |
| Bacto Trypton                                     | Becton, Dickinson (Frankreich)          |
| β-Mercaptoethanol                                 | Sigma (Deisenhofen)                     |
| Bromphenolblau                                    | Roth (Karlsruhe)                        |
| Calcium-Chlorid                                   | Merck (Darmstadt)                       |
| Charcoal                                          | Sigma (Deisenhofen)                     |
| Chloroform                                        | Roth (Karlsruhe)                        |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)           | Roth (Karlsruhe)                        |
| EDTA                                              | Merck (Darmstadt)                       |
| Essigsäure                                        | Roth (Karlsruhe)                        |
| Ethanol (vergällt)                                | Schmidt-GmbH (Dillenburg)               |
| Ethanol (unvergällt)                              | Roth (Karlsruhe)                        |
| Ethidiumbromid                                    | Roth (Karlsruhe)                        |
| Ethylacetat                                       | Merck                                   |
| Glukose                                           | Roth (Karlsruhe)                        |
| Glycerin                                          | Roth (Karlsruhe)                        |
| H <sub>2</sub> O, für molekularbiologische Zwecke | Braun (Melsungen)                       |
| Hefeextrakt                                       | GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein) |
| HygromycinB                                       | Duchefa (Haarlem, NL)                   |
| Isopropanol                                       | Roth (Karlsruhe)                        |
| Magnesium-Chlorid                                 | Merck (Darmstadt)                       |
| Methanol                                          | Roth (Karlsruhe)                        |
| MOPS                                              | Roth (Karlsruhe)                        |
| Natriumacetat                                     | Merck (Darmstadt)                       |
| Natriumchlorid                                    | Roth (Karlsruhe)                        |
| Natriumcitrat                                     | Roth (Karlsruhe)                        |

|                              |                                         |
|------------------------------|-----------------------------------------|
| Natriumdihydrogenphosphat    | Roth (Karlsruhe)                        |
| Natriumhydrogendiphosphat    | Roth (Karlsruhe)                        |
| Natriumhydroxid              | Roth (Karlsruhe)                        |
| Natriumsulfat                | Roth (Karlsruhe)                        |
| Orange G                     | Sigma (Deisenhofen)                     |
| Paraffinöl                   | Merck (Darmstadt)                       |
| Pepton                       | Difco (Detroit, US)                     |
| Phenol                       | Roth (Karlsruhe)                        |
| Polyethylenglycol (PEG 4000) | Merck (Darmstadt)                       |
| Potato-Dextrose              | Difco (Detroit, US)                     |
| Saccharose                   | Roth (Karlsruhe)                        |
| Salzsäure                    | Roth (Karlsruhe)                        |
| Schafblut, defibriniert      | Oxoid (Wesel)                           |
| Schwefelsäure                | Roth (Karlsruhe)                        |
| SDS                          | Roth (Karlsruhe)                        |
| Sequagel™ XR                 | Biozym (Hessisch Oldendorf)             |
| Sorbitol                     | Sigma (Deisenhofen)                     |
| TEMED                        | Roth (Karlsruhe)                        |
| Tris                         | Roth (Karlsruhe)                        |
| TritonX-100                  | Sigma (Deisenhofen)                     |
| Trypton                      | GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein) |
| X-Gal                        | Roth (Karlsruhe)                        |
| Xylencyanol                  | Roth (Karlsruhe)                        |
| Yeast Nitrogen Base          | Difco (Detroit, US)                     |

### 5.1.5 Kits

**Tab. 9:** Verwendete Kits

| Name                                  | Bezugsquelle             |
|---------------------------------------|--------------------------|
| Maxi-Kit Jetstar 2.0                  | Genomed (Bad Oeynhausen) |
| Megaprime DNA Labeling Kit            | Amersham (Braunschweig)  |
| QIAquick Gel Extraction Kit           | Qiagen (Hilden)          |
| Thermo Sequenase Fluorescent Labelled | Amersham (Braunschweig)  |

|                             |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| Primer Cycle Sequencing-Kit |                        |
| Topo TA Cloning Kit         | Invitrogen (Karlsruhe) |

### 5.1.6 Enzyme und Proteine

Tab. 10: Verwendete Enzyme und Proteine

| Name                              | Bezugsquelle                                                      |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Lysozym                           | Boehringer Mannheim (Mannheim)                                    |
| Novozym 234                       | Novo Nordisc (Kopenhagen, DN)                                     |
| <i>Pfu</i> -Polymerase            | Invitrogen (Karlsruhe)                                            |
| Restriktionsendonukleasen         | Amersham (Braunschweig);<br>New England Biolabs GmbH (Schwalbach) |
| RNase A                           | Serva (Heidelberg)                                                |
| Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) | Amersham (Braunschweig)                                           |
| T4-DNA-Ligase                     | Boehringer Mannheim (Mannheim)                                    |
| Taq-DNA-Polymerase                | GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)                           |
| Taq-DNA-Polymerase                | M. Bölker, pers. Mitteilung                                       |

### 5.1.7 Sonstige Materialien

Tab. 11: Sonstige Materialien

| MATERIAL                              | BEZUGSQUELLE                          |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Blottingpapier                        | Macherey-Nagel (Düren)                |
| DC-Alufolien 20 x 20 cm, Kieselgel 60 | Merck (Darmstadt)                     |
| Elektroporationsküvetten              | Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) |
| Falcon-Röhrchen (15ml und 50 ml)      | Greiner (Frickenhausen)               |

|                              |                                   |
|------------------------------|-----------------------------------|
| Faltenfilter                 | Schleicher und Schuell (Dassel)   |
| Glasperlen                   | Sigma (Deisenhofen)               |
| Kunststoff-Küvetten          | Sarstedt (Nümbrecht)              |
| Mais-Samen                   | Early Golden Bantam (Madison, US) |
| MobiSpin Columns             | MoBiTec (Göttingen)               |
| Nylonfilter Hybond N+        | Amersham (Braunschweig)           |
| Petrischalen                 | Greiner (Frickenhausen)           |
| Pipettenspitzen              | Greiner (Frickenhausen)           |
| Röntgenfilm Kodak X-omat     | Kodak                             |
| Säule (Massenspektrometrie)  | Macherey-Nagel (Düren)            |
| Schikanekolben               | Ochs (Bovenden)                   |
| sterile Spritzen und Kanülen | Braun (Melsungen)                 |
| Sterilfilter                 | Sarstedt (Nümbrecht)              |

## 5.2 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, sind alle Puffer und Lösungen mit Braun-H<sub>2</sub>O angesetzt.

|                                              |                                                                                           |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ampicillin-Lösung</b>                     | 10 mg/ml Ampicillin                                                                       |
| <b>AE-Puffer</b>                             | 50 mM Na-Acetat, pH 5,3<br>10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> |
| <b>AE-Phenol:</b>                            | 50% AE<br>50% Phenol                                                                      |
| <b>Carboxin-Lösung</b>                       | 2 mg/ml Carboxin<br>in Methanol                                                           |
| <b>Depurinierungs-Puffer</b> (Southern Blot) | 0,4 M NaOH                                                                                |
| <b>DNA-Auftragspuffer (10x)</b>              | 0,1 % (w/v) Bromphenolblau                                                                |

|                                                             |                                      |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|                                                             | 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF           |
|                                                             | 0,2 % (w/v) Orange G                 |
|                                                             | 50 % (w/v) Saccharose                |
|                                                             | 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA           |
| <b>dNTP-Lösung</b>                                          | 10 mM dATP                           |
|                                                             | 10 mM dCTP                           |
|                                                             | 10 mM dGTP                           |
|                                                             | 10 mM dTTP                           |
| <b>Lysis-Puffer</b> (DNA-Präparation aus <i>U. maydis</i> ) | 2,0 % (w/v) Triton X-100             |
|                                                             | 1 % (w/v) SDS                        |
|                                                             | 100 mM NaCl                          |
|                                                             | 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0         |
|                                                             | 1 mM EDTA                            |
| <b>Lysozym-Lösung</b>                                       | 10 mg/ml Lysozym                     |
|                                                             | 10 mM Tris/HCl, pH 8,0               |
| <b>MOPS-Puffer</b>                                          | 200 mM MOPS, pH 7,0                  |
|                                                             | 80 mM Na-Acetat                      |
|                                                             | 10 Mm Na <sub>2</sub> -EDTA          |
| <b>Natriumphosphatpuffer (1 M)</b>                          | 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|                                                             | 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|                                                             | pH 7,0                               |
| <b>Nickelpuffer 1</b>                                       | 25 mM Tris, pH 7,5                   |
| <b>Nickelpuffer 2</b>                                       | 25 mM Tris, pH 7,5                   |
|                                                             | 0,5 M NaCl                           |
|                                                             | 5 mM Imidazol                        |
|                                                             | 0,5 % Triton X 100                   |
| <b>Northern-Hybridisierungspuffer</b>                       | 50 mM Na-Phosphat, pH 7,0            |
|                                                             | 50 mM PIPES                          |

|                                               |                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                               | 100 mM NaCl<br>1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA<br>5% (w/v) SDS                                                                                |
| <b>Northern-Waschpuffer</b>                   | 1x SSC<br>0,1% (w/v) SDS                                                                                                                 |
| <b>PCR-Puffer (<i>Taq</i> DNA-Polymerase)</b> | 10 mM Tris/HCl, pH 8,3<br>50 mM KCl<br>1,5 mM MgCl <sub>2</sub>                                                                          |
| <b>Phenol/Chloroform</b>                      | 50 % (v/v) Phenol<br>50 % (v/v) Chloroform                                                                                               |
| <b>Probenpuffer (6x) (für Proteingele)</b>    | 300 mM Tris-HCl, pH 8,0<br>30% (v/v) Glycerin<br>20% (w/v) SDS<br>0,5 g/l Bromphenolblau<br>15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben) |
| <b>Proteingel-Laufpuffer</b>                  | 25 mM Tris-HCl, pH 8,8<br>200 mM Glycin<br>1% (w/v) SDS                                                                                  |
| <b>Proteingel Entfärbe-Lösung</b>             | 45% (v/v) Methanol<br>10% (v/v) Essigsäure                                                                                               |
| <b>Proteingel Färbe-Lösung</b><br>(Coomasie)  | 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250<br>45% (v/v) Methanol<br>10% (v/v) Essigsäure                                                 |
| <b>RNA-Auftragspuffer</b>                     | 50% (w/v) Saccharose<br>0,25% (w/v) Bromphenolblau<br>0,25% (w/v) Xylencyanol FF<br>in MOPS-Puffer                                       |

|                                                                                     |                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sammelgel</b>                                                                    | 125 mM Tris-HCl, pH 6,8<br>5% (w/v) Acrylamid<br>0,13% (w/v) Bisacrylamid<br>0,1% (w/v) SDS<br>0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat<br>0,1% (v/v) TEMED |
| <b>SCS-Puffer</b> (Protoplastierung)                                                | 20 mM Natriumcitrat, pH 5,8<br>1 M Sorbitol                                                                                                     |
| <b>SCS-Novozym-Lösung</b> (Protoplastierung)<br>(sterilfiltriert, frisch angesetzt) | 0,5 % (w/v) Novozym 234<br>in SCS-Lösung                                                                                                        |
| <b>Sol A</b> (Plasmidpräparation, alk.-Lyse)                                        | 100 mM Tris-HCl, pH 7,9<br>10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA                                                                                          |
| <b>Sol B</b> (Plasmidpräparation, alk. Lyse)                                        | 200 mM NaOH<br>1 % (w/v) SDS                                                                                                                    |
| <b>Sol C</b> (Plasmidpräparation, alk. Lyse)                                        | 3 M Kaliumacetat<br>2 M Essigsäure                                                                                                              |
| <b>Southern-Transferlösung</b>                                                      | 0,4 M NaOH                                                                                                                                      |
| <b>Southern-Hybridisierungspuffer</b>                                               | 7% (w/v) SDS<br>500 mM Natriumphosphat, pH 7,0                                                                                                  |
| <b>Southern-Waschpuffer</b>                                                         | 1 % (w/v) SDS<br>100 mM Natriumphosphat, pH 7,0                                                                                                 |
| <b>20x SSC-Puffer</b>                                                               | 300 mM Na-Citrat, pH 7,0<br>3 M NaCl                                                                                                            |
| <b>STC-Puffer</b> (Protoplastierung)                                                | 1 M Sorbitol<br>10 mM Tris/HCl, pH 7,5<br>100 mM CaCl <sub>2</sub>                                                                              |

