



Charakterisierung der Akquisition von Kohlenhydraten in *Ustilago maydis*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften am
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von
Dipl. Biol. David Schuler
aus Karlsruhe

Juni 2013

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper
Co-Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2013

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung der Akquisition von Kohlenhydraten in *Ustilago maydis*“

eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt sowie mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich gekennzeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Weiterhin habe ich die Satzung zur guten wissenschaftlichen Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 an der Universität Karlsruhe vom 15. Januar 2002 beachtet.

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

(Ort, Datum)

(David Schuler)

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2010 bis Mai 2013 in der Abteilung Genetik des Instituts für Angewandte Biowissenschaften am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.

Zusammenfassung

Zu den wichtigsten Zielen zahlreicher Organismen gehört die Akquisition der durch Photosynthese generierten Kohlenstoffverbindungen von Pflanzen zur Energiegewinnung. Unter den vielen, zum Teil sehr verschiedenen Strategien, die sich zum Erreichen dieses Ziels entwickelt haben, stellt der biotrophe Lebensstil vieler phytopathogener Pilze wohl eine der außergewöhnlicheren dar. Diese teilweise ernteschädlichen und daher auch wirtschaftlich bedeutsamen Pilze eignen sich oft bereits die mono- oder oligomeren pflanzlichen Transportzucker an, noch bevor diese ihren eigentlichen Zielort in der Pflanze erreicht haben. Während der Entwicklung der biotrophen Pilze wird der Wirt am Leben erhalten, was eine nachhaltige Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet, allerdings auch ein hohes Maß an Anpassung voraussetzt. Der Maisbrandpilz *Ustilago maydis* stellt als Modellorganismus für die Erforschung der biotrophen Lebensweise einen wichtigen Vertreter dieser Gruppe von Pflanzenpathogenen dar. In der vorliegenden Dissertation wurden Mechanismen untersucht, die bei der Aufnahme und Verwertung von Kohlenhydraten sowohl während der biotrophen als auch der saprotrophen Lebensphase von *U. maydis* eine Rolle spielen.

Frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass neben dem Saccharose-Transporter Srt1 auch der Hexosetransporter Hxt1 essentiell für die vollständige pathogene Entwicklung von *U. maydis* in Maiskeimlingen ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Befunde durch Untersuchungen an adulten Maispflanzen bestätigt werden. Dabei zeigte sich auch, dass die Kohlenhydrataufnahme-Strategien von *U. maydis* in Sink- und Source-Geweben nicht maßgeblich voneinander abweichen. Weiterhin konnten zum ersten Mal Zuckertransporter der SWEET-Familie in Mais identifiziert werden, deren Expression nach einem Pathogenbefall durch *U. maydis* induziert ist. Die funktionelle Charakterisierung dieser Transporter zeigte, dass neben den beiden Glucose-Transportern ZmSwt4a/b mit ZmSWT11 einer der ersten Saccharose-Effluxtransporter überhaupt gefunden wurde. Diese Befunde passen erstaunlich gut zu den Substratspektren der pathogenitätsrelevanten Transporter Srt1 und Hxt1 in *U. maydis*, da angenommen wird, dass die Induktion von SWEET-Proteinen durch Pathogene eine Versorgung der Infektionsstellen mit Zuckern aus dem Zytoplasma der umliegenden Wirtszellen gewährleistet.

Die Deletion von *hxt1* führt einem verbesserten Wachstum auf Galactose-haltigen Medien. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht auf einer zusätzlichen Sensorfunktion von Hxt1 beruht, sondern dass Galactose einen toxischen Effekt auf *U. maydis* ausübt, der durch einen Hxt1-abhängigen Transport begünstigt wird. Dieser Effekt konnte in Abwesenheit von Hxt1 auch durch verschiedene heterologe Transportsysteme vermittelt werden. Durch die Charakterisierung einer Mutation in der Galactokinase Gal1 konnten zudem Einblicke in die Mechanismen erlangt werden, die dem

toxischen Effekt von Galactose in *U. maydis* zugrunde liegen. Dabei zeigte sich, dass eine reduzierte Galactokinase-Aktivität zu einer höheren Galactose-Toleranz führt, was auf Galactose-1-Phosphat als toxisches Intermediat schließen lässt. Die Beobachtung einer Galactokinase-unabhängigen Toxizität deutet zudem auf einen weiteren, bisher unbekanntem Mechanismus der Galactose-Sensitivität hin.

Bei der weiteren Charakterisierung der putativen Sensorfunktion von Hxt1 führte eine gezielte Mutation in Hxt1, die in Hxt1-ähnlichen Glucose-Sensoren einen konstitutiven Signalweg zur Folge hat, zu einem frühen Abbruch der pathogenen Entwicklung und damit zum vollständigen Verlust der Pathogenität. Dies stellt aufgrund der nur leicht reduzierten Pathogenität von *hxt1*-Deletionsstämmen ein unerwartetes Ergebnis dar. Untersuchungen mit weiteren mutierten *hxt1*-Allelen deuten auf einen spezifischen Zusammenhang zwischen der Mutation und dem beobachteten Phänotyp hin. Durch Transkriptomanalysen konnten Hinweise auf eine Modifikation der Glucose-Repression während der initialen Infektionsphase gefunden werden, die möglicherweise über die indirekte Modulation eines intrazellulären Nährstoff-Signals zur Stagnation der pathogenen Entwicklung führt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Ustilago maydis</i>	1
1.2	Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	2
1.3	Die Paarungstyp-Loci von <i>U. maydis</i>	5
1.3.1	Der <i>a</i> -Locus kontrolliert Erkennung und Fusion kompatibler Sporidien	5
1.3.2	Der <i>b</i> -Locus kodiert für den zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i>	7
1.4	Die Pflanze als Nährstofflieferant für phytopathogene Pilze	8
1.4.1	Voraussetzungen für eine erfolgreiche Infektion	8
1.4.2	Infektionsstrategien phytopathogener Pilze	9
1.4.3	Vorkommen und Verteilung von Kohlenhydraten in Pflanzen und ihre Verfügbarkeit für Pathogene	10
1.5	Kohlenhydrat-Aufnahmemechanismen phytopathogener Pilze.....	14
1.6	Zuckertransporter in <i>Ustilago maydis</i>	15
1.7	Zuckerabhängige Regulationsmechanismen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.7.1	Die Glucose-abhängige Induktion der <i>HXT</i> -Gene.....	18
1.7.2	Die Glucose-Repression.....	19
1.7.3	Die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen	21
1.8	Zielsetzung.....	22
2	Ergebnisse	24
2.1	Die Rolle von Zuckertransportern während der <i>Ustilago maydis</i> / <i>Zea mays</i> Pathogeninteraktion	24
2.1.1	Untersuchung der Expression von Zuckertransportern in <i>U. maydis</i> in verschiedenen Organen der Wirtspflanze	25
2.1.2	Pathogenität von <i>U. maydis</i> Zuckertransporter-Deletionsstämmen bei der Infektion adulter Pflanzen.....	26
2.2	Die Rolle von Zuckertransportern der SWEET-Familie in Mais während der Interaktion mit <i>Ustilago maydis</i>	29
2.2.1	Expression von Sweet-Genen in Mais während der Infektion mit <i>U. maydis</i>	29
2.2.2	Die während der Interaktion mit <i>U. maydis</i> induzierten Sweet-Gene in Mais kodieren für funktionelle Zuckertransporter	33
2.3	Infektion von Maislinien mit Defekten beim Export von Photoassimilaten.....	36
2.4	Komplementation der <i>hxt1</i> -Deletion	38
2.5	Der Austausch einer einzelnen Aminosäure in Hxt1 führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität.....	41

2.6	Die Überexpression von Hxt1(R164K) führt nicht zur Beeinträchtigung der Paarungskompetenz	46
2.7	Charakterisierung weiterer mutierter <i>hxt1</i> -Allele	48
2.8	Differenzielle Genregulation in Folge der Überexpression von <i>hxt1(R164K)</i>	51
2.8.1	Die Überexpression von <i>hxt1(R164K)</i> beeinflusst die Glucose-abhängige Regulation von Genen in axenischer Kultur	51
2.8.2	Transkriptomanalysen der frühen Infektionsphase von UDS10.....	53
2.9	Untersuchung der Hxt1-abhängigen Wachstumsinhibition durch Galactose.....	56
2.9.1	Die Galactose-vermittelte Wachstumshemmung ist dominant über die Anwesenheit von Saccharose jedoch nicht von Glucose.....	58
2.9.2	Heterologe Komplementation der <i>hxt1</i> -Deletion	60
2.9.3	Messung der Galactose-Aufnahme in <i>hxt1</i> -Deletionsstämmen.....	62
2.10	Der Austausch einer einzelnen Aminosäure der Galactokinase Gal1 erlaubt <i>U. maydis</i> das Wachstum auf Galactose-haltigem Medium	63
2.10.1	Charakterisierung von <i>gal1(Y67F)</i>	64
2.10.2	Vergleich des inhibitorischen Effekts von Galactose und 2-Deoxy-Galactose	66
2.10.3	Heterologe Expression von Gal1(Y67F) in Hefe	68
2.10.4	Der Leloir-Weg ist notwendig für ein verbessertes Wachstum auf Galactose-haltigen Medien	69
2.10.5	Expression der Enzyme des Leloir-Wegs	70
3	Diskussion	73
3.1	Srt1 und Hxt1 stellen in <i>U. maydis</i> unabhängig von den Wirtsorganen die wichtigsten Zuckertransporter während der biotrophen Phase dar	73
3.2	Die Infektion mit <i>Ustilago maydis</i> führt in Mais zur Induktion von Zucker-Effluxtransportern.....	76
3.3	Hxt1 ist der wichtigste Glucose-Transporter in <i>U. maydis</i>	78
3.4	Hxt1 ist ein potentieller Glucose-Sensor	79
3.4.1	Die Überexpression von Hxt1(R164K) im <i>hxt1</i> -Deletionshintergrund führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität.....	81
3.4.2	Die Auswirkungen von Hxt1(R164K) auf die Genexpression.....	82
3.4.3	Modell zur Integration eines Hxt1(R164K)-abhängigen Signals in pathogenitätsrelevante Entwicklungsschritte	86
3.5	Die mögliche Doppelfunktion von Hxt1 als Transporter und Sensor	89
3.6	Der Hxt1-vermittelte Transport ist ausschlaggebend für die Wachstumsinhibition durch Galactose	92
3.7	Die Wachstumsinhibition durch Galactose.....	93
3.7.1	Die Mutation in <i>gal1(Y67F)</i> führt zu einer reduzierten Galactokinase-Aktivität.....	95
3.7.1	Die Mutation in <i>gal1(Y67F)</i> führt zu einer stärkeren Induktion der <i>gal</i> -Gene.....	97
3.7.2	Die Galactokinase-unabhängige Galactose-Toxizität in <i>U. maydis</i>	99

3.7.3	Modell der Galactose-Toxizität in <i>U. maydis</i>	101
4	Material und Methoden.....	103
4.1	Material und Bezugsquellen.....	103
4.1.1	Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme Kits und Medien	103
4.1.2	Stämme	105
4.1.3	Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide.....	109
4.1.4	Sonstige Materialien.....	128
4.2	Mikrobiologische und genetische Methoden	128
4.2.1	<i>E. coli</i>	128
4.2.2	<i>S. cerevisiae</i>	129
4.2.3	<i>U. maydis</i>	130
4.2.4	Mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie von <i>U.maydis</i>	131
4.3	Molekularbiologische Standardmethoden	133
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	133
4.3.2	Handhabung und in vitro-Modifikationen von Nukleinsäuren.....	135
4.3.3	Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen.....	138
4.4	Biochemische Methoden.....	139
4.4.1	Isolierung von Gesamtprotein aus <i>U. maydis</i>	139
4.4.2	Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE).....	139
4.4.3	Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse).....	140
4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierte Methoden	141
4.5.1	Standard PCR-Ansätze	141
4.5.2	Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für <i>U. maydis</i>	142
4.5.3	DNase I Behandlung und Reverse Transkription für die Real-Time-PCR	143
4.5.4	Real-Time-PCR (qRT-PCR)	143
4.6	Transkriptomanalysen.....	143
4.7	Sequenzanalysen und <i>in silico</i> Methoden.....	144
5	Literaturverzeichnis	146
6	Anhang.....	167

Abkürzungen

2dGal	2-Deoxy-Galactose	His/H	Histidin
ADP	Adenosindiphosphat	hpi	Stunden nach Injektion (hours post injection)
AM	Ammonium- Minimalmedium	HRP	Meerrettich-Peroxidase
Amp	Ampicillin	Hyg	Hygromycin
APS	Ammoniumpersulfat	(...) ^{ipm}	mehrfache Integration im <i>ip</i> -Locus
Arg/R	Arginin	(...) ^{ips}	einfache Integration im <i>ip</i> - Locus
AS	Aminosäure	Kan	Kanamycin
ATP	Adenosintri-phosphat	kb	Kilobasenpaare
bE	bEast	Lys/K	Lysin
BLAST	basic local alignment search tool	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
bW	bWest	Nat	Nurseothricin
C	Carboxy/Kohlenstoff	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
cAMP	zyklisches Adnosin- monophosphat	ORF	offener Leserahmen
Cbx	Carbocin	PCR	Polymerase- Kettenreaktion
Cm	Chloramphenicol	Phe/F	Phenylalanin
CM	Komplex-Medium	Phleo	Phloemycin
dpi	Tage nach Injektion (days post injection)	PR	pathogenesis related, pathogenitätsbezogen
DSDS	Natriumdodecyl-Sulfat	P _{xyz}	Promotor
EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure	qRT	quantitative Realtime
Fruc	Fructose	Spec	Spectinomycin
Gal	Galactose	Suc	Saccharose
Gal-1-P	Galactose-1-Phosphat	Tyr/Y	Tyrosin
Gal-6-P	Galactose-6-Phosphat	UDP	Uridindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein	ÜN	über Nacht
Gluc	Glucose	Ura	Uracil
Gluc-1-P	Glucose-1-Phosphat	UTP	Uridintri-phosphat
Gluc-6-P	Glucose-6-Phosphat	WT	Wildtyp
H ₂ Obid.	zweifach destilliertes Wasser		

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*

Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes und zählt in der Abteilung der Basidiomyceten zu den Brandpilzen (*Ustilaginaceae*). Die etwa 1200 Vertreter der Brandpilze können zusammen ca. 4000 Pflanzenspezies infizieren, von denen die meisten zu den Gräsern (*Graminaceae*) zählen. Die Wirts-Spezies der Brandpilze umfassen auch einige der weltweit wichtigsten Kulturpflanzen wie Mais, Gerste, Weizen, Hafer, Hirse oder Zuckerrohr (Bakkeren *et al.*, 2008).

Wie alle Brandpilze ist auch *U. maydis* als biotropher Pilz für seine Entwicklung auf lebendes, pflanzliches Gewebe angewiesen (Christensen, 1963). Das für biotrophe Pilze typische, enge Wirtsspektrum beschränkt sich bei *U. maydis* auf Mais (*Zea mays*) und dessen Urform Teosinte (*Euchlena mexicana*) als einzige Wirtspflanzen (Doebley, 1992). Nach einer Infektion zeigen die Pflanzen die erstmals 1754 von Bonnet beschriebenen Symptome, zu denen Chlorosen, Anthocyanosen und die charakteristischen Tumore gehören, die an allen oberirdischen Teilen der Pflanze auftreten können. Beim Aufbrechen dieser Tumore werden die stark melanisierten, schwarz gefärbten Teliosporen freigesetzt, welche die durch Wind, Regen und Insekten transportierte Verbreitungsform von *U. maydis* darstellen (Christensen, 1963). Trotz seiner ubiquitären Verbreitung fallen die durch *U. maydis* verursachten Ernteauffälle eher gering aus, was auch an der Verwendung teilresistenter Maislinien liegt (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002). Daher spielt das wirtschaftliche Interesse bei der Erforschung der Infektionsmechanismen von *U. maydis* eine eher untergeordnete Rolle.

Trotzdem hat sich *U. maydis* in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen Modellorganismus entwickelt. Als solcher findet er bei der Aufklärung von Infektionsstrategien phytopathogener Pilze, aber auch bei der Untersuchung diverser zellulärer Entwicklungsprozesse wie der sexuellen Entwicklung oder dem polaren Wachstum Verwendung (Bakkeren *et al.*, 2008; Brefort *et al.*, 2009; Steinberg und Perez-Martin, 2008). *U. maydis* besitzt viele für Modellorganismen wichtige Eigenschaften, wie die einfache Kultivierung in axenischer Kultur und die Zugänglichkeit für genetische Manipulationen, womit er unter den biotrophen Pilzen eher eine Ausnahme darstellt. So erlaubt eine effizient ablaufende homologe Rekombination und die Verfügbarkeit von dominanten Selektionsmarkern die leichte Generierung von Insertions- und Deletionsmutanten (Gold *et al.*, 1994b; Holloman *et al.*, 2008; Kahmann und Kämper, 2004; Keon *et al.*, 1991). Durch die

Veröffentlichung der Genomsequenz sind zudem gezielte revers-genetische Ansätze und der Einsatz von Methoden wie DNA-Arrays oder RNA-Sequenzierung möglich (Kämper *et al.*, 2006). Fragestellungen bezüglich der pathogenen Entwicklung können durch die Infektion von Maiskeimlingen untersucht werden, wobei der Lebenszyklus innerhalb von etwa drei Wochen durchlaufen wird und so ein rasches genetisches Arbeiten möglich ist (Christensen, 1963; Holliday, 1961; Holliday, 1974).