|                                                                        |                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>STC/PEG</b> (Transformation <i>U. maydis</i> )<br>(sterilfiltriert) | 60 % (v/v) STC<br>40 % (w/v) Polyethylenglykol                                                                                                  |
| <b>TAE-Puffer</b>                                                      | 40 mM Tris/HCl, pH 8,3<br>20 mM Na-Acetat<br>2 mM Na <sub>2</sub> -EDTA                                                                         |
| <b>TE-Puffer</b>                                                       | 10 mM Tris/HCl, pH 8,0<br>1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA                                                                                            |
| <b>TE mit RNaseA</b>                                                   | 20 µg/ml RNaseA<br>in TE-Puffer                                                                                                                 |
| <b>Trenngel</b>                                                        | 375 mM Tris-HCl, pH 8,8<br>6% (w/v) Acrylamid<br>0,27% (w/v) Bisacrylamid<br>0,1% (w/v) SDS<br>0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat<br>0,1% (v/v) TEMED |
| <b>X-Gal-Lösung</b>                                                    | 2,0 % (w/v) X-Gal<br>in N, N-Dimethylformamid                                                                                                   |

### 5.3 Medien zur Kultivierung von *U. maydis*

| Bezeichnung                | Lösung in H <sub>2</sub> O dest.                                                        |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NSY-Glycerin-Medium</b> | 8 g/l Nutrient Broth<br>5 g/l Saccharose<br>1 g/l Hefe-Extrakt<br>69,6 % (v/v) Glycerin |
| <b>PD-Agar</b>             | 24 g/l Potato Dextrose Broth<br>2,0 % (w/v) Agar                                        |

|                                    |                                                                                                          |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PD-Agar für Blutagarplatten</b> | 24 g/l Potato Dextrose Broth<br>2,0 % (w/v) Bacto-Agar<br>0,8 % NaCl<br>pH 6,0<br>2% Schafblut           |
| <b>PD-Charcoal-Agar</b>            | 24 g/l Potato Dextrose Broth<br>10 g/l Charcoal<br>2,0 % (w/v) Agar                                      |
| <b>Regenerations-Agar</b>          | 10 g/l Hefe-Extrakt<br>20 g/l Pepton<br>2,0 % (w/v) Saccharose<br>182,2 g/l Sorbitol<br>1,5 % (w/v) Agar |
| <b>YEPS-Medium</b>                 | 10 g/l Hefe-Extrakt<br>20 g/l Pepton<br>2,0 % (w/v) Saccharose                                           |
| <b>YNB- Medium</b>                 | 1,7 g/l YNB (Yeast Nitrogen Base)<br>pH 6,0                                                              |

## 5.4 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

| <b>Bezeichnung</b>         | <b>Lösung in H<sub>2</sub>O dest.</b>               |
|----------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>dYT-Medium</b>          | 16 g/l Trypton<br>10 g/l Hefe-Extrakt<br>5 g/l NaCl |
| <b>dYT-Agar</b>            | wie dYT-Medium<br>2 % (w/v) Agar                    |
| <b>dYT-Glycerin-Medium</b> | wie dYT-Medium                                      |

69,6 % (v/v) Glycerin

**LB-Medium**

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefe-Extrakt  
10 g/l NaCl

## 5.5 Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

**YEPD-Agar**

10 g/l Hefe-Extrakt  
20 g/l Pepton  
20 g/l Agar

nach dem Autoklavieren 40 ml 50 %ige Glukoselösung zugeben.

## 5.6 Nukleinsäuren

### 5.6.1 Plasmide, Plasmidkonstruktionen und Genbanken

**Tab. 12:** Liste der verwendeten Plasmide

| <b>Name</b>        | <b>Resistenzmarker</b> | <b>Herkunft</b>                           | <b>Verwendung</b>                                                  |
|--------------------|------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>pBS-hhn</b>     | Ampicillin             | Jörg Kämper,<br>persönliche<br>Mitteilung | Gewinnung der<br>Hygromycin-Resistenz für<br>die Deletionsmutanten |
| <b>pCR2.1-Topo</b> | Ampicillin             | Invitrogen (Topo<br>TA Cloning Kit)       | Klonierung und<br>Sequenzierung von<br>PCR-Produkten               |
| <b>PET-15B</b>     | Ampicillin             | Novagen, Merck                            | Überexpression der<br>Acetyltransferase 105_120 in                 |

|               |            |                             |                                                           |
|---------------|------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------|
|               |            |                             | <i>E. coli</i>                                            |
| <b>pNEBUH</b> | Ampicillin | Laborsammlung<br>AG Kahmann | Testen der<br>Transformationeffizienz<br>der Protoplasten |

**Tab. 13:** Liste der hergestellten Plasmide

| <b>Name</b>            | <b>Resistenzmarker</b>   | <b>Herkunft</b>                                                                                                                                           | <b>Verwendung</b>                                                             |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>pTOPO-105_120</b>   | Ampicillin,<br>Kanamycin | PCR amplifizierter<br>orf von <i>105_120</i><br>kloniert in pCR2.1-<br>Topo                                                                               | Zwischenklonierung von<br><i>105_120</i> für spätere<br>Klonierung in pET-15b |
| <b>pET-15b-105_120</b> | Ampicillin               | Aus pTOPO-<br><i>105_120</i><br>geschnittenes<br>Acetyltransferasegen<br>kloniert in pET-15b<br>über die<br>Schnittstellen <i>NdeI</i><br>und <i>XhoI</i> | Expression der<br>Acetyltransferase 105-120<br>in <i>E. coli</i>              |

### 5.6.2 DNA-Größenstandards

Als Mengen- und Größen-Standard für die DNA-Gelelektrophorese diente  $\lambda$  DNA und ein Gene Ruler DNA Ladder Mix von der Fa. MBI Fermentas.

#### $\lambda$ -DNA

Für die Verwendung als Mengenstandard wurde die  $\lambda$  DNA auf 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt. Die durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym *PstI* entstehenden Fragmente für den Größenstandard wiesen folgende Längen in Basenpaaren (bp) auf: 14057, 11506, 5077,

4749, 4507, 2838, 2556, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72, 15.

### 5.6.3 Protein-Größenstandard

Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde der Prestained Protein Marker von Biolabs als Proteinmarker verwendet.

Prestained Protein Marker, Broad Range in kDa:

175, 83, 62, 47,5, 32,5, 25, 16,5, 6,5

### 5.6.4 Oligonukleotid-Primer

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils von der 5'-Richtung in die 3'-Richtung angegeben.

**Tab. 14:** Liste der Primer

| Primer-Nummer      | Funktion                                                                   | Sequenz                         |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>MB230</b>       | Kontrolle der Deletionsmutanten (Gegenprimer zur linken Flanke)            | GAA TAA ATT ATC GCG CGC GTC     |
| <b>MB231</b>       | Kontrolle der Deletionsmutanten (Gegenprimer zur rechten Flanke)           | GCC ATT TGT GAG CGT CAG CGT TAG |
| <b>MB340-UM8L1</b> | Amplifizierung der 154_170 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion | CTG GTG CGT CAA CCT CAT GC      |

|                      |                                                                                                                          |                                                       |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>MB341-UM8L2</b>   | Amplifizierung der 154_170 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGG TGG CTG ATC TAT<br>GGA GAT GG |
| <b>MB342-UM8R1</b>   | Amplifizierung der 154_170 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cAA TTC CCT TGT ACA<br>CTT TTC AC |
| <b>MB343-UM8R2</b>   | Amplifizierung der 154_170 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | TTG GGC TTA AAT GTA CGC GT                            |
| <b>UM 217 L0</b>     | Kontrolle der 159_110 Deletionsmutante                                                                                   | GTA GGA ATG TGG TCT ACC TCA T                         |
| <b>MB348-UM217L1</b> | Amplifizierung der 159_110 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | CGA TTC TCG GAT GCC GCG ATG                           |
| <b>MB349-UM217L2</b> | Amplifizierung der 159_110 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cCG TTA CCG ATC CGA<br>GCT TGC    |
| <b>MB350-UM217R1</b> | Amplifizierung der 159_110 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCC GAA TCC ATC CTG<br>TCT GGT C  |
| <b>MB351-UM217R2</b> | Amplifizierung der 159_110 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | CGG TAT TCA GAT TGC CAC TGG                           |
| <b>UM 217 R3</b>     | Kontrolle der 159_110 Deletionsmutante                                                                                   | CGC CGT CGA CAC CAC CAA GAA                           |
| <b>UM 138 L0</b>     | Kontrolle der 88_90 Deletionsmutante                                                                                     | GAT AGA AGA TGC ATG GCA TGA AC                        |
| <b>MB354-UM138L1</b> | Amplifizierung der 88_90 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                                 | TCG AAG AGG ACT ACA TTC TCG                           |

|                      |                                                                                                                         |                                                        |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>MB355-UM138L2</b> | Amplifizierung der 88_90 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle    | cac ggc ctg agt ggc cGG TGA TGC TAC<br>AAG CAG CCT A   |
| <b>MB356-UM138R1</b> | Amplifizierung der 88_90 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle  | gtg ggc cat cta ggc cTT CTG CTA CAG CCG<br>CAT ATC     |
| <b>MB357-UM138R2</b> | Amplifizierung der 250_170 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                            | CGG GCT GGT GCT GTC AAC CTT G                          |
| <b>UM 138 R3</b>     | Kontrolle der 88_90 Deletionsmutante                                                                                    | AGT GGA ACT GGT ATT GGA GT                             |
| <b>MB404-UM93L1</b>  | Amplifizierung der 13_630 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | CCG CAA TTG GCT GGG CAT CAC CC                         |
| <b>MB405-UM93L2</b>  | Amplifizierung der 13_630 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGT ACA CCG ACG TCA<br>ACG TCA G   |
| <b>MB406-UM93R1</b>  | Amplifizierung der 13_630 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cAA CCA CAC GTA CTG<br>TAG AAC TTG |
| <b>MB407-UM93R2</b>  | Amplifizierung der 13_630 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | GTC GAC GCA ACC ACG AAG CC                             |
| <b>MB422-UM93L0</b>  | Kontrolle der 13_630 Deletionsmutante                                                                                   | CTC TAC CGA CTT TGA GGT GCA                            |
| <b>MB423-UM93R3</b>  | Kontrolle der 13_630 Deletionsmutante                                                                                   | GTG ATA CCA TCG CGC GCC AA                             |
| <b>MB481-UM8Ln</b>   | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens 154_170                                                         | GCA ATC CCA TGG CGG CTT GGC C                          |

|                       |                                                                                                                                 |                                                           |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>MB482-UM8Rn</b>    | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>154_170</i>                                                          | GAG GAT GAG ACC CGA GAA GAG G                             |
| <b>MB626_ppi_5</b>    | Amplifizierung der Sonde für Northern-Analysen des Gens <i>ppi</i>                                                              | CGC CGG CCC CAA CAC CAA CGG C                             |
| <b>MB627_ppi_3</b>    | Amplifizierung der Sonde für Northern-Analysen des Gens <i>ppi</i>                                                              | CTG AGG AGG AAA TGA GAA GGC G                             |
| <b>MB736L1</b>        | Amplifizierung der <i>250_170</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | CCA GCG ATG TCA GCG CGT GCC                               |
| <b>MB739R2</b>        | Amplifizierung der <i>250_170</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | GTC CAG GTC AAG GAT ACC AGG C                             |
| <b>MB742IgL2</b>      | Amplifizierung der <i>250_170</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGG AGA TGG TCG<br>TGA GCC GG         |
| <b>MB743IgR1</b>      | Amplifizierung der <i>250_170</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cGC CCA ATA CCT TCT<br>TGC TTT CGC GC |
| <b>MB740Wignb</b>     | Amplifizierung der Sonde für Northern- und Southern-Analysen des Gens <i>250_170</i>                                            | GCC GAG TCC GCA ACT GGC TCG                               |
| <b>MB741Wignb</b>     | Amplifizierung der Sonde für Northern- und Southern-Analysen des Gens <i>250_170</i>                                            | GGT CAG CTG GGA ACC ACG TTC GC                            |
| <b>MB754_UM234_L1</b> | Amplifizierung der <i>34_320</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                                | GCG CCG GGG AGA TCG ACC GAA GC                            |
| <b>MB755_UM234_L2</b> | Amplifizierung der <i>34_320</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle    | cac ggc ctg agt ggc cGC CAG CAG CTA CGA<br>GAT GCA CG     |

|                        |                                                                                                                          |                                                        |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>MB756_Um234_R1</b>  | Amplifizierung der 34_320 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle  | gtg ggc cat cta ggc cCG GAA GTC CTC ACC<br>ATC AAG C   |
| <b>MB757_Um234_R2</b>  | Amplifizierung der 34_320 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                              | CCC GAT CAC GGT ACA GCT TCG CC                         |
| <b>MB770_Ig_L0</b>     | Kontrolle der 250_170 Deletionsmutante                                                                                   | CAC ACG ACG TGC GTG TGA CAG CC                         |
| <b>MB771_Ig_R3</b>     | Kontrolle der 250_170 Deletionsmutante                                                                                   | GGC TCC AGT CTA TAT CGG TGG CCC<br>C                   |
| <b>MB795_105_150L1</b> | Amplifizierung der 105_150 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | GCC GCT GTG GCA CGT CTC TG                             |
| <b>MB796_105_150L2</b> | Amplifizierung der 105_150 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cCA GGG AGG GGG<br>AGG GAG AGA G   |
| <b>MB797_105_150R1</b> | Amplifizierung der 105_150 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cGG CTC CGC TCA TGC<br>ATT TCC TCG |
| <b>MB798_105_150R2</b> | Amplifizierung der 105_150 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | GGC TTG ACC TCT GGC AAC AGC                            |
| <b>MB799_2_1550L1</b>  | Amplifizierung der 2_1550 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                                | GAC TGA CCA CCG CCG CTC ACC                            |
| <b>MB800_2_1550L2</b>  | Amplifizierung der 2_1550 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle    | cac ggc ctg agt ggc cCG GTG TCC AGG<br>GGG AGT CGA G   |
| <b>MB801_2_1550R1</b>  | Amplifizierung der 2_1550 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle  | gtg ggc cat cta ggc cCC CGC TAC CGC CTG<br>CCG TTT G   |

|                        |                                                                                                                          |                                                   |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>MB802_2_1550R2</b>  | Amplifizierung der 2_1550 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                              | CTG CAG CGG ATG GGC GCC AG                        |
| <b>MB808_Um234_R3</b>  | Kontrolle der 34_320 Deletionsmutante                                                                                    | GCGAACCTCGAGCCGCTCTCC                             |
| <b>MB809_Um234_L0</b>  | Kontrolle der 34_320 Deletionsmutante                                                                                    | GTCACGAGTGTCAGGGCAGG                              |
| <b>MB821_105_150L0</b> | Kontrolle der 105_150 Deletionsmutante                                                                                   | GCT GCT GGT CGG CTG ATT GGC                       |
| <b>MB822_105_150R3</b> | Kontrolle der 105_150 Deletionsmutante                                                                                   | GCG CGC AAG TCC TGC GTG CCG C                     |
| <b>MB823_2_1550L0</b>  | Kontrolle der 2_1550 Deletionsmutante                                                                                    | GTT GAG ACT TGA CCG CTG CCG                       |
| <b>MB824_2_1550R3</b>  | Kontrolle der 2_1550 Deletionsmutante                                                                                    | CCA AGC GCA CCC CTC GGT CTC G                     |
| <b>MB857_3'_RT_105</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens 105_150                                                          | CGA GTC TGT GAG GCC AGG CGT G                     |
| <b>MB858_5'_RT_105</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens 105_150                                                          | GCA GCC ACA ATG GTC CGC G                         |
| <b>MB922_126_390L0</b> | Kontrolle der 126_390 Deletionsmutante                                                                                   | GCA ACT TCT TGT CCC CCC AGC                       |
| <b>MB923_126_390L1</b> | Amplifizierung der 126_390 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | GCG GAT CCG GTC CGT GAT C                         |
| <b>MB924_126_390L2</b> | Amplifizierung der 126_390 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGA TGC CGA ATC CTG CGT CTG   |
| <b>MB925_126_390R1</b> | Amplifizierung der 126_390 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCC ATG GAC TAG ACC ACG TCT C |
| <b>MB926_126_390R2</b> | Amplifizierung der 126_390 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | GCC ACT GCA CCC AAC GCC CC                        |

---

|                        |                                                                                                                                             |                                                        |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>MB927_126_390R3</b> | Kontrolle der <i>126_390</i><br>Deletionsmutante                                                                                            | GCC GGC CTC GAA ACC GAT GC                             |
| <b>MC63araoeL</b>      | Amplifizierung der Sonde für<br>Southern-Analysen des Gens<br><i>27_270</i>                                                                 | ACA TAT GCC GAA ATC TGA CCA ATC<br>C                   |
| <b>MC64araoeR</b>      | Amplifizierung der Sonde für<br>Southern-Analysen des Gens<br><i>27_270</i>                                                                 | AGG ATC CTT ACC AAA TGT TGT GAC<br>CAC CCG             |
| <b>MC65araL0</b>       | Kontrolle der <i>27_270</i><br>Deletionsmutante                                                                                             | ACA GGC TAA CTG CTG CTG GCG                            |
| <b>MC66araL1</b>       | Amplifizierung der <i>27_270</i> -<br>upstream-Sequenz zur<br>Herstellung der Deletion                                                      | CCT TCG TTG CCT ACT TCG CGG CAC                        |
| <b>MC67araL2</b>       | Amplifizierung der <i>27_270</i> -<br>upstream-Sequenz zur<br>Herstellung der Deletion;<br>Einbringen einer <i>Sfi</i> -<br>Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGT TCG AGG TAC<br>GGG TGC GGG G   |
| <b>MC68araR1</b>       | Amplifizierung der <i>27_270</i> -<br>downstream-Sequenz zur<br>Herstellung der Deletion;<br>Einbringen einer <i>Sfi</i> -<br>Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCC TTT TCC TGG TCT<br>AGC TTG CG  |
| <b>MC69araR2</b>       | Amplifizierung der <i>27_270</i> -<br>downstream-Sequenz zur<br>Herstellung der Deletion                                                    | CGC TGT CAA AGC CGT CCG TGT C                          |
| <b>MC70araR3</b>       | Kontrolle der <i>27_270</i><br>Deletionsmutante                                                                                             | GCA AAT TAG GCG CAG AAC GAC GC                         |
| <b>MC84eggL0</b>       | Kontrolle der <i>242_560</i><br>Deletionsmutante                                                                                            | GTT CGC AAT ATA CAG TAG GCG GC                         |
| <b>MC85eggL1</b>       | Amplifizierung der <i>242_560</i> -<br>upstream-Sequenz zur<br>Herstellung der Deletion                                                     | CCC AGC GTC CAG CTA ACT GGG                            |
| <b>MC86eggL2</b>       | Amplifizierung der <i>242_560</i> -<br>upstream-Sequenz zur<br>Herstellung der Deletion;<br>Einbringen einer <i>Sfi</i> -<br>Schnittstelle  | cac ggc ctg agt ggc cGG CAA TGC CAC GCA<br>GAC CAT CAG |

---

|                        |                                                                                                                          |                                                          |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>MC87eggR1</b>       | Amplifizierung der 242_560 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCG GGC ACA GTG<br>CGG GGT TGC G     |
| <b>MC88eggR2</b>       | Amplifizierung der 242_560 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | CCT ACC TTG CGA GTA CGG CGC G                            |
| <b>MC89eggR3</b>       | Kontrolle der 242_560 Deletionsmutante                                                                                   | GCT CAT AGC TCA TAG CTC ATA GC                           |
| <b>MC93eggoe5'</b>     | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens 242_560                                                          | AGC GGC CGC CAT GAT CAT GGT GTT<br>CAA CGG CC            |
| <b>MC94eggoe3'</b>     | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens 242_560                                                          | AGC GGC CGC TTA CTT CTT GAT AAC<br>CTG GAA TCC           |
| <b>MC119_105_120L0</b> | Kontrolle der 105_120 Deletionsmutante                                                                                   | GAT TCC AGG GCG AAC TCA CGG                              |
| <b>MC120_105_120L1</b> | Amplifizierung der 105_120 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | GCG CAT TTG CTC ACA TGT ATC GC                           |
| <b>MC121_105_120L2</b> | Amplifizierung der 105_120 - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGA TCA GCG ACA GCT<br>CGA TGT GC    |
| <b>MC122_105_120R1</b> | Amplifizierung der 105_120 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCA ACC TAA GCA GTC<br>ACG TTT CCA G |
| <b>MC123_105_120R2</b> | Amplifizierung der 105_120 - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | GTG CAA ACC TTT GTG CAC GGC G                            |
| <b>MC124_105_120R3</b> | Kontrolle der 105_120 Deletionsmutante                                                                                   | CGA ACC GCA TCG CGC CCA AGC C                            |
| <b>MC125_105_130L0</b> | Kontrolle der 105_130 Deletionsmutante                                                                                   | CCA TCG TCG TTG TCT GTG CGG G                            |

---

|                        |                                                                                                                                 |                                                       |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>MC126_105_130L1</b> | Amplifizierung der <i>105_130</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | GAG CTG GCT GCC TGG GCT GCG TC                        |
| <b>MC127_105_130L2</b> | Amplifizierung der <i>105_130</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGT ATA CGA TCA GTG TAC GAT CCT G |
| <b>MC128_105_130R1</b> | Amplifizierung der <i>105_130</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCC AGC CCA CTG CGT GCG CAG CG    |
| <b>MC129_105_130R2</b> | Amplifizierung der <i>105_130</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | CTA TCT ACC ACA AGC TAA GGT GG                        |
| <b>MC130_105_130R3</b> | Kontrolle der <i>105_130</i> Deletionsmutante                                                                                   | GTT CCG ATA CGG GCT GGC GCG C                         |
| <b>MC131_105_140L0</b> | Kontrolle der <i>105_140</i> Deletionsmutante                                                                                   | CGA GGA GCA AGC CGA AGC AGC CC                        |
| <b>MC132_105_140L1</b> | Amplifizierung der <i>105_140</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | CAC GAC GAG TCA AGT TGT GCC G                         |
| <b>MC133_105_140L2</b> | Amplifizierung der <i>105_140</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGC CAA AGA GGT AGA TTT GAA CC    |
| <b>MC134_105_140R1</b> | Amplifizierung der <i>105_140</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCG CTG TTG GCA CTT TAC GTT TG    |
| <b>MC135_105_140R2</b> | Amplifizierung der <i>105_140</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | GCT GTG GCC TGG TTC AAC GTC C                         |
| <b>MC136_105_140R3</b> | Kontrolle der <i>105_140</i> Deletionsmutante                                                                                   | CTC GGA CTT GTG CTT GGA TCG G                         |
| <b>MC137_105_170L0</b> | Kontrolle der <i>105_170</i> Deletionsmutante                                                                                   | GGT TTC AGG CTT CGT GGT CAG G                         |