1.2 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Der Lebenszyklus von *U. maydis* lässt sich in eine saprophytische und eine biotrophe Phase unterteilen. Die in der saprophytischen Phase dominierende Form stellen haploide Sporidien dar, die sich durch hefeartige Knospung vermehren (Abb. 1.1). In dieser Form ist der Pilz apathogen und lässt sich leicht unter Laborbedingungen kultivieren. Für die Ausbildung der pathogenen Form von *U. maydis* ist die Paarung mit einem kompatiblen Kreuzungspartner nötig. Die Kompatibilität wird über ein tetrapolares Kreuzungstyp-System vermittelt, auf das im Abschnitt 1.3 noch genauer eingegangen wird. Die Paarung wird durch die pheromonvermittelte Perzeption eines Kreuzungspartners initiiert. In Folge kommt es zu einer Arretierung des Zellzyklus und zur Ausbildung von Konjugationshyphen, welche zu dem infektiösen dikaryotischen Filament fusionieren können (Christensen, 1963; Garcia-Muse *et al.*, 2003; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Das dikaryotische Filament wächst durch Spitzenwachstum und der Zellzyklusarrest bleibt bis zur erfolgreichen Penetration der Pflanze erhalten. Während des Wachstums wird die Pilzhyphe durch das Einziehen von Septen unterteilt, wobei jedoch nur das apikale Kompartiment mit Zytoplasma gefüllt ist (Banuett und Herskowitz, 1994). Unter Laborbedingungen kann die Ausbildung des dikaryotischen Filaments durch die Verwendung von aktivkohlehaltigem Medium nachvollzogen und in Form eines pelzartigen Myzels beobachtet werden. Auf der Pflanzenoberfläche kommt das filamentöse Wachstum durch bisher unbekannte Signale zum Stillstand und geht in die Ausbildung einer spezialisierten Infektionsstruktur über, dem Appressorium. Die Appressorien vieler anderer phytopathogener Pilze besitzen dicke Zellwände, die durch Melanin-Einlagerungen verstärkt sind. Dadurch kann ein immenser Druck im Inneren des Appressoriums aufgebaut werden, der eine Penetration der Pflanzenoberfläche durch mechanische Kraft ermöglicht (Bechinger *et al.*, 1999; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993; Staples, 1985). Das von *U. maydis* gebildete Appressorium weist dagegen keine Einlagerung von Melanin und nur relativ dünne Zellwände auf und markiert daher wohl nur die Stelle, an der sich die Wachstumsrichtung ändert. Die Penetration wird dabei wahrscheinlich durch die lokale Sekretion von lytischen Enzymen ermöglicht (Kahmann und Kämper, 2004; Kahmann *et al.*, 2000; Schirawski *et al.*,

2005a). Nach erfolgreicher Penetration wird der G2-Zellzyklusarrest aufgehoben, was die Proliferation des dikaryotischen Filaments innerhalb der Wirtspflanze erlaubt und die biotrophe Phase einleitet. Die Zellkernverteilung erfolgt dabei durch die für Basidiomyceten spezifischen Schnallenzellen, die bei *U. maydis* charakteristisch für das Wachstum innerhalb der Pflanze sind (Banuett und Herskowitz, 1996; Scherer *et al.*, 2006). Während des intra- und interzellulären Wachstums der Hyphen bleibt das pflanzliche Gewebe intakt, und außer der Ausbildung von Chlorosen und Anthocyan kommt es zu keiner Abwehrreaktion durch die Wirtspflanze. Bereits während der initialen Stadien kann beobachtet werden, dass *U. maydis* bevorzugt entlang von Leitbündeln, also in nährstoffreichem Gewebe proliferiert (Abb. 1.1 D). Die Einstülpung der pflanzlichen Plasmamembran um die Pilzhyphen herum führt zur Entstehung einer biotrophen Interaktionszone, in der Nährstoffe durch den Pilz aufgenommen und Signale ausgetauscht werden. Im Verlauf der Infektion kommt es durch eine erhöhte Teilungsrates und einem verstärkten Zellwachstum pflanzlicher Zellen zur Ausbildung von Tumoren, innerhalb derer eine massive Proliferation pilzlichen Myzels stattfindet. Im weiteren Verlauf fragmentieren Teile der Hyphen, es kommt zur Karyogamie und zur Differenzierung der diploiden Brandsporen. Diese werden beim Aufplatzen der Tumore in die Umwelt entlassen, wo sie lange Zeit überdauern können und unter geeigneten Bedingungen auskeimen. Als Folge der bei der Keimung ablaufenden Meiose wandern vier haploide Kerne in die Probasidie ein, von der durch mitotische Teilungen die Sporidien der neuen Generation abgeschnürt werden (Christensen, 1963).

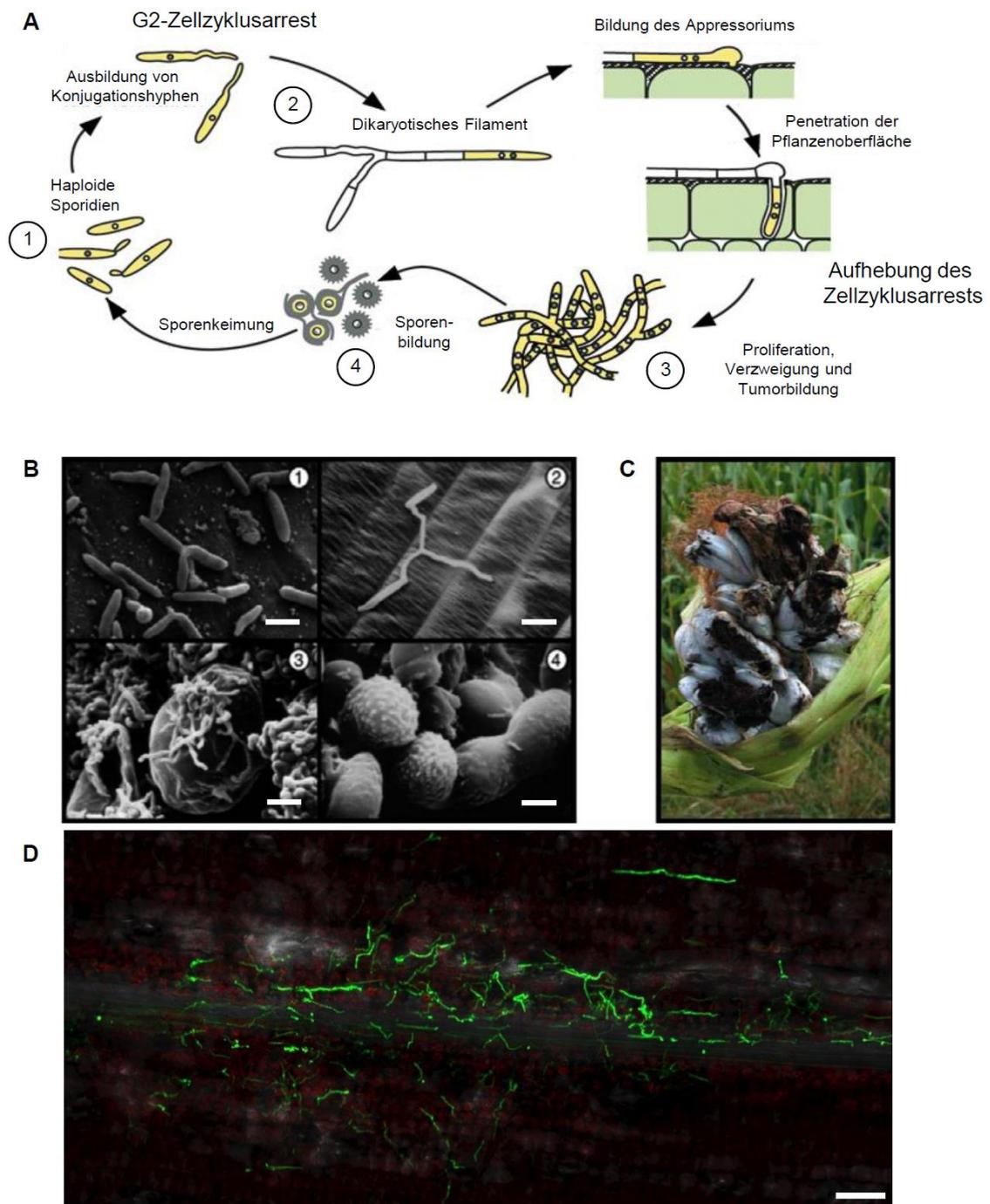


Abb. 1.1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*. (A) & (B) Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahmen der Entwicklungsstadien. 1: haploide Sporidien, Wachstum durch Knospung, 2: Zellfusion zweier Sporidien zu filamentösem Heterokaryon, 3: Proliferation des Pilzmyzels im Tumor, 4: Bildung der Teliosporen. Maßstabsbalken entsprechen 5 μm (1+2), 10 μm (3), 2 μm (4), Schema nach Kämper *et al.*, 2006, Bild 1,4 G. Wanner, Universität München, Bild 2,3 aus Snetselaar und Mims, 1993; Snetselaar und Mims, 1994 (C) Tumorbildung auf einem Maiskolben (aus Kahmann und Kämper, 2004). (D) Mikroskopische Aufnahme von GFP-markierten Hyphen zwei Tage nach Infektion. Das Wachstum erfolgt präferentiell entlang des größtenteils Chlorophyll-freien Leitbündelgewebes. grün: GFP, rot: Chlorophyll Autofluoreszenz, der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

1.3 Die Paarungstyp-Loci von *U. maydis*

Die sexuelle und pathogene Entwicklung ist in Brandpilzen eng miteinander verknüpft (Bakkeren *et al.*, 2008). Die Bildung eines infektiösen Dikaryons wird dabei durch Paarungstyp-Loci kontrolliert, was der Erhaltung der genetischen Diversität dient. Im tetrapolaren Paarungstyp-System von *U. maydis* sind diese durch die sog. *a*- und *b*-Loci repräsentiert und kodieren wie in den meisten tetrapolaren Systemen bei Basidiomyceten für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-basiertes Zell/Zell-Erkennungssystem sowie für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (Bölker *et al.*, 1992; Gillissen *et al.*, 1992; Morrow und Fraser, 2009; Schulz *et al.*, 1990).

1.3.1 Der *a*-Locus kontrolliert Erkennung und Fusion kompatibler Sporidien

Der biallelische *a*-Locus kodiert für den Pheromonvorläufer Mfa (mating factor *a*) und den Pheromonrezeptor Pra (pheromone receptor *a*) und liegt in den Allelen *a1* und *a2* vor. Mfa1 und Mfa2 werden durch posttranslationale Modifikationen von den 40 bzw. 38 Aminosäuren umfassenden Vorläufermolekülen zu den 13 bzw. 9 Aminosäuren umfassenden sekretierten Pheromonen prozessiert, die am Carboxy (C)-Terminus vermutlich farnesyliert und methyliert sind (Spellig *et al.*, 1994). Die Pheromon-Rezeptoren Pra1 und Pra2 besitzen je sieben Transmembrandomänen und zählen zu den Ste3p-ähnlichen Rezeptoren, die typischerweise an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind (Bölker *et al.*, 1992). Der *a2*-Locus umfasst zusätzlich die Gene *rga2* und *lga2*, welche die uniparentale Vererbung mitochondrialer DNA vermitteln (Bortfeld *et al.*, 2004; Fedler *et al.*, 2009; Mahler *et al.*, 2009).

Die Perzeption des im jeweils komplementären *a*-Locus kodierten Lipidpheromons durch den Pheromon-Rezeptor führt zur Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase und zur Ausbildung von Konjugationshyphen, die entlang eines Pheromon-Gradienten aufeinander zuwachsen (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Snetselaar *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994). Diese Reaktionen werden durch eine Signal-Kaskade vermittelt, an deren Ende die Aktivierung Paarungsspezifischer Gene durch den Transkriptionsfaktor Prf1 steht (Urban *et al.*, 1996). Die Bindung des Pheromons an den Rezeptor führt zu Aktivierung einer Proteinkinase A (PKA) und einer Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-vermittelten Signalkaskade, die eine differenzielle Phosphorylierung von Prf1 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase ADR1 sowie die MAPK Kpp2 zur Folge hat (Abb. 1.2) (Kaffarnik *et al.*, 2003). Die differenzielle Induktion der Prf1-Zielgene erfolgt dann in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus von Prf1. Die transkriptionelle Regulation von *prf1* erfolgt ebenfalls über PRE-Elemente sowie über eine kohlenhydratabhängige Aktivierung durch UAS-Elemente (upstream activating sequence), die im *prf1*-Promotor enthalten sind (Hartmann *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 1999).

Über die Art oder die Integration des Signals für diese kohlenhydratabhängige Regulation ist nichts Näheres bekannt. Es wurde jedoch spekuliert, dass das entsprechende Signal über einen membranständigen Glucose-Sensor vermittelt werden könnte (Hartmann *et al.*, 1999). Zu den Prf1-Zielgenen gehören neben *prf1* die *a*-Locus Gene *mfa* und *pra*, die Gene des *b*-Locus sowie *rbf1*, das für einen C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor kodiert und einen zentralen Regulator für die pathogene Entwicklung darstellt (Hartmann *et al.*, 1996; Heimel *et al.*, 2010b; Urban *et al.*, 1996; Zarnack *et al.*, 2008). Die Aktivierung der *a*-Gene führt durch die Auto-Induktion von *prf1* zu einer Amplifikation der Pheromon-Antwort, die erst nach der Fusion der Sporidien mit kompatiblen *b*-Loci durch eine Repression von *pra* und *mfa* unterbrochen wird (Urban *et al.*, 1996).

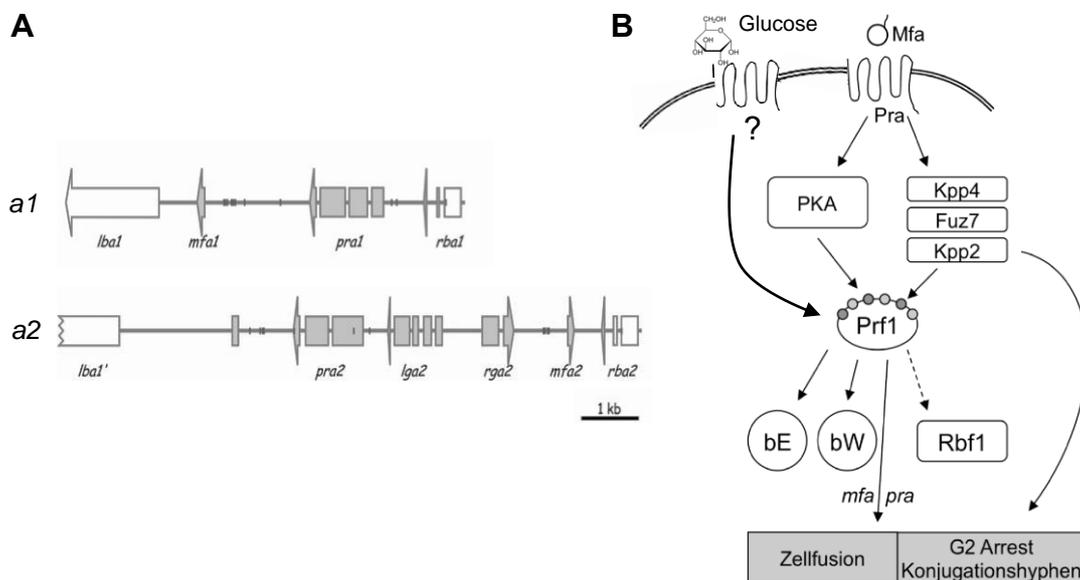


Abb. 1.2 Paarungskontrolle durch den a-Locus. (A) Schematische Darstellung der *a*-Loci. Der *a*-Locus kodiert für das Pheromon-Vorläuferprotein Mfa1 und den Pheromonrezeptor Pra1. Der *a*2-Locus kodiert zusätzlich für die Gene *rga2* und *lga2*. Modifiziert nach Schirawski *et al.*, 2005b. **(B)** Schematische Darstellung der Pheromonkaskade. Die Bindung des Pheromons an den Rezeptor löst Phosphorylierungs-vermittelte Signalkaskaden aus, die zur Bindung des Transkriptionsfaktors Prf1 an Pheromon-Response-Elemente seiner Zielgene führt und so weitere Schritte in der pathogenen Entwicklung induziert. Die Kinase Kpp2 induziert unabhängig von Prf1 einen G2-Zellzyklusarrest und die Bildung von Konjugationshyphen. Ein putativer, membranständiger Rezeptor implementiert ein exztrazelluläres Glucose-Signal in die transkriptionelle Regulation von *prf1*. Modifiziert nach Heimel, 2010.

1.3.2 Der *b*-Locus kodiert für den zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

Nach der erfolgreichen Fusion zweier Hyphen hängt die weitere pathogene Entwicklung von der Expression eines funktionellen *b*-Heterodimers ab. Die für die Untereinheiten kodierenden Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) sind im multiallelischen *b*-Locus kodiert, der in mindestens 19 verschiedenen Allelen vorliegt (Kämper *et al.*, 1995; J. Kämper, pers. Mitteilung). Beide Gene werden von einer gemeinsamen Promotor-Region aus divergent transkribiert und die resultierenden Proteine können nur miteinander interagieren, wenn sie aus unterschiedlichen Allelen stammen (Abb. 1.3; Kämper *et al.*, 1995).

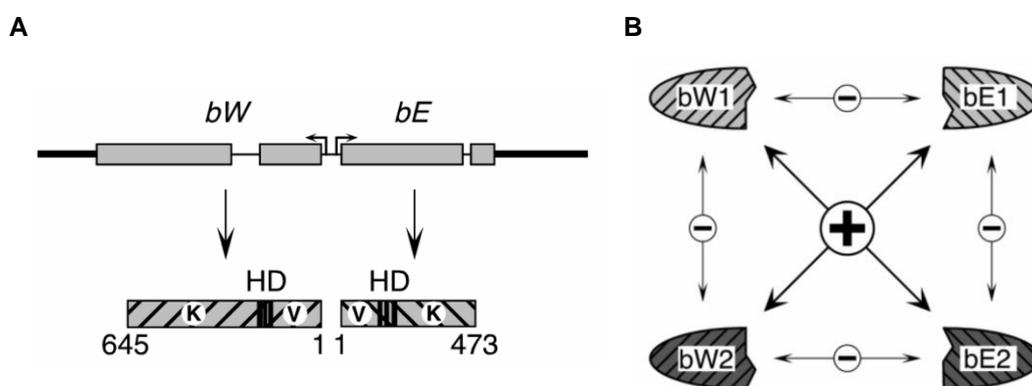


Abb. 1.3 Der *b*-Locus in *U. maydis*. (A) Schematische Darstellung des *b*-Locus und der darin kodierten Homeodomänen (HD)-Proteine bE und bW. V zeigt die variablen, K die konservierten Bereiche der Proteine an. (B) Allelspezifische Dimerisierung der bE/bW-Proteine. Die Untereinheiten des bE/bW-Transkriptionsfaktors können nur dimerisieren, wenn sie aus unterschiedlichen Allelen stammen. (Brachmann, 2001)

Obwohl die beiden Proteine nur eine geringe Sequenzhomologie aufweisen, zeichnen sie sich durch einen ähnlichen Aufbau mit einem jeweils zwischen den verschiedenen Allelen konservierten carboxy (C) -terminalen und einem variablen aminoterminalen Bereich aus. Während der C-terminale Bereich die für die DNA-Bindung essentielle Homeodomäne enthält, umfasst der aminoterminaler Teil die Interaktionsdomänen, welche die Grundlage für die Selbst/Nichtselbst-Erkennung darstellen (Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995; Schulz *et al.*, 1990). Ein kompatibles *b*-Heterodimer ist in der Lage über die Homeodomänen sequenzspezifisch DNA an sog. *b*-Bindestellen (*bbs*) zu binden und die Expression von Zielgenen zu induzieren (Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b; Romeis *et al.*, 2000). Die Expression des *b*-Heterodimers ist notwendig und ausreichend für den Wechsel vom saprophytischen, vegetativen Wachstum zum filamentösen Wachstum und der damit einhergehenden Arretierung des Zellzyklusarrest im G2-Stadium (Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b). Durch die Generierung haploider Stämme mit kompatiblen *b*-Loci

konnte außerdem gezeigt werden, dass ein funktionelles b-Heterodimer nicht nur notwendig sondern auch ausreichend für eine pathogene Entwicklung ohne vorherige Paarung ist (Bölker *et al.*, 1995). Dementsprechend wurde auch der standardmäßig für Infektionsexperimente genutzte solopathogene Stamm SG200 (*a1 mfa2 bE1/bW2*) generiert, der neben kompatiblen *b*-Genen auch kompatible Pheromon/Pheromonrezeptor-Gene exprimiert (Kämper *et al.*, 2006). Durch die Verwendung induzierbarer Promotoren konnten in Microarray-Studien 345 Gene identifiziert werden, die innerhalb von 12 Stunden nach Induktion kompatibler *bE* und *bW* Gene differenziell reguliert sind (Heimel *et al.*, 2010b). Die meisten der *b*-regulierten Gene weisen jedoch keine *bbs* auf, und es konnte gezeigt werden, dass die Regulation von etwa 90% der Zielgene vom C2H₂-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Rbf1 abhängig ist, der einen weiteren zentralen Regulator für die pathogene Entwicklung darstellt (Heimel *et al.*, 2010b).

1.4 Die Pflanze als Nährstofflieferant für phytopathogene Pilze

Eine der faszinierendsten Eigenschaften von Pflanzen ist die Gewinnung von Energie aus Licht durch Photosynthese und deren chemische Umsetzung und Bindung in Form von Kohlenstoffverbindungen. Die Akquisition der so produzierten Kohlenhydrate ist eines der wichtigsten Ziele von pflanzenpathogenen Mikroorganismen. Im Laufe der Evolution haben Mikroorganismen daher eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um parasitäre oder symbiontische Lebensweisen zu verwirklichen, die auf der Nährstoffzufuhr von Pflanzen basieren.