---

---

|                        |                                                                                                                                 |                                                       |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>MC138_105_170L1</b> | Amplifizierung der <i>105_170</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | CAC GAA TGT TAG CGC GAT CGC                           |
| <b>MC139_105_170L2</b> | Amplifizierung der <i>105_170</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGT TAA CCG TGA TTT GTG CTA CAA C |
| <b>MC140_105_170R1</b> | Amplifizierung der <i>105_170</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCA CTC TGC GAC TGT TTT CTG       |
| <b>MC141_105_170R2</b> | Amplifizierung der <i>105_170</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | GGA AGT TGG GGA CTT TAA GCC                           |
| <b>MC142_105_170R3</b> | Kontrolle der <i>105_170</i> Deletionsmutante                                                                                   | GGG CAC ACC ACC GAT AGT CC                            |
| <b>MC149_103_650L0</b> | Kontrolle der <i>103_650</i> Deletionsmutante                                                                                   | GTT GGC TCA GTT GTC GGC G                             |
| <b>MC150_103_650L1</b> | Amplifizierung der <i>103_650</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | GAC CCA CCC TTC CGT TCG                               |
| <b>MC151_103_650L2</b> | Amplifizierung der <i>103_650</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctga gtg gcc GTG ACC TGT ATT TTG CAA AGA GG   |
| <b>MC152_103_650R1</b> | Amplifizierung der <i>103_650</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCA CAA AAT GAA ACG TCG CTC C     |
| <b>MC153_103_650R2</b> | Amplifizierung der <i>103_650</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | GTG AGT TGC AGG TAG CTG TGG                           |
| <b>MC154_103_650R3</b> | Kontrolle der <i>103_650</i> Deletionsmutante                                                                                   | GGC GAG GAT GCG CGC TCG CAC                           |

---

|                        |                                                                                                                                 |                                                        |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>MC155_73_40L0</b>   | Kontrolle der <i>103_650</i> Deletionsmutante                                                                                   | GCC CGG GCA GCA CAA AGT ATG                            |
| <b>MC156_73_40L1</b>   | Amplifizierung der <i>73_40</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                                 | GTC CTC GGG TCG AAG CAG ATC                            |
| <b>MC157_73_40L2</b>   | Amplifizierung der <i>73_40</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle     | cac ggc ctg agt ggc cCG TGC GTT TGT AAG CTT TCA GAG    |
| <b>MC158_73_40R1</b>   | Amplifizierung der <i>73_40</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | gtg ggc cat cta ggc cGC GTC GCC ACT TTT CGT AAG TAG    |
| <b>MC159_73_40R2</b>   | Amplifizierung der <i>73_40</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | GCC AGC CTG TGC GAG CGG CG                             |
| <b>MC160_73_40R3</b>   | Kontrolle der <i>73_40</i> Deletionsmutante                                                                                     | GAG AGG TTC GGC CGG CAC CAC G                          |
| <b>MC269_154_360L0</b> | Kontrolle der <i>154_360</i> Deletionsmutante                                                                                   | CGC GGT GCT CTT GTG CGA TAG C                          |
| <b>MC270_154_360L1</b> | Amplifizierung der <i>154_360</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                               | GCT CTC GAC GAG CGT TCC TCT G                          |
| <b>MC271_154_360L2</b> | Amplifizierung der <i>154_360</i> - upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGT GAG AGT TGT AAA CTC GGG CTA TG |
| <b>MC272_154_360R1</b> | Amplifizierung der <i>154_360</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>Sfi</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCA CCT CTT GCT TCG AGT GAT CTG    |
| <b>MC273_154_360R2</b> | Amplifizierung der <i>154_360</i> - downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                             | CCT CAT CGC CAC TAT CGG CGT C                          |
| <b>MC274_154_360R3</b> | Kontrolle der <i>154_360</i> Deletionsmutante                                                                                   | GCA TGG ACG TTG TGC GGT GCG C                          |

---

|                          |                                                                        |                               |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>MC296_105_120nb5'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>105_120</i> | CGG CTC AGG CCA CCA AGT TTG C |
| <b>MC297_105_120nb3'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>105_120</i> | GGC TTG ATT GCA GTG GAC GCG   |
| <b>MC298_105_130nb5'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>105_130</i> | GCG CCA CCG CCA AGA CGT TCC   |
| <b>MC299_105_130nb3'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>105_130</i> | GGG AAC ACA GGC TTG GGC GCG   |
| <b>MC300_105_140nb5'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>105_140</i> | GGC TCG ACG AGA CGT TTG TGG   |
| <b>MC301_105_140nb3'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>105_140</i> | CTT GAG CAG CTC GCG AAC CTC G |
| <b>MC302_105_170nb5'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>105_170</i> | CAC GGC GCA GGA TGC CGA AAC   |
| <b>MC303_105_170nb3'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>105_170</i> | CTC CTG CAG CGA CAG CTG GC    |
| <b>MC304_73_40nb5'</b>   | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>73_40</i>   | GCT GGC GAC GAC GAT CAC GGC   |
| <b>MC305_73_40nb3'</b>   | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>73_40</i>   | GCA TGC GGT CCT GGG CGA AGG   |
| <b>MC306_94_410nb5'</b>  | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>94_410</i>  | CGG CCT CGA TCC AGC ATG CAG   |
| <b>MC307_94_410nb3'</b>  | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>94_410</i>  | CCA AGC CAA TGC GGG CGT GC    |

---

|                          |                                                                                                                                 |                                                     |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>MC308_154_360nb5'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>154_360</i>                                                          | CGC AGG GCC ACT ACT ACC TC                          |
| <b>MC309_154_360nb3'</b> | Amplifizierung der Sonde für Southern-Analysen des Gens <i>154_360</i>                                                          | CCA AGC CGT TGG TGG GGT CC                          |
| <b>MC310_105_120oe5'</b> | Amplifizierung des <i>105_120</i> -orfs zur Überexpressions in <i>E. coli</i> ; Einbringen einer <i>NdeI</i> -Schnittstelle     | aca tat gAA GAG CAA CGT GGA TAC TG                  |
| <b>MC311_105_120oe3'</b> | Amplifizierung des <i>105_120</i> -orfs zur Überexpressions in <i>E. coli</i> ; Einbringen einer <i>XbaI</i> -Schnittstelle     | act cga gCT ATT CGA CAA AGA TGT ACC TTC C           |
| <b>MC312_154_320L0</b>   | Kontrolle der <i>154_320</i> Deletionsmutante                                                                                   | GCA GAA GCC ATT CGC CAG TCC                         |
| <b>MC313_154_320L1</b>   | Amplifizierung der <i>154_320</i> -upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                                | CCC TGG GCT GGG CGT CTT CG                          |
| <b>MC314_154_320L2</b>   | Amplifizierung der <i>154_320</i> -upstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>SfiI</i> -Schnittstelle   | cac ggc ctg agt ggc cGG CGG GTC GAG GAT GGA CTT TG  |
| <b>MC315_154_320R1</b>   | Amplifizierung der <i>154_320</i> -downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion; Einbringen einer <i>SfiI</i> -Schnittstelle | gtg ggc cat cta ggc cCC AGC AGA AGC ACA TGC AGT AAG |
| <b>MC316_154_320R2</b>   | Amplifizierung der <i>154_320</i> -downstream-Sequenz zur Herstellung der Deletion                                              | GGT GGG CTT GCC CAA TGC AGG                         |
| <b>MC317_154_320R3</b>   | Kontrolle der <i>154_320</i> Deletionsmutante                                                                                   | CTC GAG CTC AAG CGA CCA TCC G                       |

## 6 Methoden

### 6.1 Anzucht von Mikroorganismen

#### 6.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden, soweit nicht anders erwähnt, in autoklaviertem dYT-Medium unter aeroben Bedingungen angezogen. Dem Medium wurde, wenn nötig, Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

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

Bei der Anzuchttemperatur wurde für Über-Nacht-Kulturen (ÜNKs) 37°C gewählt.

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

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

Flüssigkulturen von *U. maydis* wurden meist in YEPS-Medium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Medium geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Wenn nötig, wurde Hygromycin (200 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Zugabe der sterilfiltrierten Antibiotika (ABs) erfolgte nach dem Autoklavieren und bevor angeimpft wurde. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht oder bis zu mehreren Tagen bei 28°C.

Die Kultivierung von *U. maydis* auf Festmedium geschah auf PD-Agar (oder Regenerationsagar), falls erforderlich mit oben genannter AB-Konzentration.

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

## 6.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 6.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch „kochende Lyse“

Die Präparation erfolgte nach der Methode von Sambrook (Sambrook et al., 1989). Es wurden 1,5 ml ÜNK in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge Pico) und das Zellpellet nach Entfernen des Überstandes in 350 µl STET resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung wurde die Probe kräftig geschüttelt, 5 min bei RT inkubiert und schließlich 40 sec in einem Eppendorf-Thermomixer auf 95°C gebracht. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico) wurde das Proteinpellet mit einem sterilem Zahnstocher entfernt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte mit 40 µl 3 M NaAcetat pH 5,3 und 400 µl Isopropanol. Der Ansatz wurde kurz gevortext und anschließend abzentrifugiert (14000 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bei in 30 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

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

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

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

### 6.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - präparativer Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab erfolgte mit dem Jetstar Maxi-Kit der Firma Genomed nach Herstellerangaben.

#### **6.2.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *U. maydis* für PCR**

Eine Kultur von *U. maydis* wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 - 0,4 auf YEPS angezogen und 2 ml davon wurden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge Pico). Das Sediment wurde in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert und anschließend mit 0,3 g Glasperlen (425-600 Micron) und 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer geschüttelt (10 min, RT) und nachfolgend zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, Heraeus Biofuge Pico). 450 µl des Überstandes wurden mit 1000 µl 96 %iges Ethanol und 45 µl 3 M Na-Acetat gemischt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico). Das Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Dann wurde das Sediment in 50 µl TE mit RNaseA aufgenommen, 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst und bei -20°C gelagert.