1.4.1 Voraussetzungen für eine erfolgreiche Infektion

Die Anpassung an spezielle Habitate erlaubt Mikroorganismen verschiedenste ökologische Nischen zu besetzen. Eine solche stellt auch das Wachstum innerhalb der Pflanze dar, das eine kontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen durch den Wirt voraussetzt. Phytopathogene Pilze unterscheiden sich von ihren nicht-pathogenen Verwandten durch die Fähigkeit, sich Zugang zu den Assimilaten des Wirts zu verschaffen. Eine Voraussetzung dafür ist die Umgehung pflanzlicher Abwehrmechanismen, die von mechanischen Barrieren wie der Kutikula oder verdickten Zellwänden bzw. Kallose-Einlagerungen an Infektionsstellen über den Einsatz chemischer Abwehrstoffe wie antimikrobielle Phytoalexine oder reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) bis hin zum lokal induzierten programmierten Zelltod, der sog. hypersensitiven Reaktion (hypersensitive response, HR) reichen. Diese Abwehrmechanismen können über zwei Zweige des pflanzlichen Immunsystems aktiviert werden. Der erste Zweig beruht auf der Erkennung von wiederkehrenden und unveränderlichen molekularen Mustern, sog. MAMPs oder PAMPs

(microbial/pathogen associated patterns), die charakteristisch für ganze Klassen von Mikroorganismen sind. MAMPs oder PAMPs sind in der Regel chemische Verbindungen, die als sog. Elizitoren eine Pflanzenreaktion auslösen können. Zu diesen Elizitoren, die meist durch membranständige Rezeptoren der Pflanzen detektiert werden, gehören z.B. das bakterielle Flagellin, Chitin als Baustein der Pilzzellwand, aber auch Abbauprodukte der pflanzlichen Zellwand, die beim Eindringen der Pathogene freigesetzt werden (Nurnberger und Lipka, 2005; Uma *et al.*, 2011). Um eine solche Früherkennung zu vermeiden haben pathogene Mikroorganismen Virulenzfaktoren entwickelt, die ihnen eine kompatible Interaktion mit ihren Wirtspflanzen ermöglichen (Abramovitch und Martin, 2004). In vielen Fällen stellen solche Virulenzfaktoren sekretierte Effektormoleküle dar, die pflanzliche Signalwege auf molekularer Ebene manipulieren (He *et al.*, 2006; Melotto *et al.*, 2006; Rooney *et al.*, 2005).

Effektormoleküle können jedoch gleichzeitig auch Elizitoren darstellen, wenn sie von resistenten Pflanzen erkannt werden, welche die entsprechenden, spezifischen Resistenzgene besitzen. Resistenzgene kodieren z.B. für Proteine, welche mit den Effektormolekülen interagieren und in der Folge den zweiten Zweig der Pflanzenabwehr aktivieren. Diese Resistenzgen-vermittelte Abwehr (auch Gen-für-Gen Resistenz genannt), ist daher spezifisch für eine jeweilige Interaktion von Pathogen und Pflanze. Diese Art der Erkennung führt in den meisten Fällen zur HR und einer erhöhten Expression von *PR* (pathogenesis-related) -Genen sowohl in infizierten als auch nicht-infizierten Geweben, was als systemisch erworbene Resistenz (systemic acquired resistance, SAR) bezeichnet wird (Abramovitch und Martin, 2004; Durrant und Dong, 2004; Gohre und Robatzek, 2008; Jones und Dangl, 2006). Eine erfolgreiche Infektion erfordert somit je nach Art der Interaktion eine spezifische Anpassung des Pathogens an den Wirt.

1.4.2 Infektionsstrategien phytopathogener Pilze

Der Lohn für die erfolgreiche Infektion ist der Zugang zu den Nährstoffen der Wirtspflanze. Dafür haben phytopathogene Pilze im Laufe der Zeit zwei grundlegende Strategien entwickelt. Nekrotrophe Pilze töten die Zellen ihres Wirts während der Infektion, um sich saprophytisch vom toten Gewebe zu ernähren. Dies erreichen sie unter dem Einsatz toxischer Moleküle und lytischer Enzyme, was unter anderem zu einer HR der Wirtszellen führt, die in diesem Fall jedoch gewollt ist. Eine gewisse Wirtsspezifität nekrotropher Pilze ergibt sich durch Toxine, die eine unterschiedliche Aktivität für eine oder mehrere Pflanzenarten aufweisen können (van Kan, 2006). Für Spezies der Gattung *Botrytis* wurde beispielsweise gezeigt, dass die HR in Lilien bzw. in *Arabidopsis thaliana* durch selektive Toxine des Pilzes gezielt induziert wird und sowohl nötig als auch förderlich für den Verlauf der Infektion ist (Govrin und Levine, 2000; Van Baarlen *et al.*, 2004).

Biotrophe Pilze sind dagegen auf lebendes, pflanzliches Gewebe angewiesen und müssen daher die Induktion einer HR vermeiden, um nicht den Zugang zu Nährstoffen und Wasser zu verlieren. Dies erfordert in vielen Fällen einen hohen Grad der Anpassung an die Wirtspflanze, da Abwehrmechanismen selektiv supprimiert werden müssen. Diese Anpassung geht mit einer hohen Wirtsspezifität und einem oft obligat biotrophen Lebensstil einher. Obligat Biotrophe wie die Rostpilze oder der Mehltau bilden spezialisierte Infektionsstrukturen innerhalb der Wirtszellen aus, die eine Interaktionszone mit der eingestülpten Plasmamembran der Wirtszelle bilden. Die Hauptaufgabe der sog. Haustorien besteht darin, Nährstoffe von der Pflanze aufzunehmen (Panstruga, 2003). In ähnlicher Weise bilden die symbiontisch lebenden Mykorrhizapilze sog. Arbuskel aus. Diese bäumchenartigen Strukturen bilden sich in einzelnen Pflanzenzellen, wobei die pflanzliche Plasmamembran intakt bleibt. So wird eine enorme Vergrößerung der Interaktionsfläche zwischen Pilz und Pflanze erreicht, über die der Nährstoffaustausch effizient stattfinden kann. Dabei erhalten Mykorrhizapilze Kohlenhydrate von der Pflanze und stellen im Gegenzug phosphat- und stickstoffhaltige Verbindungen zur Verfügung (zusammengefasst in Parniske, 2008). Bei biotrophen Interaktionen wird die Pflanze während der gesamten pilzlichen Entwicklung am Leben erhalten.

Pilze, die eine Mischung aus den beiden zuvor genannten Strategien verfolgen, werden hemibiotroph genannt. Diese erhalten das pflanzliche Gewebe in den initialen Stadien der Infektion am Leben und wechseln erst später zu einem nekrotrophen Lebensstil, bei dem die pflanzlichen Zellen abgetötet werden. Die Signale, die zum Wechsel in die nekrotrophe Phase führen sind bisher jedoch nicht bekannt (Horbach *et al.*, 2011).

1.4.3 Vorkommen und Verteilung von Kohlenhydraten in Pflanzen und ihre Verfügbarkeit für Pathogene

Die Photosynthese findet in den photosynthetisch aktiven Blättern, sog. „Source“-Gewebe statt. Von dort werden die Photoassimilate über das Phloem zu photosynthetisch inaktiven „Sink“-Gewebe wie Wurzeln, Blüten oder jungen, noch heterotrophen Blättern transportiert. Die Photosynthese findet in Mesophyll- und Bündelscheidezellen statt, wo sich die fixierten Kohlenstoffe hauptsächlich in Form von Saccharose ansammeln und für den Langstreckentransport in das Phloem gelangen müssen.

Bei der Beladung des aus Parenchym, Siebröhren- und Geleitzellen bestehenden Phloems wird zwischen zwei Konzepten unterschieden: dem symplastischen und dem apoplastischen Weg. Als symplastische Beladung wird die Diffusion der Photoassimilate entlang eines Konzentrationsgradienten über die Plasmodesmata bis in die Siebröhren bezeichnet (Abb. 1.4 (2)). Die apoplastische Phloembeladung dagegen beinhaltet den Transport der Kohlenstoffe über Membranen hinweg (zusammengefasst in Turgeon, 2006; Vanbel, 1993).

Bei der apoplastischen Phloembeladung diffundiert Saccharose von den Mesophyll- und Bündelscheidenzellen über Plasmodesmata bis zu den Phloemparenchymzellen. Von dort erfolgt der Export in den Apoplast (Abb. 1.4 (1)), wo durchschnittliche Saccharose-Konzentrationen von 2 – 7 mM gemessen wurden (Livingston und Henson, 1998; Lohaus *et al.*, 2000). Es werden jedoch noch deutlich höhere apoplastische Saccharose-Konzentrationen in der unmittelbaren Nähe von Leitbündeln vermutet (Lalonde *et al.*, 2003). Die Phloembeladung in Mais wie auch in den meisten Gräsern erfolgt wahrscheinlich über den apoplastischen Weg. Dies legen elektronenmikroskopische Aufnahmen nahe, denen zufolge der Siebröhren-Geleitzellen-Komplex vom Symplast weitestgehend isoliert ist (Evert *et al.*, 1978).

Obwohl die Transportwege von Saccharose in Pflanzen gut untersucht sind, konnte ein für den Export in den Apoplast zuständiger Transporter erst kürzlich identifiziert werden (Chen *et al.*, 2012). Er gehört zu einer neuen Familie von Effluxtransportern, den SWEET-Proteinen, die neben Saccharose auch Glucose entlang eines Konzentrationsgradienten aus Zellen heraus transportieren können. Interessanterweise wird die Expression der SWEET Transporter von verschiedenen bakteriellen und pilzlichen Pathogenen induziert, was ganz offensichtlich einen besseren Zugang zu den Kohlenhydratvorkommen der Wirtspflanze zum Ziel hat (Chen *et al.*, 2010). So war beispielsweise schon seit längerer Zeit bekannt, dass das rezessive Allel *xa13* in Reis, welches eine Mutation im Promotorbereich trägt, eine vollständige Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* verleiht. Die Mutation verhindert die Bindung eines sekretierten Effektors an den Promotor, was eine reduzierte Induktion des Gens während der pathogenen Interaktion zur Folge hat (Chu *et al.*, 2006b; Yuan *et al.*, 2009). Die molekulare Funktion des in *Xa13* kodierten Proteins als Saccharose-Effluxtransporter der SWEET-Familie konnte jedoch erst kürzlich aufgeklärt werden (Chen *et al.*, 2012). Da die Mutation im Promotor zu einer inkompatiblen Interaktion führt, ist der SWEET-vermittelte Saccharose-Transport in diesem Fall essentiell für die pathogene Interaktion.

Nach dem Export aus der Zelle wird Saccharose vom Apoplast aus aktiv gegen einen Konzentrationsgradient in Siebröhren- und Geleitzellen importiert. Die dafür verantwortlichen Transporter sind im Phloem exprimierte, energieabhängige H⁺/Saccharose-Symporter und gehören zur SUT (SUCrose T_ransporter)-Familie (Abb. 1.4 (3)). Vertreter der SUTs wurden in verschiedenen Pflanzen identifiziert, und ihre Rolle bei der Phloembeladung ist gut charakterisiert (Burkle *et al.*, 1998; Knop *et al.*, 2004; Slewinski *et al.*, 2009; Stadler *et al.*, 1995; Stadler und Sauer, 1996). Angetrieben durch die entstehende Akkumulation von Saccharose wird der Phloemsaft zu den Verbrauchs-Geweben transportiert, wo die Assimilate aus den Leitbündeln entladen werden. Der Export von Saccharose wird dabei wahrscheinlich von Transportern der SWEET-Familie und einer Untergruppe der SUT-

Familie vermittelt (Abb. 1.4 (4) & (6); zusammengefasst in Doidy *et al.*, 2012; Lalonde *et al.*, 2003).

Im Apoplast hydrolysieren zellwandständige Invertasen Saccharose zu Glucose und Fructose, die durch Hexosetransporter in die Zellen der Sink-Gewebe aufgenommen wird. Durch ihre Rolle bei der Versorgung mit Kohlenhydraten sind Invertasen essentiell für energieintensive Prozesse wie beispielsweise die Pollenentwicklung in Tabak (Goetz *et al.*, 2001). Steigende Hexosekonzentrationen führen zur Induktion Sink-spezifischer Gene, zur Reprimierung von Photosynthese-Genen und bestimmen mit welcher Stärke ein Sink-Gewebe Saccharose anziehen kann. So konnte in Karotten durch Gegenstrang-Suppression gezeigt werden, dass zellwandständige Invertasen die Verteilung von Kohlenhydraten beeinflussen was sich wiederum auf die Differenzierung von Sink-Geweben auswirkt (Tang *et al.*, 1999). Invertasen spielen daher eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Sink- und Source-Geweben (Roitsch, 1999; Roitsch und Gonzalez, 2004; Rolland *et al.*, 2006a). Auch der Befall mit Pathogenen kann zu einer Induktion von extrazellulären Invertasen führen (Berger *et al.*, 2004; Fotopoulos *et al.*, 2003; Herbers *et al.*, 2000; Sturm und Chrispeels, 1990). Es wird angenommen, dass die Induktion eine Antwort auf den durch Abwehrreaktionen erhöhten Energiebedarfs ist (Roitsch und Gonzalez, 2004). Parallel wird eine Rolle der durch die Invertaseaktivität freigesetzten Monosaccharide als Signalmoleküle für die Induktion von Abwehrreaktionen diskutiert (Roitsch *et al.*, 2003). Da extrazelluläre Invertasen selbst durch Zucker induziert werden, führt ihre Aktivität zu einem selbst-amplifizierenden Mechanismus (Roitsch *et al.*, 1995). Die dadurch steigenden Hexosekonzentrationen wiederum führen zu einem verstärkten Zufluss von Assimilaten und zur Reprimierung von Photosynthesegenen (Roitsch, 1999; Scholes *et al.*, 1994). So führt ein Pathogenbefall in vielen Fällen zur lokalen Bildung eines künstlichen Sink-Gewebes, das mit den natürlichen Sink-Geweben konkurriert und durch den Zufluss von Kohlenhydraten eine vorteilhafte Umgebung für Pathogene darstellt (Biemelt und Sonnewald, 2006; Chou *et al.*, 2000; Doehlemann *et al.*, 2008; Horst *et al.*, 2010b; Huckelhoven, 2005; Panstruga, 2003; Voegelé *et al.*, 2006).

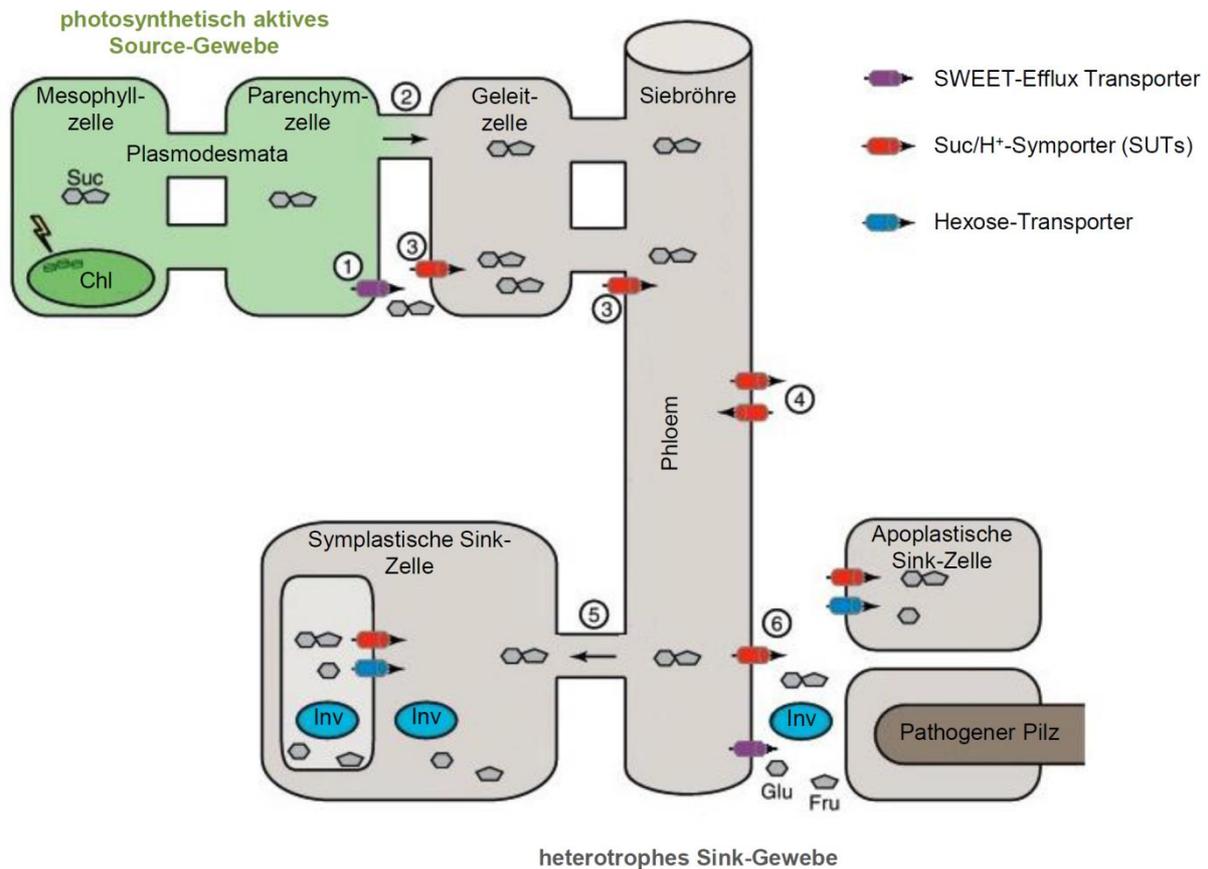


Abb. 1.4 Kohlenhydrat-Transport von Source- zu Sink-Geweben. Durch Photosynthese wird in den Chloroplasten (Chl) von Source-Geweben Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt und in Form von Saccharose zu den Sink-Geweben transportiert. Diese diffundiert zunächst bis zu den Parenchym-Zellen, von wo sie entweder passiv über Plasmodesmata (2) oder aktiv über den apoplastischen Weg in die Geleitzellen der Siebröhren geladen wird. Der apoplastische Weg läuft über den Export aus den Parenchym-Zellen durch SWEET-Effluxtransporter und den Import in die Geleitzellen durch Saccharose-Transporter (SUT). In den Siebröhren wird Saccharose durch den Phloemfluss transportiert, wobei sie in angrenzenden Geweben (4) oder Sink-Geweben (6) durch SUTs oder SWEET-Transporter in den Apoplast entladen wird oder in symplastisch verbundene Zellen diffundiert (5). Nach der Entladung aus dem Phloem wird Saccharose entweder in apoplastisch verbundene Sink-Zellen durch SUTs aufgenommen oder durch Invertasen (Inv) zu Glucose (Glu) und Fructose (Fru) hydrolysiert, welche anschließend durch Hexosetransporter aufgenommen wird. Der Transport der Kohlenhydrate kann auch zu künstlichen Sink-Geweben erfolgen, die durch einen Befall mit einem pathogenen Pilz entstehen. Modifiziert nach Doidy *et al.*, 2012.

1.5 Kohlenhydrat-Aufnahmemechanismen phytopathogener Pilze

Von phytopathogenen Pilzen wird im Allgemeinen angenommen, dass sie Kohlenhydrate in Form von Hexosen aufnehmen. Dies basiert auf Beobachtungen, nach denen neben pflanzlichen auch sekretierte pilzliche Invertasen im Verlauf einer Infektion induziert sind (Chou *et al.*, 2000; Fotopoulos *et al.*, 2003; Heisteruber *et al.*, 1994). Dieser Vermutung entsprechend, wurden in dem Rostpilz *Uromyces fabae* ein während der Interaktion mit *Vicia faba* spezifisch in Haustorien exprimierter Hexosetransporter (Hxt1p) und eine ebenfalls in Haustorien exprimierte sekretierte Invertase (Inv1p) identifiziert (Voegele *et al.*, 2001; Voegele *et al.*, 2006). In funktionellen Analysen wurde UfHxt1p als Glucose/Fructose-Transporter klassifiziert, was eine gemeinsame Funktion mit UfInv1p bei der Aufnahme von Kohlenhydraten nahelegt (Voegele *et al.*, 2006). Da in dem obligat biotrophen *U. fabae* keine genetischen Manipulationen möglich sind, konnte die Signifikanz der beiden Proteine für die pathogene Entwicklung jedoch nicht weiter untersucht werden. Auch in Mykorrhizapilzen wurden bereits einige Zuckertransporter gefunden und in heterologen Systemen charakterisiert. So transportiert der Monosaccharid-Transporter MST1 aus *Geosiphon pyriformis* neben Glucose als Primärsubstrat, mit in dieser Reihenfolge abnehmender Effizienz, auch die Hexosen Mannose, Galactose und Fructose (Schussler *et al.*, 2006). In *Tuber borchii* konnte der hochaffine Hexosetransporter TbHXT1 identifiziert werden, der eine starke Präferenz für Glucose gegenüber Fructose zeigt und auch Mannose transportiert (Polidori *et al.*, 2007). Ein direkter Zusammenhang der Transporter mit der Aufnahme von Zuckern innerhalb der Pflanze und deren Einfluss auf die biotrophe Entwicklung konnte jedoch nicht hergestellt werden. In *Glomus intraradices* wurde durch Expressionsanalysen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Transporter MST2 identifiziert, der während der symbiotischen Phase in Arbuskeln und interzellulären Hyphen exprimiert ist (Helber *et al.*, 2011). Bei funktionellen Analysen in Hefe wurde eine hohe Affinität von MST2 für Glucose festgestellt. Der Glucose-Transport konnte durch Zugabe der Monosaccharide Xylose, Mannose und Galactose reduziert werden, die typischerweise als Bausteine der pflanzlichen Zellwand vorkommen. Durch eine über den Wirt vermittelte RNA-Interferenz konnte die Expression von *MST2* signifikant reduziert werden. Dies hatte eine gestörte Arbuskel-Entwicklung zur Folge und zeigt so eine Relevanz des MST2-vermittelten Transports für die arbuskuläre Mykorrhizasymbiose (Helber *et al.*, 2011).

Die Aufnahme von Hexosen scheint auch bei Nekrotrophen und Hemibiotrophen die bevorzugte Strategie zu sein. So wird angenommen, dass während der nekrotrophen Interaktion von *Sclerotinia sclerotiorum* mit der Sonnenblume Saccharose zunächst durch eine sekretierte pilzliche Invertase hydrolysiert wird, und die daraus resultierenden Spaltprodukte als Substrate für zwei während der Interaktion induzierten Hexosetransporter dienen (Jobic *et al.*, 2007). In dem hemibiotrophen Maispathogen *Colletotrichum graminicola*

wurden die Hexosetransporter CgHXT1 bis CgHXT5 kloniert und charakterisiert. Mit Ausnahme von CgHXT4 fungieren die kodierten Proteine als hoch (CgHXT1 und CgHXT3) mittel (CgHXT2) bzw. niedrig affine (CgHXT5) Glucosetransporter mit unterschiedlichen weiteren Substratspezifitäten. Interessanterweise sind die hoch affinen Transporter vornehmlich während der biotrophen Infektionsphase und der niedrig affine Transporter CgHXT5 ausschließlich während der nekrotrophen Phase exprimiert. Dies passt zu der Annahme, nach der Pathogene während des biotrophen Wachstums durch den Einsatz hoch affiner Transportsysteme mit pflanzlichen Aufnahmesystemen um apoplastische Kohlenhydrate konkurrieren, wohingegen die in der nekrotrophen Phase abundanten Kohlenhydrate durch niedrig affine Transporter mit hohem Durchsatz aufgenommen werden (Lingner *et al.*, 2011).

1.6 Zuckertransporter in *Ustilago maydis*

Das Genom von *U. maydis* enthält 20 Gene, die für putative Zuckertransporter kodieren. Durch die systematische Deletion dieser Gene konnten zwei Transporter identifiziert werden, die relevant für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* sind (Wahl, 2009).

Mit UmSrt1 konnte der erste pilzliche Transporter identifiziert werden, der spezifisch die direkte Aufnahme von Saccharose ohne vorherige Hydrolyse vermittelt (Wahl *et al.*, 2010a). *srt1* ist ausschließlich während der biotrophen Phase exprimiert und die Deletion führt zu einer drastisch reduzierten Virulenz, was die Bedeutung der direkten Aufnahme von Saccharose aus dem Apoplast für die Interaktion hervorhebt. Durch seine extrem hohe Affinität für Saccharose stellt Srt1 ein perfektes Instrument dar, um mit pflanzlichen Saccharose-Transportern zu konkurrieren. Zudem wird diskutiert, dass durch die Aufnahme von Saccharose eine extrazelluläre Hydrolyse durch sekretierte pilzliche Invertasen und die damit verbundene Entstehung von Monosacchariden vermieden wird, da diese potentielle Signalmoleküle für einen Pathogenbefall darstellen (Wahl *et al.*, 2010a).

Neben Srt1 ist Hxt1 der zweite pathogenitätsrelevante Zuckertransporter in *U. maydis*. Bioinformatischen Analysen zufolge kodiert das *hxt1*-Gen für ein Protein mit zwölf Transmembrandomänen, das wie die meisten bekannten membranständigen Transporter zu der Major-Facilitator-Superfamily gehört. Zur funktionellen Analyse wurde *hxt1* heterolog im Hefestamm EBY.VW4000 exprimiert, in dem alle endogenen Hexosetransporter deletiert sind (Wieczorke *et al.*, 1999). Dies führte zu einem deutlich verbesserten Wachstum des Stamms auf Medien mit Glucose, Fructose, Mannose und Galactose, was indikativ für eine Hxt1-vermittelte Hexoseaufnahme ist (Wahl, 2009). Durch weitere Aufnahmemessungen wurde Hxt1 als protonenabhängiger, hochaffiner Glucose-Transporter ($k_M = 6,6 \mu\text{M}$) mit einem pH-Optimum von 5-6 charakterisiert. Die Aufnahme von radioaktiver Glucose konnte

in Wettbewerbsanalysen bei Zugabe eines 100-fachen molaren Überschusses nicht-radioaktiven Zuckers durch Fructose, Mannose und in einem geringeren Umfang auch durch die Pentose Xylose, nicht aber durch Galactose oder Arabinose gehemmt werden (Wahl, 2009; Wippel, 2011).

Die Deletion von *hxt1* führt zu einer reduzierten Pathogenität. Im Vergleich zur Deletion von *srt1* ist die Virulenz jedoch weniger stark beeinträchtigt. Die Doppeldeletion von *hxt1* und *srt1* hat einen additiven Effekt (Abb. 1.5; Wahl, 2009). Demnach ist neben der Aufnahme von Saccharose auch die Aufnahme von Hexosen für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* von Bedeutung.

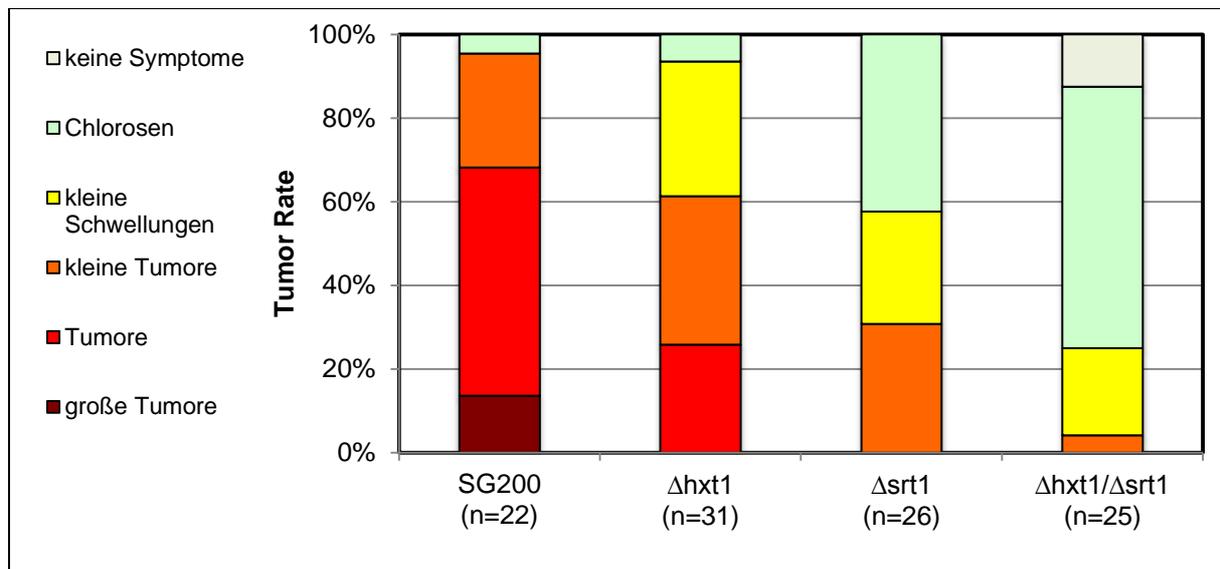


Abb. 1.5 Pathogenität von *U. maydis* *hxt1*- und *srt1*-Deletionsstämmen und dem entsprechenden Doppeldeletionsstamm. Gezeigt ist jeweils der Anteil an Pflanzen mit den durch die verschiedenen Farben angegebenen Symptomen sieben Tage nach der Infektion der angegebenen Stämme (modifiziert nach Wahl, 2009).

Im Gegensatz zu *srt1* ist *hxt1* sowohl in der biotrophen als auch in der saprophytischen Phase konstitutiv und stark exprimiert und die Expression unterliegt bei verschiedenen exogenen Zuckerquellen in axenischer Kultur nur geringen Schwankungen. Stämme, in denen *hxt1* deletiert ist zeigen in axenischer Kultur ein vermindertes Wachstum auf Medien mit Glucose, Fructose und Saccharose als einziger Kohlenstoff (C)-Quelle. Interessanterweise ist das Wachstum von *hxt1*-Deletionsstämmen auf Medien mit Xylose oder Galactose im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (WT)-Stamm verbessert, was zu der Vermutung führte, dass Hxt1 neben der Transportfunktion eine zusätzliche Funktion als Sensor besitzt (Wahl, 2009). Diese Vermutung wird verstärkt durch Vergleiche der Proteinsequenz von Hxt1 mit der Bäckerhefe, die für die Verwertung von Kohlenhydraten der am besten untersuchte Modellorganismus ist. Dabei zeigt sich, dass die beiden Hxt1-

ähnlichsten Proteine in Hefe die Glucose-Sensoren Rgt2p und Snf3p sind (41% bzw. 38% Identität, $E=3,3e^{-107}$ bzw. $E=3,3e^{-97}$).

Durch den Vergleich der Genexpression bei Wachstum in Glucose- und Xylose-haltigem Medium wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Antwort auf den Wechsel der Kohlenstoffquelle im *hxt1*-Deletionsstamm deutlich reduziert ist, was wiederum auf eine mögliche Funktion von *hxt1* bei der Katabolit-Repression zurückgeführt werden kann (Wahl, 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 80% der Gene, die unabhängig von der Kohlenstoffquelle und somit allein *hxt1*-abhängig dereguliert waren, im WT auf der Pflanzenoberfläche in gleicher Weise induziert bzw. reprimiert sind. Diese Gene kodieren u.a. für den Transkriptionsfaktor Prf1 und ein Con7-Homolog, welches in *Magnaporthe oryzae* bei der Initiation der pathogenen Entwicklung eine Rolle spielt. Es wurde daher zusätzlich ein Einfluss von Hxt1 auf die Regulation von paarungs- und pathogenitätsrelevanten Genen postuliert (Wahl, 2009).

1.7 Zuckerabhängige Regulationsmechanismen in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Energiegewinnung aus Kohlenhydraten ist für alle Lebewesen essentiell und es haben sich komplexe Mechanismen für eine optimale Nutzung von Kohlenhydraten entwickelt. Die meisten Stoffwechselwege münden in der Umwandlung von kohlenstoffhaltigen Verbindungen in Glucose-6-Phosphat (Gluc-6-P), welches in die Glykolyse eingeschleust und zu Pyruvat umgewandelt wird. Aus diesem wird weitere Energie gewonnen, was unter aeroben Bedingungen über den Citratzyklus bzw. unter anaeroben Bedingungen über Fermentation erfolgt. Die Anpassung von Stoffwechselvorgängen als Antwort auf die zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquellen ist am besten in *S. cerevisiae* untersucht.

1.7.1 Die Glucose-abhängige Induktion der *HXT*-Gene

Glucose ist die mit Abstand am stärksten präferierte Kohlenstoffquelle der Bäckerhefe. Bei der Energiegewinnung aus Glucose bevorzugt *S. cerevisiae* jedoch auch in Anwesenheit von Sauerstoff den Weg der Fermentation (Lagunas, 1979; Lagunas, 1986). Bedingt durch den geringen Gewinn von ATP bei der Fermentation ist die Bäckerhefe darauf spezialisiert, Glucose möglichst effizient aufzunehmen und über die Glycolyse zu verstoffwechseln. Für die Zuckeraufnahme stehen *S. cerevisiae* 18 Hexosetransporter zur Verfügung, von denen mindestens sechs als Glucose-Transporter fungieren. Diese werden in Abhängigkeit ihrer Transporteigenschaften und der Verfügbarkeit von Glucose durch den Repressor Rgt1p transkriptionell reguliert (Ozcan und Johnston, 1999; Wieczorke *et al.*, 1999). Die extrazellulären Glucose-Konzentrationen werden dabei von den membranständigen Glucose-Sensoren Snf3p und Rgt2p wahrgenommen, wobei Snf3p niedrige und Rgt2p hohe Glucose-Konzentrationen perzipiert (Ozcan *et al.*, 1998; Ozcan *et al.*, 1996). Beide weisen hohe Ähnlichkeit zu Hexosetransportern auf, unterscheiden sich von diesen jedoch durch das Fehlen einer Transportfunktion. Beide Proteine haben im Vergleich zu anderen Hexosetransportern eine zusätzliche C-terminale, zytoplasmatisch lokalisierte Domäne, die in die Signalweiterleitung involviert, aber dafür nicht essentiell ist (Moriya und Johnston, 2004). Die Bindung von Glucose an Rgt2p oder Snf3p führt zu einer Konformationsänderung, wodurch die Rgt2p/Snf3p-assoziierten, membranständigen Casein-Kinasen Yck1p und Yck2p aktiviert werden. Dies führt zur Phosphorylierung der Proteine Mth1p und Std1p, die mit der zytoplasmatischen Verlängerung von Snf3p/Rgt2p interagieren (Moriya und Johnston, 2004; Schmidt *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung hat eine Ubiquitinierung von Mth1p bzw. Std1p durch den SCFGrr1-Komplex und ihre anschließende Degradierung über das Proteasom zur Folge (Spielewoy *et al.*, 2004). In Abwesenheit von Glucose stellen Mth1p und Std1p Co-Repressoren dar, die mit dem Repressor Rgt1p

interagieren und so dessen DNA-Bindung und wahrscheinlich dessen Spezifität u.a. für die Promotoren der *HXT*-Gene vermitteln (siehe Abb. 1.6; Lakshmanan *et al.*, 2003; zusammengefasst in Gancedo, 2008; Johnston und Kim, 2005; Zaman *et al.*, 2008).

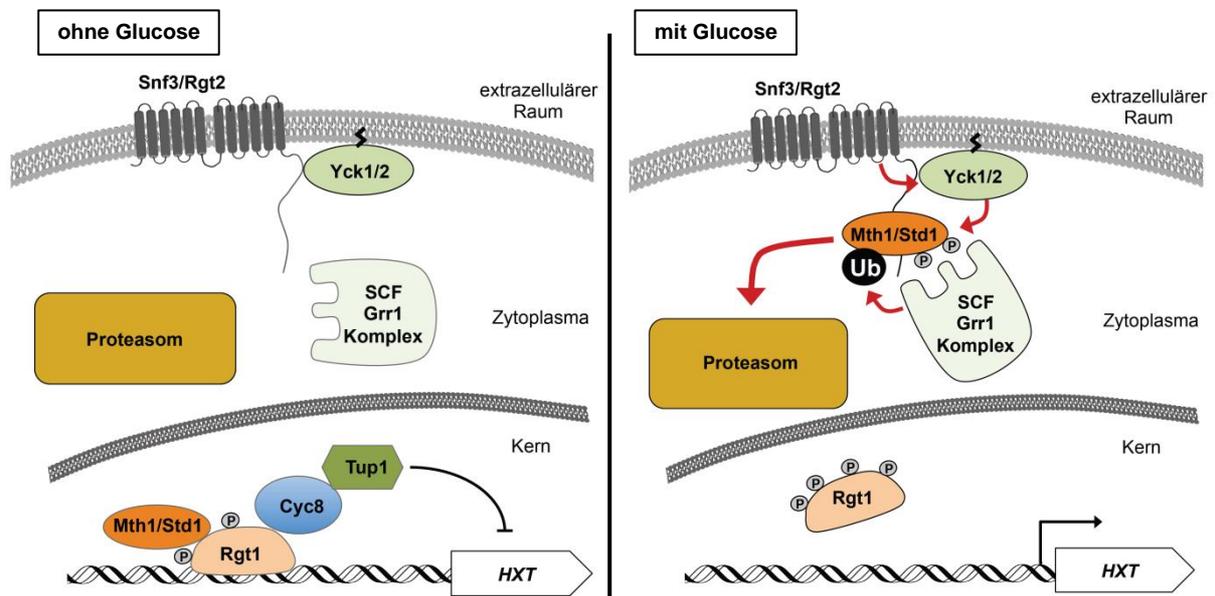


Abb. 1.6 Der Snf3p/Rgt2p-vermittelte Glucose-Signalweg in *S. cerevisiae*. Die Glucose-Sensoren Snf3p und Rgt2p regulieren die Expression von Hexosetransporter-Genen über den transkriptionellen Repressor Rgt1p in Abhängigkeit der extrazellulären Glucose-Konzentration (modifiziert nach Gancedo, 2008).

Neben dem Snf3p/Rgt2p-Signalweg führt auch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels und die damit verbundene Aktivierung der Protein Kinase A (PKA) zur Phosphorylierung von Rgt1p. Dieser Weg wird durch den G-Protein-assoziierten Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor Gpr1p ausgelöst. Bindet Glucose oder auch Saccharose an den Rezeptor, interagiert dieser mit der G_{α} -Untereinheit Gpa2p, welche daraufhin in die GTP-gebundene Form übergeht und die Adenylatzyklase Cyr1p aktiviert. Der dadurch ausgelöste Anstieg des cAMP-Spiegels führt wiederum zur Aktivierung der PKA, die u.a. den Repressor Rgt1p phosphoryliert (Gancedo, 2008).

1.7.2 Die Glucose-Repression

Die Expression von Genen für alternative Stoffwechselwege wird in Anwesenheit von Glucose reprimiert. Die sog. Glucose-Repression wird hauptsächlich durch den Repressor Mig1p vermittelt, der beispielsweise die Expression der Invertase *SUC2* oder des Regulators für den Galactose-Stoffwechsels *GAL4* reprimiert (Klein *et al.*, 1998). Die Mig1p-vermittelte Repression wird über dessen Phosphorylierungsstatus durch die Kinase Snf1p reguliert. In

Abwesenheit von Glucose wird Mig1p durch Snf1p phosphoryliert, was zu einer Translokation von Mig1p aus dem Kern in das Zytoplasma und so zu einer Induktion von Glucose-reprimierten Genen führt (De Vit *et al.*, 1997). Eine zusätzliche Regulation übt die Hexokinase 2 (Hxk2p) aus, indem sie bei Anwesenheit von Glucose mit Mig1p interagiert und wahrscheinlich so dessen Phosphorylierung durch Snf1p verhindert. (siehe Abb. 1.7; zusammengefasst in Gancedo, 2008; Zaman *et al.*, 2008). Somit besitzt Hxk2p neben ihrer enzymatischen Funktion beim Glucose-Metabolismus auch eine Funktion als zytoplasmatischer Glucose-Sensor.