#### **6.2.5 Isolierung chromosomaler DNA aus *U. maydis* für Southern-Blot Analysen**

15 ml einer Übernachtskultur von *U. maydis* wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (4300 rpm, 15 min, 4°C, Heraeus-Zentrifuge). Das Pellet wurde mit 400 µl Lysis-Puffer und 0,3 g Glasperlen (425-600 Micron) versetzt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform wurde 3,5 min gevortext. Das Gemisch wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge Pico). Der Überstand wurde auf zwei Eppendorf-Cups verteilt. Es wurde 500 µl 96 % Ethanol und 20 µl 3 M Na-Acetat zugegeben, gemischt und 5 min bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13.000 rpm, 30 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico). Das Pellet wurde 10 min getrocknet und in 370 µl TE mit 0,1 mg/ml RNaseA gelöst. Die Lösung wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der DNA wurden 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gevortext und abzentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico). Der Überstand wurde in

ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 40 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Anschließend wurde 1 ml Ethanol zugegeben, gemischt und 5 min auf -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 30 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico) wurde der Überstand verworfen und die DNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE resuspendiert. Hierfür wurde sie für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

### 6.2.6 RNA-Isolierung aus *U. maydis* für Northern-Blot Analysen

10 ml Flüssigkultur von *U. maydis* mit einer  $OD_{600} = 0,5-1,0$  wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (2800 rpm, 8 min, RT, Heraeus Megafuge1,0R). Das Medium wurde verworfen und der restliche Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wurde in 400 µl AE-Puffer resuspendiert und in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Dann wurden 40 µl 10% SDS hinzugegeben und kurz gevortext. Es wurden schnell 440 µl Phenol/AE dazupipettiert und kurz gevortext. Die Suspension wurde für 10 min bei 65°C geschüttelt (1400 rpm, Eppendorf Thermomixer). Im Anschluß daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt bis sich Phenolkristalle bildeten (ca. 5 min). Nach einer Zentrifugation (13.000 rpm, 2 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico) wurde der Überstand mit 400 µl Phenol/Chloroform extrahiert und in einem neuen Eppendorf Cup mit 40 µl 3M Natriumacetat pH 5,3 und 1 ml 96 % Ethanol p.a. versetzt und kurz gevortext. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico) wurde die RNA mit 80 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 20 µl  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen und sofort auf -80°C eingefroren. Zur Kontrolle der RNA-Qualität und zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl auf einem 1% TAE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260/280 nm gemessen.

## 6.3 Amplifikation und Klonierung von DNA

### 6.3.1 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Mit Hilfe der PCR können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen DNA-Gemisch selektiv angereichert werden. Hierzu werden zwei DNA-Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock (Biometra) oder einem Personal Cycler (Biometra) durchgeführt.

#### Reaktions-Ansatz

5 µl 10 x PCR-Puffer  
 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 µl dNTPs (je 10 mM)  
 je 1 µl Primer 1 (25 pmol/µl) und Primer 2 (25 pmol/µl)  
 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)  
 10-100 ng DNA  
 ad 50 µl Braun-H<sub>2</sub>O

mit Paraffinöl überschichtet

#### PCR-Programm:

|         |        |                |                                     |                       |
|---------|--------|----------------|-------------------------------------|-----------------------|
|         | 4 min, | 95 °C          | anfänglicher Denaturierungs-Schritt |                       |
| 30-35 x | {      | 1 min,         | 94 °C                               | Denaturierung         |
|         |        | 1 min,         | 40-70 °C                            | Hybridisierung        |
|         |        | 1 min je 1 kb, | 72 °C                               | Elongation            |
|         |        | 10 min,        | 72 °C                               | finale Polymerisation |

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

Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

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

Zur schnellen Überprüfung von Transformanten kann eine PCR direkt aus *U. maydis* Zellen durchgeführt. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanten erwiesen. Dabei muß das Zellmaterial allerdings frisch sein. Es sollte auch nur eine Kolonie für die PCR eingesetzt werden und die zu amplifizierten Fragmente sollten auch nicht länger als 1,5 kb sein. Außerdem muß beachtet werden, daß die Elongationszeiten für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden müssen. Ansonsten wurden die PCR-Proben genauso angesetzt wie in 6.3.1.

### **6.3.3 Restriktions-Analyse von DNA**

Zum Schneiden von DNA wurden Restriktions-Endonukleasen und die dazugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. Zusätzlich wurden die Reaktionen mit einer Endkonzentration von 20 µg/µl RNaseA versetzt.

Bei Verwendung zweier Enzyme wurde der Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne jedoch Star-Aktivitäten aufzuweisen. War dies nicht möglich oder weniger optimal, so wurde die DNA zunächst mit dem einem Enzym geschnitten und

dann mit 1 Volumen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (10 min, 4°C, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol, nochmaligem zentrifugieren und anschließendem Trocknen wurde das Pellet in einer geeigneten Menge H<sub>2</sub>O (Braun) gelöst und die DNA mit dem zweiten Enzym restringiert.

### 6.3.4 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation von linearisierten Plasmiden in einer späteren Ligation zu vermeiden, wurden die 5'- Enden durch die alkalische Phosphatase Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Dazu wurden 44 µl DNA-Lösung mit 5 µl 10 x SAP-Reaktionspuffer und 1 µl SAP versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz für 20 min bei 65°C inkubiert

### 6.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier oder auch mehrerer DNA-Fragmente ist mit T4-DNA-Ligase möglich. Für die Ligation von Fragmenten, z.B. auch der Ligation in ein linearisiertes Plasmid, wurden 100 ng dephosphorylierte Plasmid-DNA mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 0,5 U T4-DNA-Ligase und bis zu 7,5 µl Lösung des oder der zu klonierenden Fragmente vermennt (10 µl Endvolumen). Nach einer Inkubation von 2-3 h bei RT oder ÜN bei 14°C wurde 1 µl des Ansatzes in chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert (6.5.1).

## 6.4 Analyse von DNA

### 6.4.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurden verschiedene Verdünnungen auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarose-Gel aufgetragen. Als Mengen-Referenz diente  $\lambda$ -DNA (10, 30, 60 ng). Nach kurzer Gelelektrophorese konnte die Konzentration anhand der Banden-Intensität im Vergleich zur  $\lambda$ -DNA ermittelt werden.

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

Zur Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elektrophorese-Apparatur verwendet. Eine Suspension von 0,8 bis 2 % Agarose in TAE-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgeköcht und auf ca. 60°C erkalten lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gelegt.

Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Als Größen-Standard diente mit *Pst*I geschnittene  $\lambda$ -DNA (s. Material). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 25 – 100 V. Da sich das Ethidiumbromid in die DNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Nach der Gelelektrophorese konnten einzelne Banden aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert werden. Hierzu wurde der QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwendet.

### **6.4.3 Denaturierende Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA**

Die Denaturierung der RNA kann durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht werden. Diese liefert gegenüber der häufig verwendeten Formamid/Formaldehyd-Denaturierung eine deutlich bessere Auftrennung der RNA. Die RNA-Probe (10-15 µg) wurde dazu in 16 µl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50 % DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1 % MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V für 2 h, wobei das Gel alle 30 min im Puffer gedreht wurde. Natürlich wurde dabei auch die Elektrodenpolung vertauscht. So wurde der pH-Wert des Puffers möglichst konstant gehalten.

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

Zur Auffindung von DNA-Restriktionsfragmenten bestimmter Größen wurde die Southern-Blotting Methode durchgeführt. Die Northern-Blotting Methode wurde gewählt, um das Expressionsmuster bestimmter RNAs zu bestimmen. Die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylon-Membran übertragenen DNA- und RNA-Fragmente können hierbei durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

#### Transfer von DNA (Southern Blotting)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung eines Restriktionsansatzes von genomischer oder auch Plasmid-DNA auf einem 0,8 % Agarose-Gel wurde dieses zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Nacheinander wurde es dann für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und für 15 min zur Denaturierung in 0,4 M NaOH bei leichtem Schwenken inkubiert.

Für den Transfer auf eine Hybond-N+-Nylonmembran wurde die aufwärts gerichtete Methode gewählt. Nachdem die DNA auf die Membran überführt wurde, wurde die Membran getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (Autocrosslink, UV-Stratalinker 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert.

### Transfer von RNA (Northern Blotting)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Proben auf einem 1 % MOPS-Agarosegel wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und dann 15 min in 20 x SSC äquilibriert.

Für den Transfer auf eine Hybond-N+-Nylonmembran wurde die aufwärtsgerichtete Methode gewählt. Als Transferlösung wurde 20 x SSC verwendet. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (Autocrosslink, Stratalinker 2400, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran 5 min in der Färbelösung inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

### Herstellung radioaktiver DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde der Megaprime Labeling Kit verwendet. Die Markierung erfolgte nach Herstellerangaben.

Zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide wurde der Ansatz über eine S-200 Anionenaustauscher-Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Sonde wurde im Szintillations-Zähler (Liquid Scintillation Analyzer 1900CA TRI-CARB) auf radioaktive Markierung überprüft und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### Hybridisierung

Die auf der Nylon-Membran fixierte DNA wurde mit der radioaktiven Sonde hybridisiert. Zunächst wurde die Membran für 20 min bei 60°C mit Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die für 5 min bei 95°C denaturierte Sonde wurde zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 60°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen der Membran erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, der Fa. Amersham, Braunschweig).

### Wiederverwendung von Northern-Blot Membran durch Strippen

Um Northern-Blot-Filter für weitere Hybridisierungen verwenden zu können, wurden sie gestrippt. Dazu wurde die Membran bei 75°C in einer Lösung aus 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 0,2 % SDS für zwei Stunden inkubiert.

## **6.4.5 DNA-Sequenzierung**

Zur Bestimmung einer DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide nach Sanger (Sanger et al., 1977) gewählt. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA dient hierbei während einer Polymerase-Kettenreaktion als Matrize, als Primer fungieren Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide (IRD 800). Die Sequenzreaktion wurde mit Hilfe des Thermo sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Image Analysis Base ImagIR Version 04.0h (Fa. MWG-Biotech) ausgewertet, und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm Sequencher (Gene-Codes) exportiert werden.

## 6.5 Transformationen

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

Zur Herstellung chemokompetenter wurden 200 ml dYT-Medium mit 2 ml Übernachtskultur des Stammes DH5 $\alpha$  versetzt und in einem Schikanekolben bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 geschüttelt. Die Kultur wurde zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Megafuge 1,0R). Das Pellet wurde in 100 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> auf Eis resuspendiert und erneut zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Megafuge 1,0R). Dann wurde es vorsichtig in 5 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 % Glycerin resuspendiert. Je 100  $\mu$ l wurden in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und dann bei -80°C eingefroren. Die Transformationseffizienz wurde mit 10 ng pUC18 bestimmt.