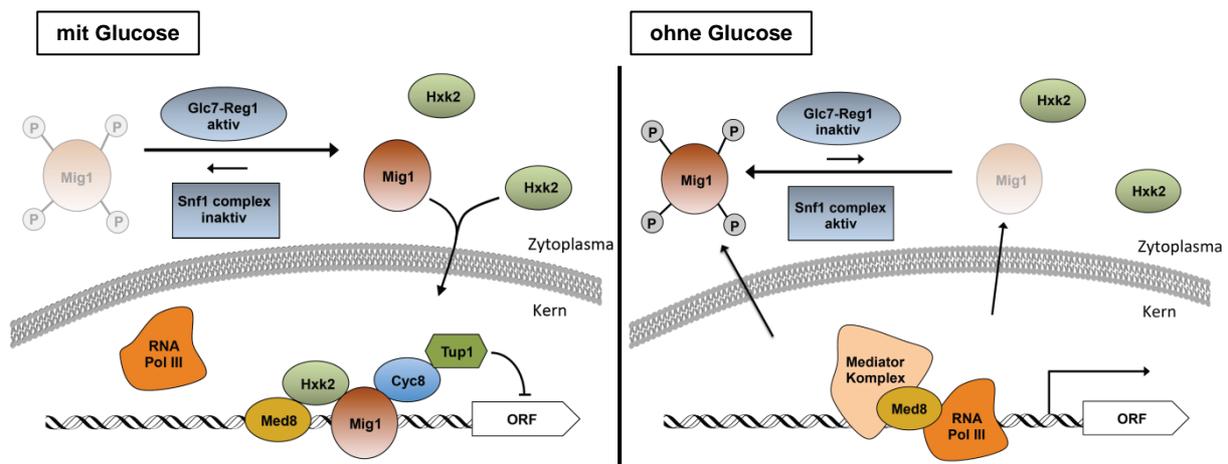


Abb. 1.7 Modell für die Regulation der Mig1p-vermittelten Glucose-Repression durch Hxk2p und Snf1p. In Anwesenheit von Glucose interagiert Hxk2p mit dem Transkriptionsfaktor Mig1p und schützt ihn so vor Phosphorylierung. Dies führt zur Reprimierung von Genen für alternative Stoffwechselwege durch den Mig1p-Cyc8p-Tup1p-Komplex. Durch die Bindung an Med8p, eine Untereinheit des Mediator-Komplexes, verhindert Hxk2p zudem möglicherweise die Rekrutierung der RNA Polymerase II (RNA Pol II). Bei Abwesenheit von Glucose löst sich Hxk2p von Mig1p und der Snf1p-Komplex wird aktiviert. Dieser phosphoryliert Mig1p, das in der Folge aus dem Kern in das Zytoplasma transloziert und eine Rekrutierung der RNA Pol II durch den Mediator-Komplex ermöglicht. (nach Gancedo, 2008).

1.7.3 Die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen

Das wohl bekannteste Zielgen der Glucose Repression in *S. cerevisiae* ist *SUC2*. *SUC2* kodiert für eine sekretierte Invertase, die durch die extrazelluläre Hydrolyse von Saccharose die Aufnahme von Glucose bzw. Fructose durch Hexosetransporter ermöglicht. Die Expression von *SUC2* wird in Anwesenheit von Glucose durch die Bindung von Mig1p an den *SUC2*-Promotor reprimiert. Bei niedrigen Glucose-Konzentrationen wird die *SUC2*-Expression Snf1p-abhängig de-reprimiert, was bis zu einer 100-fachen Induktion von *SUC2* und in der Folge zur Nutzung von Saccharose als Energiequelle führt (Klein *et al.*, 1998; Trumbly, 1992).

Auch Galactose gehört zu den Kohlenstoffquellen, die von *S. cerevisiae* nur in Abwesenheit von Glucose zur Energiegewinnung genutzt werden. Die *Gal*-Gene sind ebenfalls Ziel der Mig1p-vermittelten Glucose-Repression und kodieren für die Enzyme des hochkonservierten Leloir-Wegs, über den Galactose in Glucose-1-Phosphat (Gluc-1-P) umgewandelt wird. Dabei wird Galactose im ersten Schritt durch die Galactokinase Gal1 zu Galactose-1-Phosphat (Gal-1-P) phosphoryliert. Gal-1-P wird durch die Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase Gal7 in einer gekoppelten Reaktion mit UDP-Glucose zu UDP-Galactose und Gluc-1-P umgesetzt. Durch die Aktivität der UDP-Glucose-4-Epimerase Gal10 wird UDP-Galactose zu UDP-Glucose umgewandelt, was wiederum als Substrat für die durch Gal7 katalysierte gekoppelte Reaktion mit Gal-1-P dient. So entsteht am Ende des Leloir-Wegs Gluc-1-P, das durch die Phosphoglucomutase zu Gluc-6-P isomerisiert wird (Abb. 1.8 A).

Die Induktion der *GAL*-Gene in Hefe stellt eines der am besten untersuchten Beispiele für transkriptionelle Regulation in Eukaryoten dar. Die Aktivierung der *GAL*-Gene wird durch den Zn(II)₂Cys₆-Transkriptionsfaktor Gal4p vermittelt, der in Abwesenheit von Glucose exprimiert ist und an die Promotoren der *GAL*-Gene bindet (Griggs und Johnston, 1991). In diesem Zustand wird die Aktivität von Gal4p durch die Interaktion mit dem Co-Repressor Gal80p inhibiert. Bei Anwesenheit von Galactose interagiert der Co-Aktivator Gal3p mit Gal80p, wodurch die Inhibition von Gal4p durch Gal80p aufgehoben wird und die *GAL*-Gene in der Folge transkribiert werden (Abb. 1.8 B; (Platt und Reece, 1998). Die Interaktion von Gal3p und Gal80p setzt die Bindung von ATP und Galactose an Gal3p voraus, welches eine hohe Homologie mit der Galactokinase Gal1p aufweist, selbst aber keine Kinaseaktivität besitzt. Der Verlust von Gal3p kann durch eine Überexpression von *GAL1* komplementiert werden, was zeigt, dass Gal1p eine, wenn auch geringere, regulatorische Funktion besitzt (Bhat und Hopper, 1992).

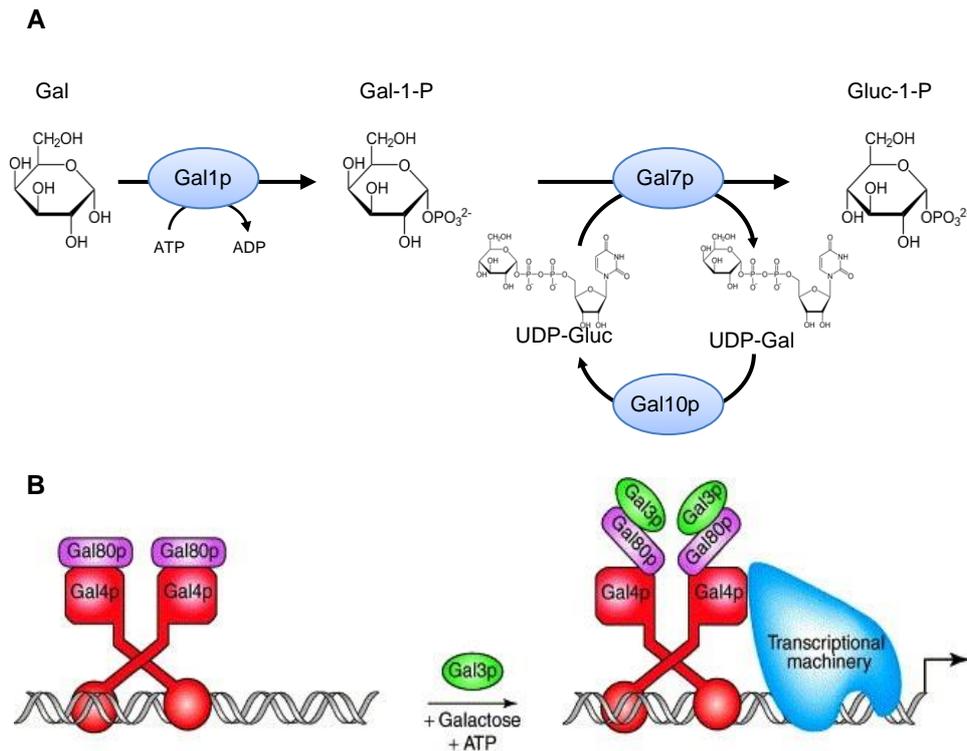


Abb. 1.8 Galactose-Verwertung in *S. cerevisiae*. (A) Umwandlung von Galactose (Gal) zu Glucose-1-Phosphat (Gluc-1-P) über den hochkonservierten Leloir-Weg durch die Enzyme Gal1p, Gal7p und Gal10p. (B) Aktivierung der *GAL*-Gene. Bei Anwesenheit von Galactose bindet diese zusammen mit ATP an den Co-Aktivator Gal3p, was eine Interaktion von Gal3p mit dem Repressor Gal80p zur Folge hat. Dadurch wird die Reprimierung des Transkriptionsfaktors Gal4p durch Gal80p aufgehoben und die Transkriptions-Maschinerie zu den Promotoren der *GAL*-Gene rekrutiert (aus Sellick und Reece, 2005).

1.8 Zielsetzung

Die Akquisition von Kohlenhydraten ist einer der wichtigsten Aspekte von Wirts/Pathogen-Interaktionen. Trotz ihrer Bedeutsamkeit für den Erfolg der Interaktion ist über die Aufnahmemechanismen von Kohlenhydraten in phytopathogenen Pilzen erst relativ wenig bekannt. *Ustilago maydis* stellt einen Modellorganismus für phytopathogene Pilze mit biotrophem Lebensstil dar, der leicht zu handhaben und sehr zugänglich für molekularbiologische Methoden ist. In *U. maydis* sind der Hexosetransporter Hxt1 und der Saccharose-Transporter Srt1 die einzigen, bisher bekannten pathogenitätsrelevanten Zuckertransporter. Während der rein pflanzenspezifisch exprimierte Transporter Srt1 bereits relativ gut charakterisiert ist, ließen erste Untersuchungen zur Funktion von Hxt1 auf eine mögliche Doppelfunktion als Transporter und Sensor schließen.

Ziel der Arbeit war es, für die Akquisition von Kohlenhydraten relevante Mechanismen in *U. maydis* sowohl während der biotrophen als auch der saprophytischen Phase näher zu untersuchen. Dabei stand die weiterführende Charakterisierung des Hexosetransporters

Hxt1 und dessen putativer Sensorfunktion im Vordergrund. Für eine getrennte Untersuchung der Transport- und Sensorfunktion sollte zum einen durch eine gezielte Mutation in Hxt1 ein konstitutiver Hxt1-Signalweg generiert werden, zum anderen sollte die reduzierte Transportaktivität des *hxt1*-Deletionsstamms, unabhängig von der Sensorfunktion, durch heterologe Transporter komplementiert werden. Die detaillierte Untersuchung des Hxt1-abhängigen Wachstums bzw. der Wachstumsinhibition bei Anwesenheit bestimmter Kohlenhydrate sollte dabei Aufschluss über die jeweiligen Funktionen geben. Weiterhin sollte eine potentielle wirtsorganspezifische Anpassung von Kohlenhydrat-Akquisitionsmechanismen während der biotrophen Interaktion analysiert werden. Dabei sollten Untersuchungen an Maiskeimlingen und adulten Pflanzen Aufschluss über die Expression und Funktion von Zuckertransportern sowohl auf der Pilz- als auch der Pflanzenseite geben.

2 Ergebnisse

2.1 Die Rolle von Zuckertransportern während der *Ustilago maydis* / *Zea mays* Pathogeninteraktion

In Vorarbeiten konnten durch die systematische Deletion von Kandidatengen zwei von 20 potentiellen Zuckertransportern in *Ustilago maydis* als relevant für die pathogene Entwicklung in Maiskeimlingen identifiziert werden (Wahl, 2009). Die jungen Blätter von Maiskeimlingen sind noch heterotroph und beziehen ihre Energie größtenteils aus dem Endosperm (Cooper und MacDonald, 1970). In adulten Pflanzen sind dagegen voll photosynthetisch aktive Blätter als Source-Gewebe für Photoassimilate und Sink-Gewebe wie Wurzeln oder reproduktive Organe entwickelt. Source- und Sink-Gewebe unterscheiden sich in den Saccharose-/Hexose-Verhältnissen, wobei in photoautotrophen Source-Organen Saccharose und in Sink-Organen Hexosen wie Glucose und Fructose die häufigsten freien Zucker darstellen (Turgeon, 1989). Durch Transkriptomanalysen infizierter Maiskeimlinge sowie Blätter und männlicher Blütenstände (Fahne) adulter Maispflanzen konnte bereits gezeigt werden, dass die Genexpression von *U. maydis* erhebliche wirtsorganspezifische Unterschiede aufweist (Skibbe *et al.*, 2010).

Die unterschiedlichen Kohlenhydratbedingungen in verschiedenen Organen bzw. Entwicklungsstadien der Maispflanze sowie die Fähigkeit von *U. maydis* die Expression von Genen dem jeweils befallenen Pflanzenteil anzupassen führte zu der Vermutung, dass auch Zuckertransportern eine wirtsorganspezifische Rolle zukommen könnte. Durch Expressionsanalysen sowie Infektionen adulter Maispflanzen mit *U. maydis* Zuckertransporter-Deletionsstämmen sollte überprüft werden, ob eine Sink-/Source-spezifische Relevanz einiger Zuckertransporter für die pathogene Entwicklung vorliegt, die sich nicht auf den Infektionsverlauf in Maiskeimlingen auswirkt.

2.1.1 Untersuchung der Expression von Zuckertransportern in *U. maydis* in verschiedenen Organen der Wirtspflanze

Zunächst wurden basierend auf den Expressionsdaten aus Skibbe *et al.*, 2010 *U. maydis* Zuckertransporter identifiziert, die neben den bereits bekannten Transportern *Srt1* und *Hxt1* während der biotrophen Entwicklung exprimiert sind. Hierzu wurden die Expressionswerte der 20 potentiellen *U. maydis* Zuckertransporter-Gene in infizierten Keimlingen, adulten Blättern (von hier an nur noch Blätter genannt) und Fahnen drei Tage nach Injektion (dpi, days post injection) untersucht. Dabei wurden jeweils Werte in infizierten Pflanzen mit Werten in nicht infizierten Pflanzen verglichen (siehe Tab. 6.1 im Anhang). Die Detektion von *U. maydis* Genen in nicht infizierten Proben beruht dabei auf Kreuzhybridisierung mit pflanzlicher RNA und war nur bei einigen der Probesets zu beobachten. Anhand der Microarray-Daten wurden neben *hxt1* und *srt1* fünf weitere Gene für fortführende Analysen gewählt: *um04478*, *um01656*, *um01476*, *um01156* und *um01653*. Vor allem in Blättern und Fahnen zeigten diese Gene in den Transkriptomdaten hohe Expressionswerte in infizierten Pflanzen im Vergleich zu niedrigen bzw. nicht detektierbaren Werten in den mit Wasser injizierten Kontrollpflanzen.

Zur Bestätigung der Expressionsdaten wurden quantitative Realtime (qRT)-PCR Analysen mit der in Skibbe *et al.*, 2010 isolierten RNA durchgeführt. Diese wurde mir im Rahmen eines Gastaufenthaltes im Labor von Virginia Walbot freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dabei zeigte keiner der Transporter eine eindeutig organspezifische Regulation. Mit Ausnahme von *um01476* zeigten alle Transporter in Keimlingen die höchste Expression (Abb. 2.1). Die Unterschiede der relativen Expression zwischen den Organen betragen in den meisten Fällen weniger als das Zweifache des Vergleichswertes. Die Expression von *um01476* war in den adulten Organen etwas stärker als in Keimlingen. Der eigentlich interessante Expressions-Unterschied zwischen dem photosynthetisch aktiven Blatt und der weitgehend heterotrophen Fahne war jedoch auch in diesem Fall geringer als zweifach. Damit ist den vorliegenden Daten nach auch dieser putative Transporter nicht spezifisch in Source- oder Sink-Geweben exprimiert.

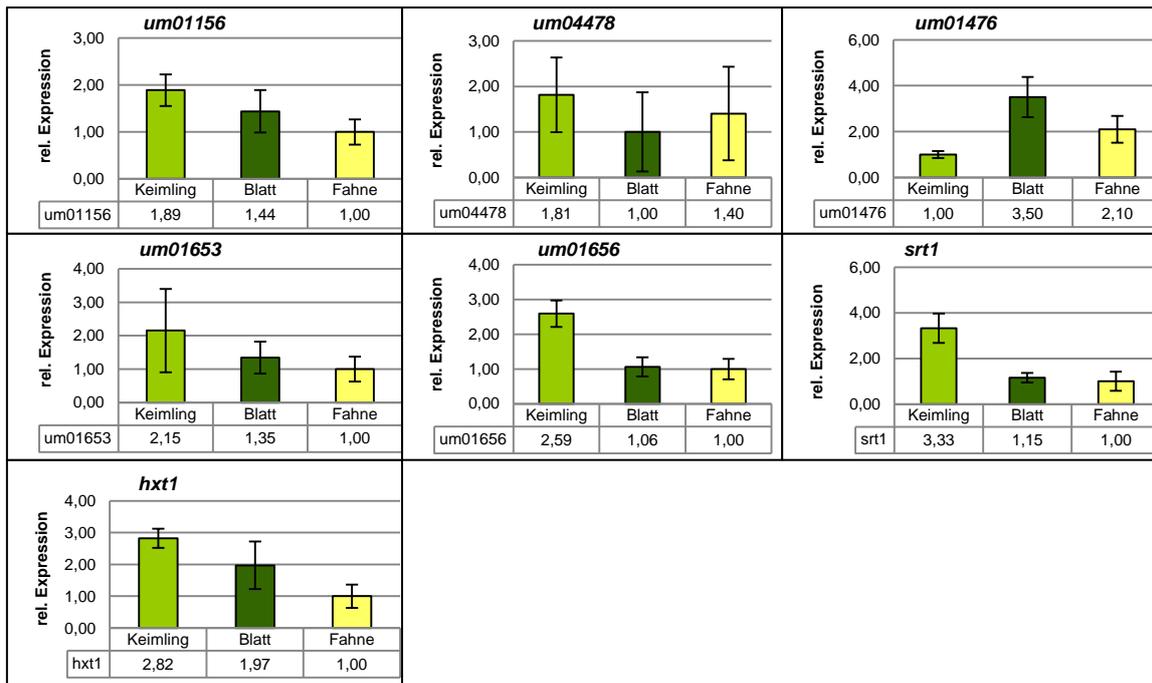


Abb. 2.1 Expression von *U. maydis* Zuckertransporter-Genen in verschiedenen Organen der Maispflanze 3 Tage nach Injektion. Keiner der untersuchten Transporter zeigt eine eindeutig organspezifische Expression. Mit Ausnahme von *um01476* sind alle Transporter im Keimling am stärksten exprimiert. Dargestellt ist die relative Expression der Transportergene in Maiskeimlingen, Blättern und Fahnen als Mittelwert von 2 biologischen sowie je 2 technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Aktin (*um11232*) und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*, *um04869*) als Referenzgene.