### 6.5.2 Transformation chemokompetenter *E coli*-Zellen

Zur Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden 10  $\mu$ l des Ligationsansatzes mit 50  $\mu$ l chemokompetenten Zellen versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C gebracht und anschließend sofort mit 800  $\mu$ l dYT-Medium versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler bei 150 rpm. Anschließend wurden zwischen 100 und 200  $\mu$ l des Ansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 6.5.3 Herstellung elektrokompenter *E coli*-Zellen

25 ml einer *E. coli* Übernachtskultur (DH5 $\alpha$ ) wurden in LB-Medium angeimpft. Nach 16 Stunden Inkubation, schüttelnd bei 37°C, wurden die Zellen in 250 ml LB-Medium

aufgenommen und weiter bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,5$  wachsen gelassen. Dann wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend in 5 x 50 ml Falcon Röhrchen abzentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 0°C, Heraeus-Zentrifuge). Das Pellet wurde in 250 ml eiskaltem, sterilen Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 0°C, Heraeus-Zentrifuge). Dieser Schritt wurde mit 50 ml eiskaltem, sterilen Wasser wiederholt. Dann wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem, 10 %igem Glycerin aufgenommen und erneut wie oben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 2,5 ml eiskaltem, 10 %igen Glycerin wiederholt. Die Zellen wurden anschließend in 500  $\mu$ l eiskaltem, 10 %igen Glycerin aufgenommen und in je 50  $\mu$ l in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und für den späteren Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **6.5.4 Transformation elektrokompenter *E coli*-Zellen**

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

### 6.5.5 Protoplastierung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis*-Protoplasten wurden eine Kultur in 50 ml YEPS-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 gezogen. Diese wurde zentrifugiert (3200 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico) und das Zellsediment in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico) und das Pellet mit 2 ml SCS-Novozym-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde bei RT inkubiert, bis ca. 75 % der Zellen als runde Protoplasten vorlagen (ca. 10 bis 45 min). Die Protoplastierung wurde durch Zugabe von 10 ml SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2300 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico). Das Zellsediment wurde vorsichtig nacheinander mit zweimal 10 ml SCS-Lösung und 10 ml STC-Lösung gewaschen und jeweils wie im vorhergehenden Schritt zentrifugiert. Die Protoplasten wurden in 500 µl STC-Lösung aufgenommen, auf 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

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

Zur Transformation von *U. maydis* wurden zu 50 µl Protoplasten-Suspension 500 ng bis 5 µg lineare oder Plasmid-DNA gegeben. Ebenso wurde jeweils eine Kontrolle mit gleichem Volumen an H<sub>2</sub>O versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl eiskalter STC/PEG-Lösung vermengt. Durch die Zugabe von PEG werden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel und diese kann in die Protoplasten aufgenommen werden. Die Gemische wurden weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf Regenerations-Agar, soweit nicht anders angegeben mit Saccharose, ausplattiert und unter der Sterilbank für ca. 20 min getrocknet. Die Platten enthielten als untere Schicht 10 ml Regenerations-Agar mit einer zweifachen Antibiotika-Konzentration (Hygromycin: 400 µg/ml) und darüber 10 ml Regenerations-Agar ohne Antibiotikum (AB). So stellt sich in Folge der Diffusion auf der Oberfläche des Agars mit der Zeit die übliche Konzentration an AB ein, so dass vorher die Resistenz in den

transformierten Protoplasten zur Ausprägung kommen kann. Wurden bereits anderweitig resistente Stämme von *U. maydis* transformiert, so wurde beiden Schichten die übliche Konzentration des entsprechenden ABs zugesetzt. Die Platten wurden bei 28°C für 2 bis 5 Tage inkubiert und gebildete Kolonien auf YEED-agar mit AB vereinzelt.

## 6.6 Isolierung und Nachweis der Ustilaginsäure

### 6.6.1 Kultivierung von *Ustilago maydis* zur Ustilaginsäure-Produktion

Ustilaginsäure wird unter stickstofflimitierenden Bedingungen gebildet. Daher war ein Stickstoffmangelmedium notwendig, in dem *Ustilago maydis* Ustilaginsäure schnell und in hohen Mengen bildet. Es wurde das kommerziell erwerbliche YNB-Medium (Yeast Nitrogen Base, BD) verwendet. Als Kohlenstoffquelle wurden 5 % Glukose zugesetzt und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt.

Die Proben wurden mit 10 µl YEED-Flüssigkultur, die über Nacht bei 28°C gewachsen war, angeimpft. Die Kulturen wurden 5-6 Tage schüttelnd bei 28°C inkubiert. Es wurde mikroskopisch kontrolliert, ob Ustilaginsäure gebildet wurde.

### 6.6.2 Isolierung der Ustilaginsäure direkt aus der YNB-Flüssigkultur

*U. maydis* sekretiert in dem Mangelmedium YNB hohe Mengen an Ustilaginsäure. Für die Isolierung wurden Proben von 0,5 ml aus den Kulturansätzen entnommen.

Die Proben wurden mit 0,5 ml Ethylacetat versetzt und 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico). Der Überstand wurde dann in ein neues Eppendorf-Cup überführt und bei 70°C abgedampft (600 rpm, Thermomixer Eppendorf). Die

Ustilaginsäure-Kristalle wurden in 15 µl Methanol p.a. gelöst und für den Nachweis der Ustilaginsäure durch DC (6.6.3) verwendet.

### **6.6.3 Nachweis der Ustilaginsäure durch Dünnschichtchromatographie (DC)**

Der Nachweis der isolierten Ustilaginsäure erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Dazu wurden die 15 µl der in Methanol gelösten Ustilaginsäurekristalle vorsichtig auf eine TLC-Aluminium-Platte mit Kieselgel als Trägermaterial aufgetropft und 5 min bei RT getrocknet. In einer speziellen Kammer, die das Laufmittel Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O (65:25:4) enthielt, wurden die Proben dann soweit aufgetrennt, bis die Lauffront 2/3 der Platte erreicht hatte (30 min, RT).

Die Platte wurde dann 10 min bei RT an der Luft getrocknet und anschließend für die Detektion der Ustilaginsäure mit einem Gemisch aus Essigsäure/Schwefelsäure/Anisaldehyd (50:1:0,5) eingesprüht bis sie feucht erschien.

Nach erneutem Trocknen wurde die Platte für 2 min bei 150°C erhitzt. Die Zuckerreste der Glykolipide wurden hierbei verbrannt und als schwarze Flecken sichtbar.

## **6.7 Herstellung von Deletionskonstrukten**

Zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurde eine PCR-Strategie verwendet, die eine Zwischenklonierung unnötig macht (Kamper, 2004).

Hierfür wurden zunächst 1000 bp upstream und downstream des offenen Leserahmens des zu deletierenden Gens durch PCR amplifiziert. Hierbei wurden mit Hilfe der Primer jeweils an den Enden der Produkte, die an den offenen Leserahmen angrenzen, *Sfi*I-Schnittstellen angefügt. Die mit *Sfi*I geschnittenen Fragmente wurden anschließend mit der Hygromycinresistenzkassette *hph*, die an beiden Seiten *Sfi*I-Schnittstellen trug und mit *Sfi*I

aus dem Vektor pBShhn herausgeschnitten wurde, ligiert. Dabei sollten die Fragmente in der Reihenfolge L-Hyg-R ligieren. Eine andere Reihenfolge war nicht möglich, da die *Sfi*-Schnittstellen (GGCCNNNN' NGGCC) durch gezieltes Design so modifiziert waren, dass die beiden Flanken nicht miteinander ligieren konnten, da sie unterschiedliche Überhänge besaßen und durch die nichtpalindromische Struktur der Sequenz die beiden Flanken nicht kompatibel waren. Das fertige Konstrukt wurde mittels PCR nochmals amplifiziert und in die *Ustilago maydis* Stämme FB1 und MB215 transformiert. Die Transformanten wurden auf Hygromycin-haltigen Regenerationsplatten selektioniert.

Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Southern-Blot Analysen überprüft. Die DNA der *emt1* Deletionsstämmen wurde wie die Wildtyp-DNA mit *Bam*HI geschnitten. Als Sonde wurde ein internes Fragment des *emt1* ORFs gewählt und mit dem Blot hybridisiert. Die DNA der *mat1* Deletionsstämmen und eines Wildtypstammes wurden mit dem Restriktionsenzym *Stu*I geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte mit einer internen 500 bp Sonde. Für  $\Delta 105\_140$  wurde die genomische DNA eines Deletionsstammes und des Wildtypstammes mit *Hpa*I verdaut. Danach erfolgte die Hybridisierung mit einer internen 500 bp Sonde. Die DNA der *105\\_170* Deletionsstämmen wurde wie die Wildtyp-DNA mit *Eco*RI geschnitten und mit einer internen 500 bp Sonde hybridisiert. Die DNA der *hgt1* Deletionsmutante und des Wildtypstammes wurde mit *Eco*RI verdaut und mit einer etwa 500 bp großen internen Sonde hybridisiert.

## 6.8 Untersuchung von *U. maydis*

### 6.8.1 Infektion von Maispflanzen und Isolierung haploider Nachkommen

Zur Erzeugung von haploiden Nachkommen und zum Test der Pathogenität von *U. maydis* –Stämmen wurden im Gewächshaus, 7-10 Tage alte Maispflanzen des Typs Early Golden Bantam infiziert. Hierzu wurden 50 ml Kulturen (in YEPS-Medium angeimpft)

abzentrifugiert (2500 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico), mit 50 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und das Pellet in 1-3 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Dann wurde eine 1:1-Mischung kompetenter Kreuzungspartner hergestellt und je etwa 1 ml durch eine Spritze in den Stängel der Pflanzen injiziert. Die Pflanzen konnten nach 7-14 Tagen auf Chlorose, Anthocyan- und Tumorbildung untersucht werden. Zur Kontrolle der Pathogenität wurden die Experimente an mehreren Pflanzen durchgeführt.

Nach der Bildung von Tumoren an den infizierten Maispflanzen konnten daraus Sporen geerntet und auf H<sub>2</sub>O-Agar ausgestrichen werden. Nach 2-4 tägiger Inkubation bei 28°C wurden Mikrokolonien gepickt und auf PD-Festmedium weiter vereinzelt.

### 6.8.2 Test des Kreuzungsverhaltens auf Charcoal-PD-Agar

Um erste Schritte in der Kreuzungsreaktion von *U. maydis* festzustellen, können Mischungen verschiedener Stämme auf Charcoal-PD-Agar angezogen werden. Bei Kombination zweier kompatibler Kreuzungspartner kann der Übergang zum filamentösen Wachstum in Form eines weißen Mycels beobachtet werden. Nicht kompatible Kreuzungspartner wachsen weiter hefeartig und bilden so Kolonien mit glatter Oberfläche aus.

Zur Identifikation des Kreuzungsverhaltens eines *U. maydis*-Stammes wurde eine ÜNK dieses Stammes mit der eines kompatiblen Kreuzungspartners im Verhältnis 1:1 gemischt und 5-10 µl jeder Kombination auf Charcoal-PD-Agar aufgetropft. Kombinationen der Wildtypen untereinander dienten als Kontrollen. Nach Inkubation für 2 Tage bei 22°C ließen sich die Kreuzungen auswerten.

### **6.8.3 Test auf Hämolyse**

Hämolytische Aktivität (Carillo et al., 1996) wurde durch das Auftropfen von 10 µl einer ÜNK auf Blutagarplatten getestet (24 g/l PD, 20 g/l Agar, 8 g/l NaCl, 5 % Schafsblut [Oxoid]). Die Auswertung erfolgte nach dreitägiger Inkubation bei 28°C.

### **6.8.4 Konfrontationstest**

Zum Test auf ihre Fähigkeit, Pheromon zu produzieren und darauf zu reagieren, wurden 200 µl ÜNK der zu testenden Stämme durch Zentrifugation bei 2800 rpm ankonzentriert und in einem Tropfen Wasser aufgenommen (Snetselaar et al., 1996). Je 0,5 µl der Kreuzungspartner wurden anschließend sehr dicht nebeneinander auf einen mit Wasseragar beschichteten Objektträger ausplattiert, mit Paraffinöl bedeckt und für 14 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion der Stämme aufeinander mikroskopisch ausgewertet.

### **6.8.5 Test auf Oberflächenspannungsaktivität**

Glykolipidüberstände von Stämmen, die unter Stickstoffmangelbedingungen wachsen gelassen wurden, wurden auf ihre Oberflächenaktivität getestet. Hierbei wurden die Glykolipidüberstände auf ihre Fähigkeit hin überprüft, Tropfen auf einer hydrophoben Oberfläche (Parafilm M laboratory film) kollabieren zu lassen (Kuiper et al., 2004). 25 µl der Überstände wurden nach Zugabe von Xylencyanol aufgetropft. Der Farbstoff Xylencyanol hat keinen Einfluß auf die Tropfenform.