2.1.2 Pathogenität von *U. maydis* Zuckertransporter-Deletionsstämmen bei der Infektion adulter Pflanzen

Bei der Infektion von Keimlingen führte die Deletion von Genen, die in *U. maydis* für potentielle Zuckertransporter kodieren, nur in den Fällen von *hxt1* und *srt1* zu einer verminderten Virulenz. In Maiskeimlingen ist die Transition vom heterotrophen zum photoautotrophen Stadium im Zeitraum zwischen Infektion und Auswertung der Symptome (standardmäßig sieben bis 14 Tage nach Aussaat) jedoch noch nicht abgeschlossen (Cooper und MacDonald, 1970). Durch die Infektion adulter Pflanzen sollte untersucht werden, ob Hxt1 und Srt1 in echten Source- bzw. Sink-Organen die gleiche Relevanz für die pathogene Entwicklung zukommt wie in Keimlingsinfektionen und ob weitere Zuckertransporter in diesen Wirtsgeweben eine pathogenitätsrelevante Rolle spielen. Dafür wurden ca. 6 Wochen alte Maispflanzen mit bereits generierten Deletionsstämmen (Wahl, 2009) infiziert und nach 14 Tagen die Symptome an Blättern und Fahnen ausgewertet. Zur Bewertung der Pathogenität wurde ein bereits etabliertes System verwendet, in dem Größe und Häufigkeit von Tumoren an den Fahnen sowie an fünf bis sieben Blättern pro Pflanze in fünf Kategorien eingeordnet wurden, wobei ein im gleichen Zeitraum infizierter Wildtypstamm

als Referenz dient (Skibbe *et al.*, 2010). Die von Wildtypstämmen hervorgerufenen Symptome wurden mit der Kategorie drei bewertet. Ausgehend davon wurden die Symptome der Deletionsstämmen in die Kategorien 0 bis 4 eingeteilt (siehe Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Kategorisierung von Symptomen an adulten Maispflanzen nach Infektion mit *U. mardis* (nach Skibbe *et al.*, 2010).

Kategorie	Göße der Tumore	Frequenz der Symptome
0	keine Tumore	keine Symptome
1	deutlich kleiner als WT	deutlich niedriger als WT
2	kleiner als WT	niedriger als WT
3	entspricht WT	entspricht WT
4	größer als WT	höher als WT

Für die Infektionen wurden Stämme verwendet, in denen die Gene der Zuckertransporter deletiert sind, deren Expression während der biotrophen Phase bereits durch die qRT-PCR-Analysen gezeigt wurde (siehe Abb. 2.1). Zusätzlich wurden Stämme verwendet, in denen die Gene *um05602* bzw. *um02037* deletiert sind. Die zugehörigen Probesets zeigten in den Transkriptomdaten aus Skibbe *et al.*, 2010 ebenfalls deutlich stärkere Signale in infizierten Pflanzen im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen, woraus eine induzierte Expression von *um05602* bzw. *um02037* während der biotrophen Phase gefolgert wurde (siehe Tab. 6.1 im Anhang).

Bei den untersuchten Deletionsstämmen ($\Delta hxt1$, $\Delta srt1$, $\Delta um04478$, $\Delta um01656$, $\Delta um01156$, $\Delta um01653$, $\Delta um05602$ und $\Delta um02037$) zeigten, wie bereits in den Experimenten mit Maiskeimlingen, nur der *hxt1*- und der *srt1*-Deletionsstamm reproduzierbar schwächere Symptome im Vergleich zum Wildtypstamm SG200 (siehe Abb. 2.2, Tab. 6.2 und Abb. 6.1 im Anhang). Infektionen mit $SG200\Delta srt1$ führten bei keiner der untersuchten Pflanzen zu Tumoren, die von ihrer Größe her mit den vom Wildtypstamm hervorgerufenen Tumoren vergleichbar waren. $SG200\Delta hxt1$ war bei etwa 20% der infizierten Pflanzen in der Lage WT-ähnliche Symptome hervorzurufen. Im Durchschnitt aller untersuchten Pflanzen wurde jedoch eine signifikant geringere Tumorgöße bzw. Symptomfrequenz im Vergleich mit der WT-Referenz beobachtet.

Die Pathogenität des Doppeldeletions-Stamms $SG200\Delta hxt1\Delta srt1$ war weiter reduziert, was den bereits bei Keimlingsinfektionen beobachteten, additiven Effekt der Deletionen bestätigte (Wahl, 2009). Die Infektionen der adulten Pflanzen wurden mit der Mais-Varietät W23 durchgeführt. Parallel dazu wurden auch Keimlinge der Varietät W23 infiziert, um eventuelle Unterschiede zu der ansonsten verwendeten Zuckermais-Varietät Early Golden

Bantam (EGB) auszuschließen, die bei früheren Keimlingsinfektionen verwendet wurde. Auch dabei konnte nur eine Beeinträchtigung der Pathogenität bei den *hxt1*- und *srt1*-Deletionsstämmen festgestellt werden (nicht gezeigt). Diese entsprach der reduzierten Virulenz, die auch bei Infektionen von EGB-Keimlingen beobachtet wurde (siehe Abb. 6.2 im Anhang; vgl. Abb. 1.5; Wahl, 2009).

Die Ergebnisse der Infektionsstudien deuten darauf hin, dass der Saccharose-Transporter Srt1 und der Hexosetransporter Hxt1 für die Akquisition von Kohlenhydraten während der biotrophen Phase von *U. maydis* auch in adulten Pflanzen und unabhängig vom befallenen Wirtsorgan die wichtigsten Transportsysteme darstellen.

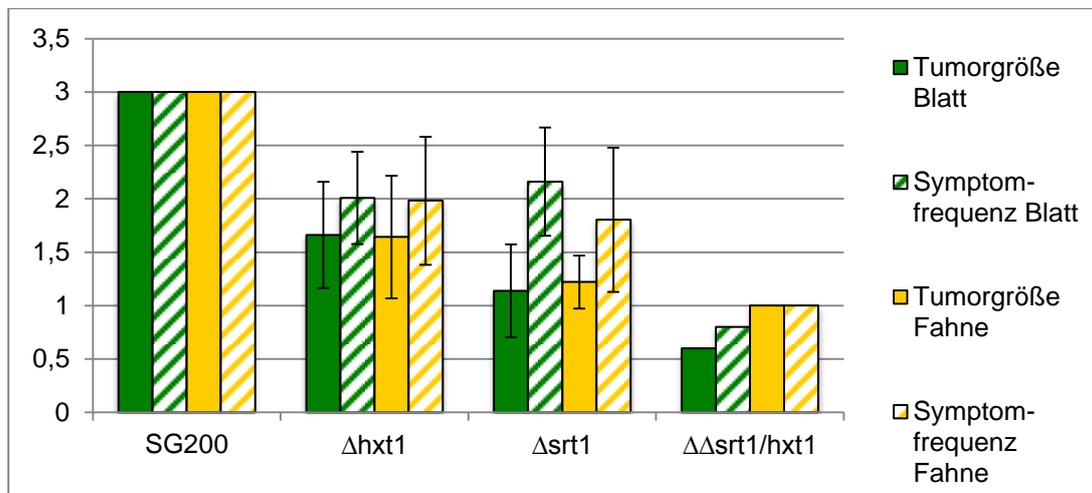


Abb. 2.2 Pathogenität von $\Delta hxt1$ -, $\Delta srt1$ - sowie Doppeldeletionsstämmen nach Infektion adulter Maispflanzen. Die Pflanzen wurden ca. 6 Wochen nach Aussaat infiziert, die Bewertung der Symptome erfolgte 14 Tage nach Injektion an Blättern und Fahnen. Sowohl der $\Delta hxt1$ - wie auch der $\Delta srt1$ -Stamm zeigten eine verminderte Pathogenität in beiden Pflanzenorganen, wobei der $\Delta srt1$ -Stamm bezüglich der ausgebildeten Tumorgößen stärker beeinträchtigt war. Die Doppeldeletion der beiden Transporter führt zu einer weiter reduzierten Pathogenität. Eine eindeutig organspezifische Verminderung der Symptome konnte nicht beobachtet werden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte mehrerer unabhängiger Infektionsexperimente an, sofern diese durchgeführt wurden.

2.2 Die Rolle von Zuckertransportern der SWEET-Familie in Mais während der Interaktion mit *Ustilago maydis*

SWEET-Proteine gehören zu einer erst kürzlich identifizierten Familie von Zucker-Effluxtransportern. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Pathogene die Expression von SWEET-Genen in *A. thaliana* gezielt induzieren können, wahrscheinlich um die Zuckertransportwege der Pflanze zu ihren Gunsten zu manipulieren (Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Ob SWEET-Proteine bei der pathogenen Interaktion von *U. maydis* mit *Z. mays* eine Rolle spielen war bisher nicht bekannt. Laut der Datenbank für Membranproteine in Pflanzen, Aramemnon (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>), existieren in Mais 18 bisher nicht benannte SWEET-Orthologe. Zur leichteren Unterscheidung wurden diese phylogenetischen Analysen entsprechend den am nächsten verwandten Orthologen in *A. thaliana* und Reis nach benannt (D. Sosso, persönliche Mitteilung, siehe Abb. 6.3 im Anhang).

2.2.1 Expression von Sweet-Genen in Mais während der Infektion mit *U. maydis*

Durch die Analyse der in Skibbe *et al.*, 2010 publizierten Microarray-Daten wurde die Expression der Sweet-Gene in mit *U. maydis* infizierten Organen der Maispflanzen mit der von nicht infizierten Kontrollpflanzen im gleichen Stadium verglichen (siehe Tab. 2.2). Dabei konnten drei Gene identifiziert werden, deren Expression nach Infektion mit *U. maydis* in Keimlingen und Blättern erhöht war. Transkripte, für die keine Probesets auf dem verwendeten Agilent-Microarray vorhanden sind, konnten auch in qRT-PCR Analysen nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Bei den in infizierten Geweben induzierten Sweet-Genen handelt es sich der Nomenklatur (vgl. Abb. 6.3) nach um *Sweet4a* (*Swt4a*, GRMZM2G000812), *Sweet4b* (*Swt4b*, GRMZM2G144581) und *Sweet11*. (*Swt11*, GRMZM2G368827). Alle drei zeigen drei Tage nach der Injektion eine etwa zweifach stärkere Expression in infizierten Keimlingen. In infizierten adulten Blättern ist drei Tage nach Infektion zunächst nur *Swt11* stärker exprimiert, neun Tage nach Infektion ist die Expression aller drei Gene in infizierten Blättern vier- bis fünfmal höher als in nicht infizierten Blättern. In Fahnen ist dagegen nur neun Tage nach Infektion mit einer etwa dreifach stärkeren Expression von *Swt4a* ein Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen zu verzeichnen. Zur Verifikation der Microarraydaten wurden zusätzlich qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Expressionswerte von *Swt4a*, *Swt4b* und *Swt11* drei Tage nach Injektion in Keimling, Blatt und Fahne analysiert. Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese diente erneut die von Skibbe *et al.*, 2010 isolierte RNA. Auf die zusätzliche Analyse weiterer Infektionsstadien wurde aus Zeit- und Kostengründen verzichtet. Mit den qRT-PCR-Analysen konnte die induzierte Expression

der *Sweet*-Gene in infizierten Pflanzen bestätigt werden (Abb. 2.3). *Swt4a* und *Swt4b* sind den qRT-PCR Analysen nach in infizierten Keimlingen drei Tage nach Injektion etwa 10-fach stärker exprimiert als in nicht infizierten Kontrollpflanzen. Für *Swt11* konnte in Keimlingen aufgrund der sehr geringen Expression kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In infizierten Blättern adulter Pflanzen konnte dagegen eine deutlich höhere Expression von *Swt11* detektiert werden als in nicht infizierten Pflanzen. Auch *Swt4b* zeigte in infizierten adulten Blättern eine etwa zweifach stärkere Expression als in nicht infizierten Blättern, für *Swt4a* konnte kein Unterschied detektiert werden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei technischen und zwei biologischen Replikaten, woraus teilweise relativ hohe Standardabweichungen resultieren. Dies zeigt jedoch auch, dass die gemessenen Werte reproduzierbar sind. In Verbindung mit den Ergebnissen der Microarray-Analysen konnte so erstmals eine induzierte Expression von putativen Zucker-Effluxtransportern der SWEET-Klasse in Mais während der pathogenen Interaktion mit *U. maydis* gezeigt werden.

Tab. 2.2 Änderung der Expression von Sweet-Genen nach Infektion mit *U. maydis*. Angegeben ist Änderung der Expression in infizierten Pflanzen als Vielfaches der Expressionswerte in Wasser-injizierten Pflanzen (FoldChg). Die Werte stellen Mittelwerte aus vier biologischen Replikaten dar. Änderungen >2-fach sind grau unterlegt. Der P-value gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die angegebenen Expressionsänderungen auf Zufall beruhen. Die für die Analyse verwendeten Datensätze stammen aus Skibbe *et al.*, 2010. Die Nomenklatur der Sweet-Gene richtet sich nach ihrer Homologie zu Orthologen in *A. thaliana* und Reis (D. Sosso, pers. Mitteilung, vgl. Tab. 6.3).

Name	Zugangsnummer	Keimling 1 dpi		Keimling 3 dpi		Blatt 3 dpi		Fahne 3 dpi		Blatt 9 dpi		Fahne 9 dpi	
		FoldChg	Pvalue	FoldChg	Pvalue	FoldChg	Pvalue	FoldChg	Pvalue	FoldChg	Pvalue	FoldChg	Pvalue
ZmSwt1	GRMZM2G153358	1,53	0,35	0,75	0,52	0,35	0,03	0,43	0,08	0,29	0,01	0,16	0,00
ZmSwt2	GRMZM2G324903	1,97	0,01	0,95	0,81	0,67	0,07	0,75	0,20	0,72	0,14	0,48	0,00
ZmSwt3a	GRMZM2G179679	kein Probeset vorhanden											
ZmSwt3b	GRMZM2G060974	kein Probeset vorhanden											
ZmSwt4a	GRMZM2G000812	1,34	0,33	2,57	0,01	0,44	0,01	0,82	0,51	5,75	0,00	3,03	0,00
ZmSwt4b	GRMZM2G144581	1,98	0,00	2,11	0,00	1,41	0,07	0,70	0,06	4,96	0,00	0,34	0,00
ZmSwt4d	GRMZM2G137954	1,60	0,02	2,54	0,00	0,92	0,66	0,62	0,02	1,34	0,14	0,45	0,00
ZmSwt6a	GRMZM2G157675	0,95	0,84	0,77	0,32	0,59	0,05	0,51	0,02	0,82	0,42	0,09	0,00
ZmSwt6b	GRMZM2G416965	kein Probeset vorhanden											
ZmSwt11	GRMZM2G368827	3,50	0,02	2,50	0,21	6,64	0,00	0,99	0,99	4,03	0,01	0,03	0,00
ZmSwt12a	GRMZM2G133322	1,05	0,58	0,72	0,00	0,83	0,04	0,72	0,00	1,00	0,97	1,01	0,88
ZmSwt12b	GRMZM2G099609	kein Probeset vorhanden											
ZmSwt13a	GRMZM2G173669	0,45	0,07	0,29	0,01	0,66	0,32	0,60	0,22	0,12	0,00	0,39	0,04
ZmSwt13b	GRMZM2G021706	0,93	0,76	0,59	0,05	0,52	0,02	0,32	0,00	0,38	0,00	0,49	0,01
ZmSwt14a	GRMZM2G094955	1,66	0,02	0,56	0,01	0,78	0,22	0,91	0,65	0,44	0,00	0,66	0,06
ZmSwt14b	GRMZM2G015976	0,82	0,54	0,75	0,35	0,89	0,72	0,33	0,00	0,83	0,67	0,33	0,00
ZmSwt15	GRMZM2G168365	nicht detektierbar											
ZmSwt16	GRMZM2G106462	1,85	0,18	1,23	0,64	0,77	0,56	0,67	0,37	1,39	0,46	4,26	0,01

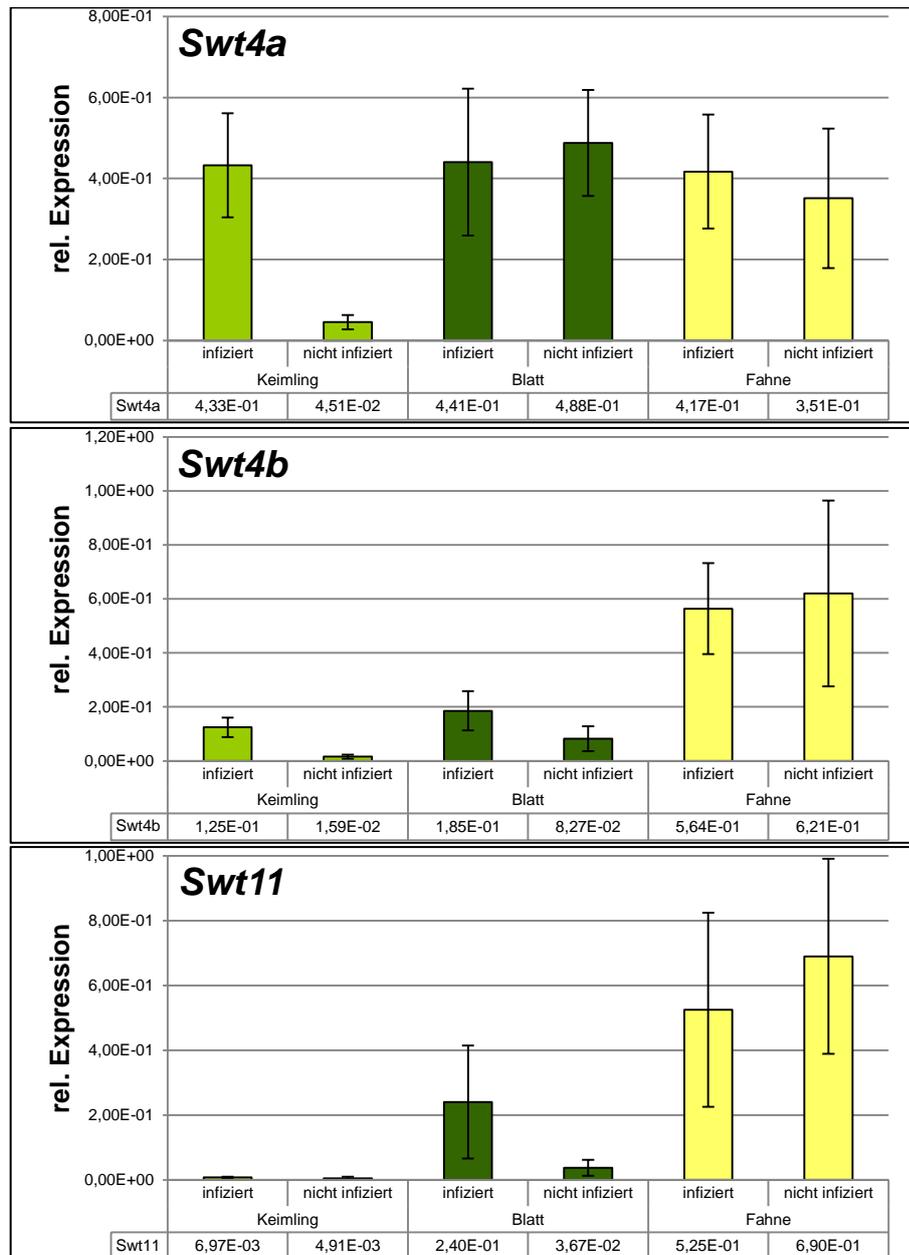


Abb. 2.3 Vergleich der Expression von Sweet-Genen in Mais in infizierten und nicht infizierten Pflanzen 3 Tage nach Injektion. Die Expression von *Swt4a* und *Swt4b* ist in Keimlingen nach Infektion mit *U. maydis* erhöht. In adulten Blättern sind *Swt4b* und *Swt11* im infizierten Gewebe stärker exprimiert. Die stärkste Expression zeigten alle *Swt*-Gene in Fahnen, wobei kein Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen bestand. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus zwei qRT-PCR Experimenten mit jeweils zwei biologischen und zwei technischen Replikaten dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Cyanase (GRMZM2G134747) als Referenzen.