### 6.8.6 Test auf Toxizität

Es wurden *Ustilago maydis* Kulturen für drei Tage unter Stickstoffmangelbedingungen in YNB und 5 % Glukose angezogen. Dann wurden die Kulturen für 15 Minuten bei 60°C inkubiert, um die Zellen abzutöten. Die eine Hälfte der Kultur (5 ml) wurde abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico), und der Überstand wurde mit 5 ml frischem Medium vermischt (+ 5 % Glukose und 0,2 % Ammoniumsulfat). Mit der anderen Hälfte des Ansatzes wurde eine Ethylacetat-Extraktion vorgenommen. Die Glykolipide wurden anschließend in 10 µl Methanol aufgenommen und in 10 ml YEPS gegeben. Diese Ansätze wurden mit 100 µl einer Hefekultur angeimpft, die eine  $OD_{600} = 0,88$  besaß, was einer Zellzahl von  $1,05 \times 10^7$  Zellen/ml entspricht. Nach verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 6 h und 24 h) wurden Proben entnommen und mittels Verdünnungsreihe (1:10, 1:100 und 1:1000) auf YPD-Platten aufgetropft (jeweils 7,5 µl). Nach zwei Tagen Inkubation bei 28°C erfolgte die Auswertung.

### 6.8.7 Mikroskopie

Um *U. maydis* Zellen zellmorphologisch beurteilen zu können, und um Glykolipidbildung erkennen zu können, wurde ein Lichtmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung der Firma Zeiss verwendet. Die Glykolipide lassen sich hierbei im Fall der Ustilaginsäure als lange lichtbrechende Nadeln und im Fall der Mannosylerytritollipide als Öltropfen beobachten. Die fotografische Darstellung der Zellen erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik.

## 6.9 Expressions-Analysen

### 6.9.1 Herstellung der „Microarray-Targets“

Soweit nicht anders beschrieben wurde für die Herstellung der „Microarray-Targets“ dem *Gene-Chip Expression Analysis*-Protokoll der Firma Affymetrix gefolgt.

#### Aufreinigung und Qualitätsprüfung von RNA

Für die Synthese von cDNA wurde Gesamt RNA isoliert. MB215 Kulturen wurden in YNB Medium, 5 % Glukose und 0,2 % Ammoniumsulfat bei 28°C bis zur logarithmischen Phase wachsen gelassen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in demselben Volumen an frischem stickstofffreiem Medium resuspendiert und nach 24 h Inkubation isoliert.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Ultrospec 3000 pro, UV-Spektrometer, Amersham). Für die Überprüfung der Qualität wurde 1 µl mit einem Bioanalyser 2100 (Agilent) auf einem RNA 6000 LabChip kapillargelelektrophoretisch aufgetrennt.

60 µg RNA wurden mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen) aufgereinigt und gleichzeitig für 15 Minuten mit DNase behandelt. Dieser DNase-Verdau wurde auf der Säule mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) durchgeführt und erneut die Qualität mit dem Bioanalyser (Agilent) überprüft.

### Herstellung und Qualitätskontrolle von cDNA

Es wurden 5 µg der aufgereinigten Gesamt-RNA für die Synthese der cDNA mit dem Superscript Choice System (Invitrogen) eingesetzt. Für die Erststrangsynthese wurde das GeneChip® T7-Oligo(dT) Promotor Primer Kit (Affymetrix) verwendet. Die reverse Transkription erfolgte für eine Stunde bei 50 °C. Nach der Zweitstrangsynthese wurde die cDNA mit dem GeneChip Sample Cleanup Module (Qiagen) aufgereinigt, und mit dem Bioanalyser 2100 (Agilent) wurde die Qualität überprüft. Es wurden 2,5 µl der cDNA auf einem DNA 7500 LabChip eingesetzt.

### cRNA-Synthese und Fragmentierung

Für die *in vitro* Transkription von cDNA und dem gleichzeitigen Einbau von biotinylierten Ribonukleotiden wurde das BioArray™ HighYields™ RNA Transcript Labeling Kit (ENZO) eingesetzt. Es wurden 5 µl der aufgereinigten cDNA eingesetzt. Nach der Synthese wurde die cRNA mit dem GeneChip Sample Cleanup Module (Qiagen) aufgereinigt, und die Konzentration photometrisch bei 260 nm im UV-Spektrometer (Ultrospec 3000 pro, Amersham) bestimmt. 1 µl der cRNA wurde für die Qualitätsüberprüfung mit einem Bioanalyser 2100 auf einem RNA 6000 LabChip aufgetrennt (Agilent). Danach wurden 20 µg der cRNA-Proben in ca. 35-200 bp große Stücke fragmentiert (GeneChip Sample Cleanup Module, Qiagen). Um die vollständige Fragmentierung zu überprüfen, wurde 1 µl der Probe mit einem Bioanalyser 2100 auf einem RNA 6000 LabChip (Agilent) aufgetrennt, und anschließend wurde die Konzentration der fragmentierten cRNA photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die auf diese Weise hergestellten „Targets“ wurden mit den Microarrays hybridisiert.

## Microarray-Hybridisierung und Datenanalyse

### Hybridisierung

Es wurden 15 µg der fragmentierten cRNA nach den Angaben des *GeneChip Expression Analysis*-Protokoll für eukaryotische Target-Hybridisierung der Firma Affymetrix mit dem „MPI-UstilagoA“-Array für 16 Stunden hybridisiert. Zur „Fluoreszenzfärbung“ der hybridisierten cRNA-Fragmente wurde das EukGe-WS2 Protokoll auf der GeneChip Fluidics Station 400 (Affymetrix) abgearbeitet. Hierbei wurde zunächst das überschüssige, ungebundene Target abgewaschen. Dann wurden die an den Microarray gebundenen cRNA-Fragmente über die Biotinreste mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert.

### Datenanalyse

Nach den Wasch- und Markierungsschritten wurden die Arrays mit einem GeneArray Scanner (Agilent/Affymetrix) eingelesen. Das resultierende Bild wurde mit der Affymetrix Microarray Suite 4.0 Software ausgewertet. Für die weitere Datenanalyse wurde das Programm dChip1.2 verwendet. Mit diesem Programm wurde eine Normalisierung („Invariant set normalisation“; Li und Wong, 2001) der Microarrays durchgeführt, und anschließend die Signalstärke des Probesets berechnet. Bei der vergleichenden Analyse der experimentellen Arrays mit den Kontrollarrays wurden Gene herausgefiltert, die sich mindestens zweifach hochreguliert verhielten (Li and Wong, 2001).

## 6.10 Biochemische Analysen

### 6.10.1 Überexpression der Acetyltransferase 105\_120 in *E. coli*

Der offene Leserahmen der Acetyltransferase 105\_120 wurde durch PCR mit den Primern 5'-ACATATGAAGAGCAACGTGGATACTG-3' (kursiv: *Nde*I-Schnittstelle) und 5'-ACTCGAGCTATTCGACAAAGATGTACCTTCC-3' (kursiv: *Xba*I-Schnittstelle) amplifiziert. Das Produkt wurde mit *Nde*I und *Xba*I geschnitten und in den Expressionsvektor pET-15b (Novagen) kloniert.

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) wurde mit dem konstruierten Plasmid transformiert. Die Kolonien wurden in 2 ml LB Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C angezogen. Anschließend wurden die Kulturen 1:100 in 20 ml frischem LB Medium verdünnt und etwa eine Stunde bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,5$  wachen gelassen. Dann wurden 100 µl der Kultur als Nullprobe abgenommen, abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge Pico) und das Pellet für die spätere Bearbeitung bei -20°C eingefroren. Die Proteinexpression wurde mit 2 mM IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid) induziert und die Kulturen bei 28°C für weitere 2 Stunden schüttelnd inkubiert. Eine zweite Probe wird entnommen, ebenfalls abzentrifugiert und eingefroren.

Die Kulturen wurden abzentrifugiert (3300 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus-Zentrifuge), mit 10 ml Nickelpuffer 1 gewaschen, noch mal abzentrifugiert, das Pellet in 0,01 Volumen Nickelpuffer 2 aufgenommen und über Nacht bei -20°C eingefroren. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Lysozym für 30 Minuten bei 37°C. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico) wurde der Überstand (Lysat) abgenommen und bei -20°C eingefroren.

### 6.10.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zum Auftrennen der Proteine und zur Kontrolle, ob das gewünschte Protein exprimiert wird, wurde ein SDS Polyacrylamidgel gefahren. Die Proben wurden mit soviel Probenauftragspuffer verdünnt, dass in 10-20  $\mu$ l eine Zellkonzentration einer  $OD_{600} \sim 0,15$  enthalten sind und anschließend 3 Minuten bei 100°C aufgeköcht. Dann wurden die Zellreste abzentrifugiert (13000 rpm, 2 min, RT, Tischzentrifuge Heraeus Biofuge 13), bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Das Gel wurde bei 100 V solange laufen gelassen, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Dann wurde die Stromstärke auf 150 V erhöht. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 30 min in Protein-Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren. Das Gel wurde getrocknet.

### 6.10.3 Acetyltransferase-Assay

Die Reaktion wurde in einem 200  $\mu$ l Volumen durchgeführt (Kimura et al., 1998). Es wurden jeweils 5  $\mu$ l des Protein-Lysats, 10  $\mu$ l der modifizierten Mannosylerythritolipid-Form in 50 % Ethanol (extrahierte MELs aus einer 0,1 ml Kultur), 2,5  $\mu$ l Acetyl-CoA (100 mM) und 182,5  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Die Assays wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und mit Ethylacetat extrahiert. 170  $\mu$ l wurden mittels Dünnschichtchromatographie und 30  $\mu$ l wurden durch LC-MS<sup>3</sup>-Messungen analysiert.

## 6.11 Massenspektrometrische Untersuchungen

Für die massenspektrometrischen Messungen wurden die zu messenden, eingedampften Proben in 100  $\mu$ l 50 %igem Methanol aufgenommen und über HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) aufgereinigt (1100, Agilent, Germany). Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten über 1100 MSD-A ESI-Quadrupol Massenspektrometer (Agilent, Germany), und die hochaufgelösten Massenspektren und MS<sup>n</sup> Messungen wurden mit dem LTQ-FT Thermo Finnigan (Bremen) durchgeführt. Der HPLC-Gradient war für beide Messverfahren identisch. Proben (jeweils 95  $\mu$ l) wurden über eine 250/2-Nucleosil-C8-Säule mit einer Partikelgröße von 3  $\mu$ m (Macherey-Nagel, Germany) gegeben. Der Gradient von Solvent A (Wasser, 0,5 % Ameisensäure) und Solvent B (Methanol, 0,045 % Ameisensäure) sah wie folgt aus: linear von 60 % B zu 95 % B in 30 Minuten, ansteigend auf 95 % B in 10 Minuten. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min und die Säulentemperatur betrug 45°C. Die UV-Detektion erfolgte bei 215 nm. Der Massenbereich für die Quadrupol-Messungen erstreckte sich von 650 bis 850 m/z (im positiven Ionen Modus). Für die hochaufgelösten Messungen erstreckte sich der Massenbereich von 80 bis 800 m/z, und die FT-Auslösung betrug 100000 (Msn Isolation Width: 2,5 m/z, Normalized Collision Energy: 30 (Wideband-Modus)).

## 7. Literaturverzeichnis

- Aebi, M. and Hennet, T. (2001) Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol*, **11**, 136-141.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994) Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev*, **8**, 1367-1378.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, **122**, 2965-2976.
- Basse, C.W., Kolb, S. and Kahmann, R. (2002) A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **43**, 75-93.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, **68**, 441-450.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J. and Kahmann, R. (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **42**, 1047-1063.
- Brakhage, A.A., Al-Abdallah, Q., Tuncher, A. and Sprote, P. (2005) Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry*, **66**, 1200-1210.
- Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J. and Imberty, A. (2005) Structures and mechanism of glycosyltransferases. *Glycobiology*.
- Caffrey, P., Lynch, S., Flood, E., Finnan, S. and Oliynyk, M. (2001) Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem Biol*, **8**, 713-723.
- Campos-Garcia, J., Caro, A.D., Najera, R., Miller-Maier, R.M., Al-Tahhan, R.A. and Soberon-Chavez, G. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J Bacteriol*, **180**, 4442-4451.
- Carillo, P.G., Mardaraz, C., et al. (1996) Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J Microbiol Biotech*, **12**, 82-84.
- Challis, G.L. and Hopwood, D.A. (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100 Suppl 2**, 14555-14561.
- Charnock, S.J., Henrissat, B., et al. (2001) Three-dimensional structures of UDP-sugar glycosyltransferases illuminate the biosynthesis of plant polysaccharides. *Plant Physiol*, **125**, 527-531.

- Christensen, J.J. (1963) Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc. Monogr.*, **2**.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. and Henrissat, B. (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, **328**, 307-317.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J. and Hartman, P.E. (1966) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics*, **54**, 61-76.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. and Bisailon, J.G. (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 1908-1912.
- Farfaring, J.W., Auffarth, K. and Basse, C.W. (2005) Identification of cis-active elements in *Ustilago maydis* mig2 promoters conferring high-level activity during pathogenic growth in maize. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 75-87.
- Fluharty, A.L. and O'Brien, J.S. (1969) A mannose- and erythritol-containing glycolipid from *Ustilago maydis*. *Biochemistry*, **8**, 2627-2632.
- Ford, C.M., Boss, P.K. and Hoj, P.B. (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize Bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo. *J Biol Chem*, **273**, 9224-9233.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R. and Bolker, M. (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.*, **15**, 1632-1641.
- Hartmann, H.A., Kruger, J., Lottspeich, F. and Kahmann, R. (1999) Environmental signals controlling sexual development of the corn Smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell*, **11**, 1293-1306.
- Haskins, R.H. and Thorn, J.A. (1951) Antibiotic Activity of Ustilagic Acid. *Canadian Journal of Botany*, **29**, 585-592.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **291**, 2364-2369.
- Herman, D.C., Artiola, J.F. and Miller, R.M. (1995) Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environ Sci Technol*, **29**, 2280-2285.
- Hewald, S., Josephs, K. and Bolker, M. (2005) Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3033-3040.
- Holliday, R. (1961) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.*, **2**, 204-230.
- Hu, Y. and Walker, S. (2002) Remarkable Structural Similarities between Diverse Glycosyltransferases. *Chem Biol*, **9**, 1287-1296.
- Iida, T., Ohta, A. and Takagi, M. (1998) Cloning and characterization of an n-alkane-inducible cytochrome P450 gene essential for n-decane assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **14**, 1387-1397.
- Iida, T., Sumita, T., Ohta, A. and Takagi, M. (2000) The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning

- and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast*, **16**, 1077-1087.
- Inoh, Y., Kitamoto, D., Hirashima, N. and Nakanishi, M. (2001) Biosurfactants of MEL-A increase gene transfection mediated by cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun.*, **289**, 57-61.
- Ito, S. and Inoue, S. (1982) Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. *Appl Environ Microbiol*, **43**, 1278-1283.
- Josephs, K. (2004) Untersuchungen zur Bildung von Cellobioselipiden (Ustilaginsäure) in *Ustilago maydis*. *Doktorarbeit*.
- Kamper, J. (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, **271**, 103-110.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bolker, M. and Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**, 73-83.
- Kapitonov, D. and Yu, R.K. (1999) Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology*, **9**, 961-978.
- Kim, J.S., Powalla, M., Lang, S., Wagner, F., Lunsdorf, H. and Wray, V. (1990) Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *J Biotechnol*, **13**, 257-266.
- Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K. and Yamaguchi, I. (1998) Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101. *J Biol Chem*, **273**, 1654-1661.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K. and Honda, C. (2002) Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, **215**, 924-933.
- Koch, A.K., Kappeli, O., Fiechter, A. and Reiser, J. (1991) Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol*, **173**, 4212-4219.
- Krauss, E.M. and Chan, S.I. (1983) Complexation and phase transfer of nucleotides by gramicidin S. *Biochemistry*, **22**, 4280-4291.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J. and Bloemberg, G.V. (2004) Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol*, **51**, 97-113.
- Kulakovskaya, T.V., Kulakovskaya, E.V. and Golubev, W.I. (2003) ATP leakage from yeast cells treated by extracellular glycolipids of *Pseudozyma fusiformata*. *FEMS Yeast Res*, **3**, 401-404.
- Kurz, M., Eder, C., Isert, D., Li, Z., Paulus, E.F., Schiell, M., Toti, L., Vertesy, L., Wink, J. and Seibert, G. (2003) Ustilipids, acylated beta-D-mannopyranosyl D-erythritols from *Ustilago maydis* and *Geotrichum candidum*. *J Antibiot (Tokyo)*, **56**, 91-101.

- Lang, S. and Wullbrandt, D. (1999) Rhamnolipids--biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 22-32.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol*, **21**, 1137-1146.
- Latifi, A., Winson, M.K., Foglino, M., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Lazdunski, A. and Williams, P. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol*, **17**, 333-343.
- Lemieux, R.U., Thorn, J.A., Brice, C. and Haskins, R.H. (1951) Biochemistry of the ustilaginales. II. Isolation and partial characterization of ustilagic acid. *Can J Chem*, **29**, 409-414.
- Li, C. and Wong, W.H. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 31-36.
- Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P. and Tudzynski, B. (2005) Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes, P450-1 and P450-4, of the gibberellic acid gene cluster in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi* MP-D). *Appl Environ Microbiol*, **71**, 1462-1472.
- Marahiel, M.A., Nakano, M.M. and Zuber, P. (1993) Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol Microbiol*, **7**, 631-636.
- Mimee, B., Labbe, C., Pelletier, R. and Belanger, R.R. (2005) Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 1597-1599.
- Neu, T.R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev*, **60**, 151-166.
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A. and Reiser, J. (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **176**, 2044-2054.
- Ochsner, U.A. and Reiser, J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6424-6428.
- Parkinson, M. (1985) Bio-surfactants. *Biotechnol Adv*, **3**, 65-83.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C. and Iglewski, B.H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol*, **179**, 5756-5767.
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C. and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **179**, 3127-3132.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M. and Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 553-563.

- Puchkov, E.O., Wiese, A., Seydel, U. and Kulakovskaya, T.V. (2001) Cytoplasmic membrane of a sensitive yeast is a primary target for *Cryptococcus humicola* mycocidal compound (microcin). *Biochim Biophys Acta*, **1512**, 239-250.
- Reed, R.W. and Holder, M.A. (1953) The Antibacterial Spectrum of Ustilagic Acid. *Canadian Journal of Medical Science*, **31**, 505-511.
- Ren, Q., Sierro, N., et al. (2000) FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **182**, 2978-2981.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol*, **3**, 229-236.
- Rosenberg, E. and Ron, E.Z. (1997) Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 313-316.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
- Sandrin, T.R., Chech, A.M. and Maier, R.M. (2000) A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 4585-4588.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Shreve, G.S., Inguva, S. and Gunnam, S. (1995) Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Mar Biol Biotechnol*, **4**, 331-337.
- Snetselaar, K.M. (1993) Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Experimental Mycology*, **17**, 345-355.
- Snetselaar, K.M., Bolker, M. and Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol*, **20**, 299-312.
- Snetselaar, K.M. and Mims, C.W. (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M. and Mims, C.W. (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Micol. Res.*, **98**, 347-355.
- Spellig, T., Bölker, M., et al. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.*, **13**, 1620-1627.
- Spoeckner, S., Wray, V., et al. (1999) Glycolipids of the Smut fungus *Ustilago maydis* from the cultivation on renewable resources. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 33-39.
- Teichmann, B. (2005) Identifizierung der für die Ustilaginsäureproduktion zuständigen Cytochrom P450 Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 in *Ustilago maydis*. *Diplomarbeit*.
- Thevelein, J.M. and de Winde, J.H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **33**, 904-918.

- Tsuge, K., Ano, T. and Shoda, M. (1996) Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Arch Microbiol*, **165**, 243-251.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. and Holloman, W.K. (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, **8**, 3703-3709.
- Tuleva, B.K., Ivanov, G.R. and Christova, N.E. (2002) Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Z Naturforsch [C]*, **57**, 356-360.
- Van Delden, C., Pesci, E.C., Pearson, J.P. and Iglewski, B.H. (1998) Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. *Infect Immun*, **66**, 4499-4502.
- Walton, J.D. (2000) Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene cluster in fungi: an hypothesis. *Fungal Genet Biol*, **30**, 167-171.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H.L. (1995) Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 1706-1713.
- Yu, J., Bhatnagar, D. and Ehrlich, K.C. (2002) Aflatoxin biosynthesis. *Rev Iberoam Micol*, **19**, 191-200.
- Zhao, X., Wakamatsu, Y., Shibahara, M., Nomura, N., Geltinger, C., Nakahara, T., Murata, T. and Yokoyama, K.K. (1999) Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. *Cancer Res.*, **59**, 482-486.

# Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Michael Bölker für die interessante Themenstellung und seine stets freundliche Unterstützung. Außerdem danke ich Prof. Hans-Ulrich Mösch, Prof. Alfred Batschauer und Prof. Mohamed A. Marahiel für die freundliche Übernahme der Gutachten.

Dr. Uwe Linne danke ich für die Durchführungen der MS-Analysen, PD Jörg Kämper und Dr. Mario Scherer danke ich für die Hilfe bei den Microarray-Analysen.

Außerdem danke ich der jetzigen und ehemaligen AG Bölker für das hervorragende Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Ute Kämper und Dr. Björn Sandrock für die anregenden Diskussionen bedanken. Dr. Björn Sandrock danke ich außerdem für das Korrekturlesen und Kay Schink für seine Hilfe bei Computerfragen. Beate Teichmann, Michael Mahlert, Susann Adler, Susanne Rindt, Verena Welteke, Christian Böhmer, Attila Pinter, Andrea Hlubek, Cornelia Dietz und Marisa Piscator danke ich für die schöne Zeit und die gute Zusammenarbeit. Ich danke Frau Heide Barbara Böttner für ihre Mütterlichkeit und die zahlreichen interessanten Gespräche.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund Tim für ihre herzliche Unterstützung danken.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Sandra Hewald  
geboren am: 09.06.1976 in Dortmund

## Schulbildung

08.1983 – 07.1987 Fine-Frau-Grundschule in Dortmund  
08.1987 – 06.1996 Reinoldus- und Schiller-Gymnasium in Dortmund  
Abschluss: Abitur (2,7)

## Hochschulstudium

10.1996 – 01.1999 Grundstudium des Studienganges Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

01.1999 – 09.2001 Hauptstudium des Studienganges Biologie an der Ruhr-Universität Bochum  
**Abschluss: Diplom-Biologin (gut) 10 Semester**

**Diplomarbeit am Lehrstuhl für Allgemeine und molekulare Botanik**  
**„Heterologe Genexpression in *Chlamydomonas reinhardtii*“**

## Promotion

05.2002 – 11.2005 Promotion an der Philipps-Universität Marburg im Fachbereich Genetik  
**Titel der Doktorarbeit:**  
**„Identifizierung und Charakterisierung zweier für die Produktion extrazellulärer Glykolipide verantwortlichen Gencluster in *Ustilago maydis*“**  
Betreuer: Prof. Dr. Michael Bölker

## Veröffentlichung

Hewald, S, Josephs, K and Bölker, M (2005)  
„Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis*“.  
*Appl Environ Microbiol*, **71**, 3033-3040.