2.2.2 Die während der Interaktion mit *U. maydis* induzierten Sweet-Gene in Mais kodieren für funktionelle Zuckertransporter

Die Identifizierung der bis dahin unbekanntenen Zucker-Effluxtransporter der SWEET-Klasse in *A. thaliana* erfolgte durch einen Screen, bei dem Transmembrandomänen-Proteine mit unbekannter Funktion zusammen mit Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) basierten Glucose-Nanosensoren in humanen Nierenzellen (HEK293T) exprimiert wurden (Chen *et al.*, 2010). Da HEK293T-Zellen nur sehr geringe endogene Kapazitäten zur Zuckeraufnahme besitzen, kann durch die Co-Expression eines putativen Transporters mit einem zytoplasmatisch lokalisierten Nanosensor dessen Transportfunktion über eine Änderung des FRET-Quotienten detektiert werden. Die transfizierten HEK293T-Zellen werden dazu in einem Flusskammersystem mit Zuckerlösungen umspült und währenddessen Änderungen des FRET-Signals beobachtet (Frommer *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2011; Takanaga und Frommer, 2010).

Um die in Mais während der Interaktion mit *U. maydis* induzierten SWEET-Proteine SWT4a, SWT4b und SWT11 auf eine Transportfunktion zu überprüfen, wurden diese in Kooperation mit D. Sosso (Frommer Labor, Carnegie Institution for Science, Stanford, CA, USA) in dem oben beschriebenen Testsystem untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Vollängen cDNAs über das Maize Full Length cDNA Project bezogen (Klon-Nummern: Swt4a ZM_BFc0091L21, Swt4b ZM_BFc0019P07, Swt11 ZM_BFb0166M11; Soderlund *et al.*, 2009) und zur Transfektion in Gateway-kompatible Entry-Vektoren kloniert.

Die Umklonierung in die entsprechenden Expressionsvektoren, die Transfektion der HEK293T-Zellen, die FRET-Messungen sowie die Verarbeitung der FRET-Daten erfolgten durch D. Sosso. Die Änderungen der FRET-Signale nach Zugabe der Zuckerlösungen zeigten, dass SWT4a und SWT4b den Transport von Glucose bzw. SWT11 die Aufnahme von Saccharose vermitteln können (siehe Abb. 2.4). Als Positivkontrolle wurde die Aufnahme durch die bereits charakterisierten SWEET-Transporter AtSWT1 aus *A. thaliana* (Glucose) bzw. OsSWT11 aus Reis (Saccharose) gemessen. Ein relativer Vergleich zwischen den beiden Glucose-Transportern zeigt, dass ZmSWT4a zu einer stärkeren FRET-Änderung führte als ZmSWT4b und somit wahrscheinlich einen effizienteren Glucose-Transport vermittelt. Der Saccharose-Transport durch SWT11 aus Reis und Mais war den Daten nach etwa gleich effizient.

Zur Verifikation der FRET-Messungen wurde die Funktion der Transporter zusätzlich in Hefe getestet. SWT4a, SWT4b und SWT11 wurden dafür in den Vektor pNEV-E (Sauer und Stolz, 1994) kloniert und im Stamm EBY.VW4000 exprimiert. In EBY.VW4000 sind alle endogene Hexosetransporter deletiert und der Stamm ist für ein Wachstum auf Hexosen auf die Expression eines funktionellen Hexosetransporters angewiesen (Wieczorke *et al.*, 1999).

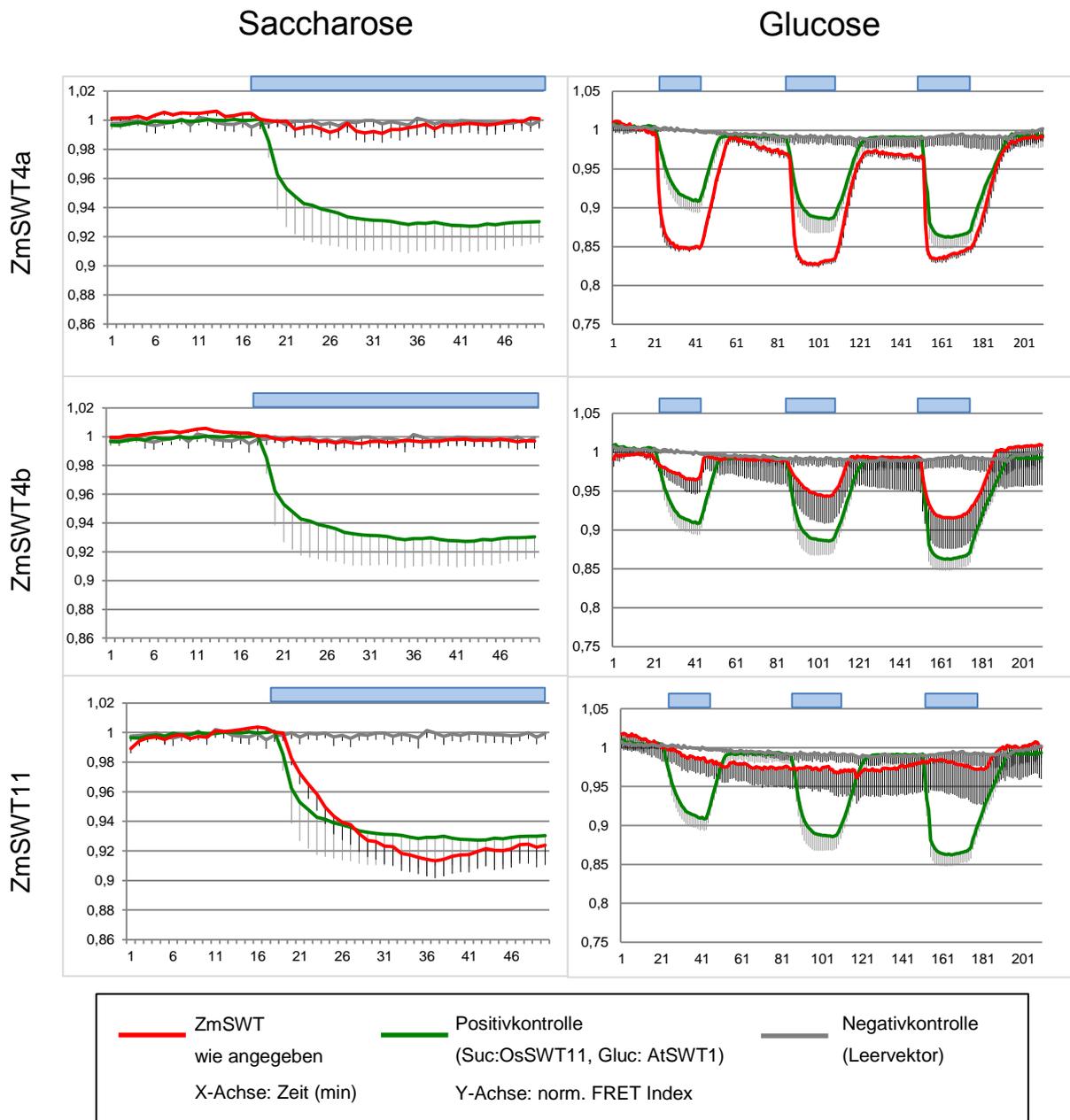


Abb. 2.4 Messung der Transportaktivität von SWEET-Proteinen aus Mais (D. Sosso, AG Frommer). Die in Mais während der pathogenen Interaktion mit *U. maydis* induzierten SWEET-Proteine stellen im Fall von SWT4a und SWT4b funktionelle Glucose-Transporter dar. SWT11 fungiert als Saccharose-Transporter. Die Transporter wurden mit zytoplasmatisch lokalisierten Glucose- bzw. Saccharose-Nanosensoren in HEK293T-Zellen co-exprimiert und die Änderungen des FRET-Quotienten während der Zugabe von 10 mM Glucose- bzw. Saccharose-Lösungen in einem Flusskammersystem beobachtet. Die Messungen erfolgten jeweils bei 10-20 Zellen parallel. Blaue Balken geben die Zeiträume an, in denen Zuckerrösung zugegeben wurde. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Die Expression von ZmSWT4a und ZmSWT4b in EBY.VW4000 erlaubte dem Stamm ein verbessertes Wachstum auf Medien mit je 1% Glucose, Fructose oder Mannose als jeweils einzige Kohlenstoffquelle, was auf einen SWT-vermittelten Zuckertransport zurückzuführen ist (Abb. 2.5 A). Das Wachstum auf Medium mit nur 0,1% Glucose dagegen war kaum besser als das von Zellen, die zur Kontrolle mit dem leeren Expressionsvektor transformiert wurden. Die Expression des *U. maydis* Transporters Hxt1, der als Positivkontrolle diente, führte unter diesen Bedingungen hingegen zu einem deutlich besseren Wachstum. Auf Medium mit Galactose wurde durch SWT4a/b keine Verbesserung des Wachstums erreicht, Galactose scheint somit nicht zu den transportierten Substraten zu gehören. Die Expression von Swt11 führte bei keiner der Hexosen zu einem besseren Wachstum. Dies entspricht den Aufnahmemessungen in humanen Zellen, bei denen für SWT11 ebenfalls kein Glucose-Transport detektiert werden konnte. SWT11 scheint daher ein reiner Saccharose-Transporter zu sein. Zur Überprüfung der Saccharose-Transportfunktion wurden die Transporter zudem im Hefestamm DBY2617 exprimiert. Dieser Stamm ist defizient in der extrazellulären Invertaseaktivität. Er ist daher für ein effizientes Wachstum auf die Aufnahme von Saccharose angewiesen, besitzt jedoch nur eine geringe endogene Saccharose-Aufnahmekapazität (Kaiser und Botstein, 1986). Während die Expression von *ZmSwt4a* und *ZmSwt4b* keinen Einfluss auf das Wachstum des Stamms auf Saccharose-haltigem Medium hatte, konnte bei *ZmSwt11*-exprimierenden Zellen nach 10 Tagen ein leicht verbessertes Wachstum auf Medium mit 0,1% Saccharose beobachtet werden (Abb. 2.5 B). Bei einer Konzentration von 1% Saccharose war kein Unterschied zu den mit dem Leervektor transformierten Zellen zu erkennen (nicht gezeigt). SWT11 vermittelt daher wahrscheinlich einen wenig effizienten Saccharose-Transport, der die endogene Saccharose-Aufnahmekapazität von DBY2617 nur geringfügig verbessert. Der als Positivkontrolle verwendete, hochaffine und energieabhängige Saccharose-Transporter Srt1 aus *U. maydis* führte dagegen zu einer deutlichen Verbesserung des Wachstums auf Saccharose-haltigem Medium (Abb. 2.5 B; Wahl *et al.*, 2010a). Durch die Expression in Hefe konnte somit die Funktionalität der Sweet-Transporter bestätigt und die Substrateigenschaften von SWT4a und SWT4b genauer bestimmt werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass die während der Interaktion mit *U. maydis* induzierten Sweet-Gene in Mais für funktionelle Transporter kodieren, was bis dato gleichzeitig die erste funktionelle Analyse von SWEET-Proteinen in Mais überhaupt darstellt. Zudem erfolgte die Charakterisierung von SWT11 als Saccharose-Transporter zu einem Zeitpunkt (August 2011), an dem SWEET-Proteine bis dahin nur als Glucose-Transporter bekannt waren.

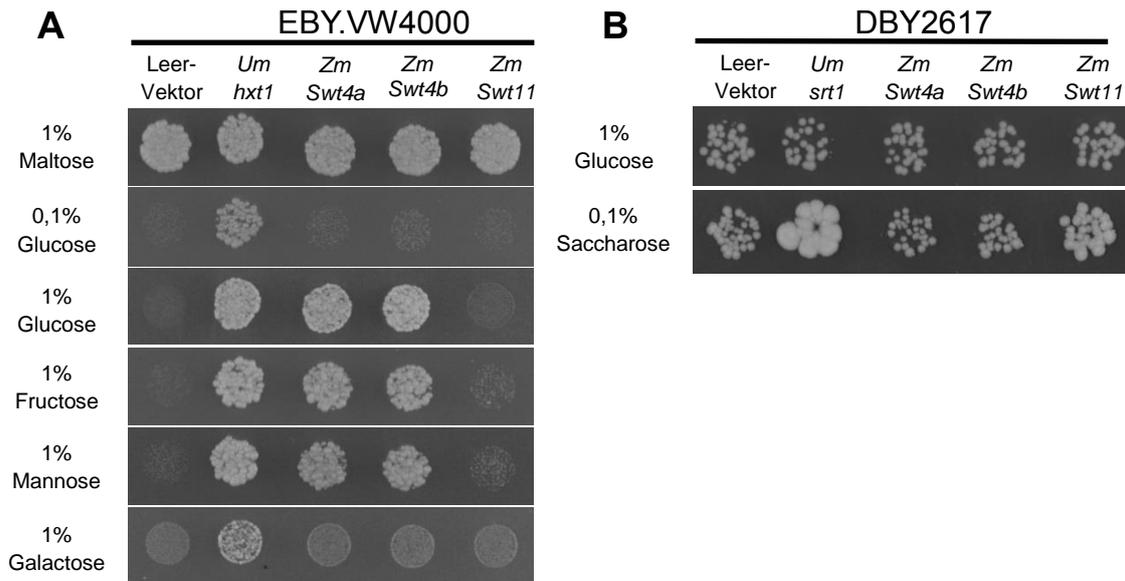


Abb. 2.5 Vergleichende Wachstumsanalyse mit *ZmSwt* cDNA-exprimierenden Hefezellen. Definierte Mengen von Hefezellen, welche die jeweils angegebene *Z. mays* bzw. *U. maydis* cDNA exprimierten oder zur Kontrolle nur den Leervektor beinhalteten wurden auf Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft und wenn nicht anders angegeben für 3 Tage bei 28°C inkubiert. **(A)** *ZmSwt4a* und *ZmSwt4b* sind in der Lage im Stamm EBY.VW4000 die Aufnahme von Glucose, Fructose und Mannose bei höheren extrazellulären Konzentrationen zu vermitteln. Das Wachstum auf Maltose-haltigem Medium stellt eine Positivkontrolle dar. **(B)** Die Expression von *ZmSwt11* im Stamm DBY2617 führt zu einem geringfügig besseren Wachstum nach 10 Tagen auf Medium mit 0,1% Saccharose, was jedoch nur auf Ebene der Einzelkolonien zu erkennen ist. Das Wachstum auf Glucose-haltigem Medium stellt eine Positivkontrolle dar und wurde bereits nach 3 Tagen beobachtet.

2.3 Infektion von Maislinien mit Defekten beim Export von Photoassimilaten

In Mais wurde eine Reihe von Mutanten charakterisiert, die Defekte beim Export von Photoassimilaten aus photosynthetisch aktiven Blättern aufweisen. Pflanzen, die homozygot für die mutierten Allele *tie-dyed 1 (tdy1)*, *tie-dyed 2 (tdy2)*, *sucrose export defective 1 (sxd1)* oder *psychedelic (psc)* sind, bilden chlorotische Sektoren auf den Blättern aus, die sich durch einen niedrigeren Chlorophyllgehalt und eine Hyperakkumulation von Stärke und löslichen Zuckern auszeichnen (Baker und Braun, 2008; Braun *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2009; Provencher *et al.*, 2001; Russin *et al.*, 1996; Slewinski *et al.*, 2010). In *tdy1* und *psc* Mutanten wurden Zuckerkonzentrationen innerhalb dieser Sektoren gemessen, die bis zu 3-fach (Saccharose) bzw. 10-fach (Glucose und Fructose) höher waren als in grünen Sektoren oder WT-Pflanzen (Braun *et al.*, 2006; Slewinski *et al.*, 2010). Die Defekte der Mutanten bei der Phloembeladung sind gut untersucht: *Sxd1* kodiert für eine Tocopherol-Synthase. Die Abwesenheit von Tocopherol in *sxd1* Mutanten führt zu einer verstärkten Einlagerung von Kallose an Plasmodesmata zwischen Phloemparenchymzellen und Bündelscheidezellen und

verhindert so den Transport von Saccharose in die Leitbündel (Baker und Braun, 2008; Provencher *et al.*, 2001; Russin *et al.*, 1996). *Tdy1* kodiert für ein nur in Phloemzellen exprimiertes Transmembrandomänen-Protein (Ma *et al.*, 2009). Es wird postuliert, dass TDY1 über eine Interaktion mit dem Saccharose-Transporter SUT1 eine positive regulatorische Funktion bei der Beladung des Phloems mit Saccharose ausübt (Baker und Braun, 2008). Die *tdy2* Mutation liegt in einem Gen, das für eine Kallose-Synthase kodiert und führt zu Störungen bei der Ausbildung des Phloems. Dies führt zu einer Beeinträchtigung des symplastischen Transports zwischen Geleit- und Siebröhrenzellen und somit der Phloembeladung (Slewinski *et al.*, 2012). Epistatische Analysen von *psc* Mutanten zeigen, dass *Psc* unabhängig von den bereits genannten Wegen in den Export von Kohlenhydraten aus Blättern involviert ist. Näheres über die molekulare Funktion ist bisher jedoch nicht bekannt (Slewinski *et al.*, 2010). Als Folge des verminderten Exports von Assimilaten zeigen alle diese Mutanten ein geringeres Wachstum sowie Defekte in der Blütenentwicklung (Baker und Braun, 2008; Ma *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009; Slewinski *et al.*, 2010).

In Infektionsexperimenten sollte untersucht werden, ob die Hyperakkumulation von Kohlenhydraten in den Blättern dieser Mutanten für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* einen Vorteil darstellt und so zu einer verstärkten Ausbildung von Symptomen durch den WT-Stamm SG200 führt und ob die reduzierte Pathogenität der Zuckertransporter-Deletionsstämme *SG200Δhxt1* und *SG200Δsrt1* durch die höhere Kohlenhydratkonzentrationen komplementiert werden kann.

Beim verwendeten Saatgut wurde für die jeweiligen mutierten Allele eine 1:1 Aufspaltung von homozygoten und heterozygoten Pflanzen erwartet (D. Braun, V. Walbot, pers. Mitteilung). Für *tdy1*, *tdy2*, *sxd1*, und *psc* homozygote Pflanzen wurden anhand der ausgebildeten chlorotischen Sektoren identifiziert und gemeinsam mit ihren heterozygoten Geschwister-Pflanzen infiziert. Die heterozygoten Pflanzen gleichen phänotypisch WT-Pflanzen und dienen als Kontrolle.

Es konnte jedoch für keinen der infizierten Stämme ein signifikanter und reproduzierbarer Unterschied bei der Ausbildung von Symptomen an den Blättern von Mutanten- und WT-Pflanzen beobachtet werden (Abb. 6.4 und Tab. 6.3 im Anhang, Infektionen von *psc*-Mutanten nicht gezeigt). Im Allgemeinen waren Symptome an Mutanten eher schwächer ausgeprägt als an WT-Pflanzen. Zieht man das insgesamt verschlechterte Wachstum der Mutanten-Pflanzen in Betracht, war die Größe der Tumore in Relation zur Größe der Pflanzen jeweils vergleichbar. Auch eine präferenzielle Überlappung von Symptomen mit den kohlenhydratreichen, chlorotischen Sektoren konnte bei den makroskopischen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Durch die Infektion selbst wurden starke

Chlorosen verursacht, welche zum Zeitpunkt der Auswertung die von den jeweiligen Mutationen hervorgerufenen, schwächer ausgeprägten chlorotischen Sektoren überdeckten. Die erhöhten Zuckerkonzentrationen in den Blättern scheinen daher nicht ausreichend zu sein, um die Abwesenheit der hochaffinen Zuckertransporter Hxt1 bzw. Srt1 in *U. maydis* während der biotrophen Phase zu kompensieren und zu einer stärkeren Ausbildung von Tumoren beizutragen. Der subjektive Eindruck der infizierten Pflanzen legte eher nahe, dass sich ein guter physiologischer Zustand der Wirtspflanze positiv auf die Ausbildung von Tumoren auswirkt, da die stärksten Symptome immer an WT-Pflanzen beobachtet wurden (nicht gezeigt).

2.4 Komplementation der *hxt1*-Deletion

Die Deletion des Hexosetransporters *hxt1* führt in *Ustilago maydis* zu einer reduzierten Pathogenität, einem verminderten Wachstum auf Medien mit Glucose, Fructose oder Mannose als einziger Kohlenstoffquelle und interessanterweise zu einem verbesserten Wachstum auf Medien mit Galactose und Xylose. Das verbesserte Wachstum des *hxt1*-Deletionsstamms führte zu der Hypothese, dass Hxt1 neben der Transportfunktion auch als Rezeptor für Kohlenhydrate fungieren könnte (Wahl, 2009). Um diese Hypothese weiter zu untersuchen sollte zunächst der Zusammenhang zwischen den beobachteten Phänotypen und der Deletion von *hxt1* zweifelsfrei belegt werden. Dazu wurde in den *ip*-Locus des Deletionsstamms ein *hxt1*-Expressionskonstrukt zur Komplementation integriert. Der *ip*-Locus wird in *U. maydis* standardmäßig für die gezielte Integration von Expressionskonstrukten verwendet. Durch zwei gezielte Punktmutationen im ORF von *um00844*, welches im *ip*-Locus liegt und für ein Succinat-Dehydrogenase-Vorläuferprotein kodiert, kann in *U. maydis* eine Carboxin-Resistenz vermittelt werden (Keon *et al.*, 1991). So können ein 5'- und ein 3'-Bereich von *um00844*, welche zusammen den gesamten ORF sowie die besagten Mutationen enthalten, als Flanken für die homologe Integration von beliebigen DNA-Fragmenten dienen. Das *hxt1*-Expressionskonstrukt enthielt neben einem 2,5 kb-Fragment des *hxt1*-Promotors zusätzlich ein C-terminal fusioniertes *gfp*-Gen zur Expressionskontrolle.

Durch die Expression des *hxt1-gfp* Fusionskonstruktes konnten alle bekannten Phänotypen des *hxt1*-Deletionsstamms komplementiert werden. Die durch die Deletion von *hxt1* reduzierte Virulenz konnte sowohl durch einfache als auch mehrfache Integration des Konstrukts wiederhergestellt werden (Abb. 2.6 A). Auch das im *hxt1*-Deletionsstamm reduzierte Wachstum auf Medien mit Glucose, Fructose und Mannose als einziger Kohlenstoffquelle konnte unabhängig von der Kopienzahl des Konstrukts komplementiert werden. Das Wachstum auf Galactose- und Xylose-haltigen Medien scheint dagegen durch

eine höhere Expression von *hxt1* stärker reprimiert zu werden (Abb. 2.6 B). Die Hxt1-abhängige Wachstums-Repression auf Galactose- bzw. Xylose-haltigen Medien variiert daher mit der Expressionsstärke von *hxt1*.

Die erfolgreiche Komplementation der Wachstumsphänotypen zeigt, dass die Funktionalität von Hxt1 durch die GFP-Fusion nicht beeinträchtigt wird. Die Lokalisierung des Hxt1-GFP Fusionsproteins konnte erwartungsgemäß an der Peripherie der Zelle beobachtet werden (Abb. 2.6 C), was den vorhergesagten zwölf Transmembrandomänen des Hxt1 Proteins entsprechend auf eine Lokalisierung in der Zellmembran hindeutet. Zusätzlich konnte eine Co-Lokalisierung des GFP-Signals mit Vakuolen beobachtet werden, die durch CellTracker Blue® (CMAC) sichtbar gemacht wurden. Diese vakuoläre Lokalisierung war bei Stämmen mit mehrfach integriertem Konstrukt stärker ausgeprägt als bei Stämmen mit einfacher Integration (nicht gezeigt). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch andere *U. maydis* Zuckertransporter als GFP-Fusionsproteine an der Peripherie sowie den Vakuolen der Zellen lokalisieren (vgl. Abb. 6.5 im Anhang). Die Co-Lokalisierung mit Vakuolen ist somit nicht spezifisch für Hxt1. Die mit steigender Expression stärker werdende Intensität des Signals in den Vakuolen lässt vermuten, dass ein Teil der Fusionsproteine als Folge eines hohen Proteinumsatzes dorthin transportiert wird. Eine ähnliche Lokalisierung wurde bereits für eine Reihe von Hexosetransportern in Hefe sowie einen Purin-Transporter in *Aspergillus oryzae* beobachtet, wo sie durch einen hohen Proteinumsatz erklärt wird, infolgedessen die Transporter internalisiert werden und zur Degradierung in die Vakuole gelangen (Higuchi *et al.*, 2006; Krampe und Boles, 2002; Snowdon und van der Merwe, 2012; Yoshida *et al.*, 2012).

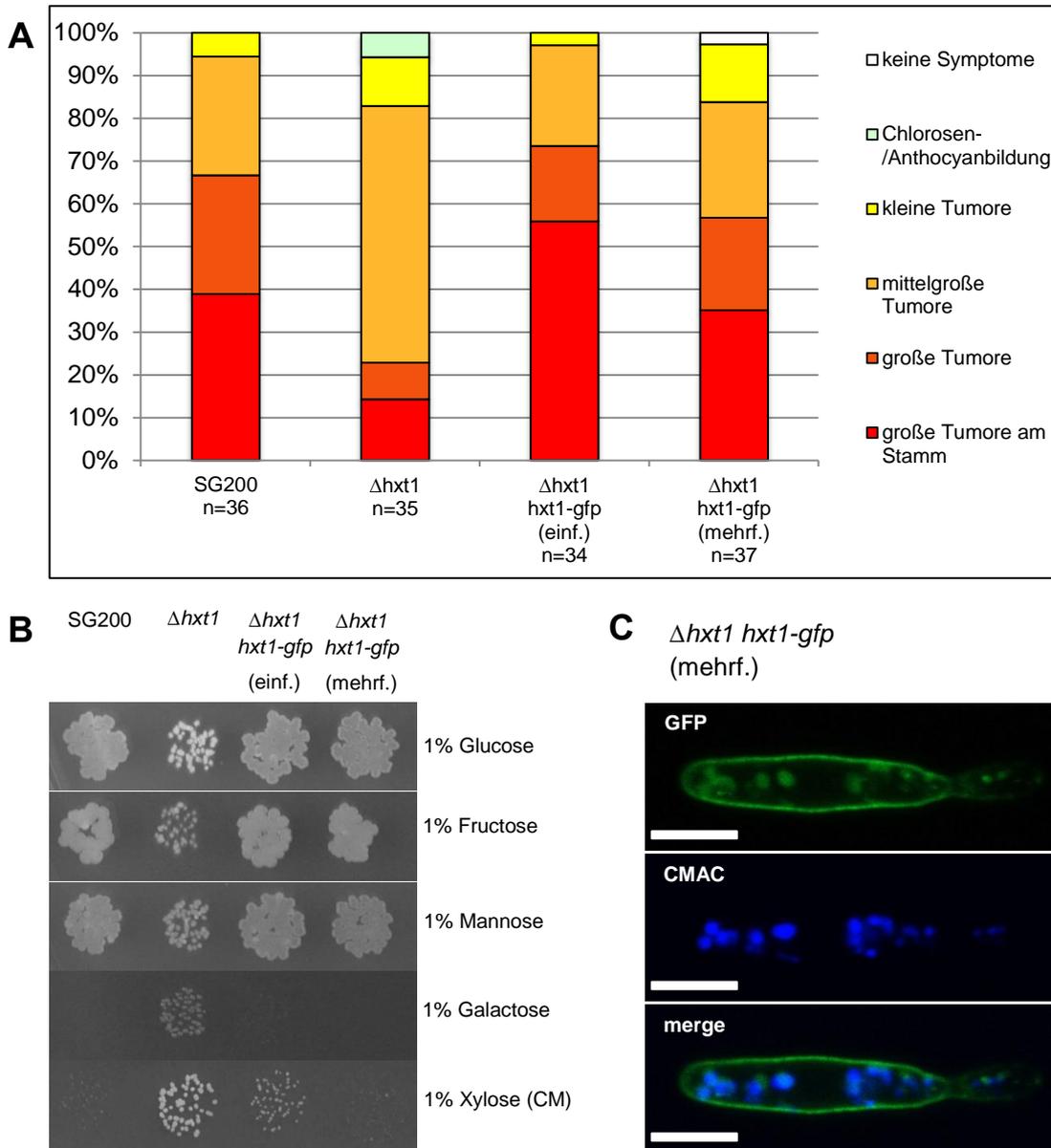


Abb. 2.6 Komplementation der *hxt1*-Deletion. Die Phänotypen des *hxt1*-Deletionsstamms konnten durch die Expression eines *hxt1-gfp* Fusionskonstrukts unter der Kontrolle des *hxt1*-Promotors komplementiert werden. Die so entstandenen Stämme tragen entweder eine einzelne (einf.) oder mehrere (mehrf.) Kopien des Konstrukts. **A:** Die Pathogenität der komplementierten Stämme wurde durch die Einstufung der an Maiskeimlingen hervorgerufenen Symptome sieben Tage nach Injektion bewertet. Die gezeigten Infektionen wurden mehrfach durchgeführt und führten jeweils zu einem vergleichbaren Ergebnis. **B:** Das Wachstum auf Ammonium-Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen wurde nach 3 Tagen, im Fall von Galactose nach 5 Tagen beobachtet. Das Wachstum auf Medium mit Xylose wurde auf Vollmedium (CM) getestet, da auf dem sonst verwendeten Ammonium-Minimalmedium der Wachstumsunterschied kaum sichtbar war. **C:** Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte eine Lokalisierung des Hxt1-GFP Fusionsproteins in der zellulären Peripherie festgestellt werden. Zusätzlich ist eine Überlappung des GFP-Signals mit den durch CellTracker Blue® (CMAC) markierten Vakuolen zu sehen. Der Längenmaßstab entspricht 5 μm .

2.5 Der Austausch einer einzelnen Aminosäure in Hxt1 führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität

Das verminderte Wachstum des *hxt1*-Deletionsstamms auf Glucose, Fructose und Mannose kann durch die fehlende Transportfunktion erklärt werden. Dass die Deletion eines Zuckertransporters jedoch gleichzeitig auch ein verbessertes Wachstum auf bestimmten Kohlenstoffquellen zur Folge hat, schien ungewöhnlich und führte zu der Vermutung, dass Hxt1 neben der Transportfunktion auch eine Sensorfunktion besitzen könnte (Wahl, 2009).

Neben dem verbesserten Wachstum von *hxt1*-Deletionsstämmen stellt auch die Ähnlichkeit zu bekannten Zucker-Rezeptoren einen Hinweis auf eine zusätzliche Sensorfunktion von Hxt1 dar. So zeigen BLAST Analysen, dass Hxt1 im Vergleich mit Proteinen in *S. cerevisiae* am ähnlichsten zu den Glucose-Sensoren Rgt2p und Snf3p (E value 3,3e-103 bzw. 3,3e-97) ist (siehe Abb. 6.6 im Anhang für einen phylogenetischen Stammbaum). Rgt2 wurde bei der Selektion von Suppressor-Mutanten identifiziert, die trotz einer Mutation im *SNF3*-Gen in der Lage sind auf niedrigen Glucose-Konzentrationen zu wachsen (Marshall-Carlson *et al.*, 1991). Bei der Charakterisierung der Mutation stellte sich heraus, dass diese zum Austausch eines hochkonservierten Arginins zu Lysin führt und eine zuckerunabhängige, konstitutive Expression der Rgt2p-regulierten Hexosetransporter zur Folge hat. Das Einbringen einer analogen Mutation in *SNF3* führte ebenfalls zu einem konstitutiv aktiven Signalweg (Ozcan *et al.*, 1996). In der Folge konnte gezeigt werden, dass der Austausch des konservierten Arginins zu Lysin auch bei den Hexose-Sensoren Hxs1 in *Hansenula polymorpha*, Rag4 in *Kluyveromyces lactis* und Hgt4 in *Candida albicans* zu einem zuckerunabhängigen, konstitutiven Signalweg führt (Betina *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006; Stasyk *et al.*, 2008). In phylogenetischen Analysen mit bekannten Zuckertransportern und –sensoren aus *U. maydis*, *S. cerevisiae* und anderen Pilzspezies gruppiert Hxt1 gemeinsam mit den genannten Sensoren innerhalb einer Untergruppe (Wahl, 2009), Abb. 6.6 im Anhang).

Es wurde vermutet, dass ein durch Hxt1 generiertes Signal zur Wachstumshemmung auf Xylose- bzw. Galactose-haltigen Medien führt. Durch den Austausch des konservierten Arginins zu Lysin in Hxt1 sollte überprüft werden, ob diese Mutation auch in *U. maydis* zu einem konstitutiven Signalweg und damit zu einem reprimierten Wachstum auf den o.g. Kohlenstoffquellen führt. Dazu wurde eine entsprechende Mutation in den ORF von *hxt1* eingebracht (R. Wahl, pers. Mitteilung) und dieser mittels des bereits für die *hxt1*-Komplementation benutzten Expressionssystems als *gfp*-Fusionskonstrukt in SG200 Δ *hxt1* eingebracht. Die GFP-Fusion diente der Expressionskontrolle und beeinflusst die native Funktion von Hxt1 nicht (siehe 2.4).

Die dabei entstandenen Stämme UDS9 (SG200 Δ *hxt1* [*P_{hxt1}*-*hxt1*(R164K)-*gfp*]^{ips}, ips: einfache Integration in den *ip*-Locus) und UDS10 (SG200 Δ *hxt1* [*P_{hxt1}*-*hxt1*(R164K)-*gfp*]^{ipm}, ipm: mehrfache Integration in den *ip*-Locus) wurden zunächst auf ihr Wachstum auf Glucose-

bzw. Galactose-haltigem Medium untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression von *hxt1(R164K)* weder auf Glucose- noch auf Galactose-haltigen Medien zur Komplementation der Wachstumsphänotypen des *hxt1*-Deletionsstamms führt. Beim Stamm UDS10 konnte dabei jeweils ein leicht reduziertes Wachstum beobachtet werden, was auf Kontrollmedium mit Saccharose jedoch nicht der Fall war (Abb. 2.7 A).

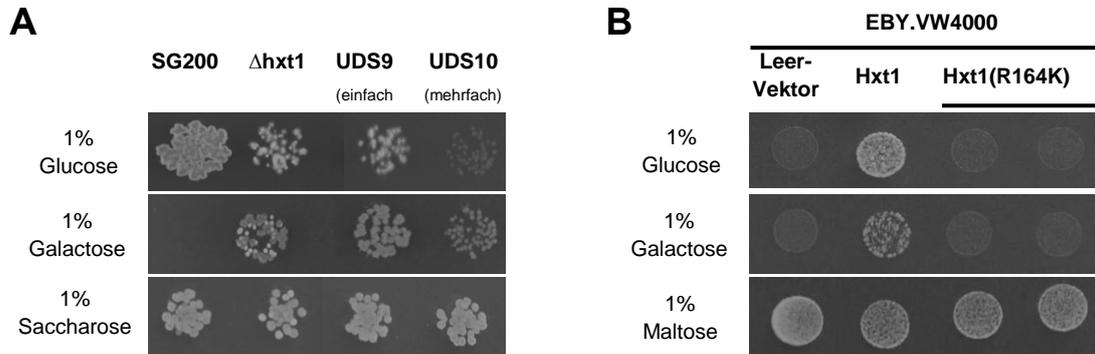


Abb. 2.7 Wachstumsanalysen mit *hxt1(R164K)*-exprimierenden *U. maydis*- und *S. cerevisiae*-Zellen (A) Definierte Zellmengen von *U. maydis* *hxt1*-Deletionsstämmen, die ein *hxt1(R164K)-gfp*-Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des *hxt1*-Promotors exprimieren, wurden auf Ammonium-Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft. Weder die einfache noch die mehrfache Integration des *hxt1(R164K)-gfp* Expressionskonstrukts in den Stämmen UDS9 bzw. UDS10 führt zu einer Komplementation des Wachstums von SG200 $\Delta hxt1$. Beobachtet wurde das Wachstum nach 3 Tagen bzw. im Fall von Galactose nach 10 Tagen. **(B)** Wachstum von *hxt1*- bzw. *hxt1(R164K)*-exprimierenden *S. cerevisiae* EBY.VW4000-Stämmen. Die Expression von *hxt1(R164K)* führt im Gegensatz zur Expression von *hxt1* nicht zu einem verbesserten Wachstum auf Glucose- oder Galactose-Medium. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Stamm mitgeführt, der den leeren Expressionsvektor trug. Gezeigt ist das Wachstum auf Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen nach 3 Tagen.

Die Vermutung, dass die Mutation zu einem Verlust der Transportfunktion führt, konnte durch die Expression im Hefestamm EBY.VW4000 (Wieczorke *et al.*, 1999) bestätigt werden. Im Gegensatz zu *hxt1* führte die Expression von *hxt1(R164K)* weder auf Glucose- noch auf Galactose-haltigem Medium zu einem verbesserten Wachstum von EBY.VW4000 (Abb. 2.7 B).

Da sich das Wachstum der *U. maydis* Stämme UDS9 und UDS10 auf Galactose-haltigem Medium nicht maßgeblich vom Phänotyp des *hxt1*-Deletionsstamms unterscheidet, scheint die Mutation nicht zu einem konstitutiven wachstumshemmenden Signal zu führen. Um Suppressormutationen auszuschließen, die durch ein konstitutives, wachstumshemmendes Signal entstehen könnten, wurde Hxt1(R164K) zusätzlich unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotors (Bottin *et al.*, 1996) im $\Delta hxt1$ -Hintergrund exprimiert. Jedoch zeigte auch dieser Stamm weder auf Glucose- (Expression reprimiert) noch auf Arabinose-haltigen Medien (Expression induziert) einen vom *hxt1*-Deletionsstamm deutlich abweichenden Phänotyp (nicht gezeigt).

Wie bereits erwähnt, führt die Deletion von *hxt1* nur zu einer leichten Beeinträchtigung der Pathogenität (vgl. Abb. 2.6 A/2.8 A, (Wahl, 2009)). Überraschenderweise hatte dagegen die mehrfache Integration des *hxt1(R164K)-gfp* Konstrukts in den *hxt1*-Deletionsstamm im resultierenden Stamm UDS10 den vollständigen Verlust der Pathogenität zur Folge. Bei der Infektion von drei unabhängigen Transformanten mit mehrfacher Integration konnte bei keiner der infizierten Pflanzen eine Tumorentwicklung beobachtet werden, stattdessen führte die Infektion ausschließlich zur Bildung von leichten Chlorosen (Abb. 2.8 B, Abb. 6.7 im Anhang). Der Stamm UDS9 mit einer einfachen Integration war dagegen etwa gleich virulent wie der *hxt1*-Deletionsstamm. Auch der Austausch des *hxt1*-ORFs gegen *hxt1(R164K)-gfp* im nativen *hxt1*-Locus führte im resultierenden Stamm UDS19 nicht zu einem apathogenen Phänotyp (Abb. 2.8 A). Expressionsanalysen zeigten, dass die mehrfache Integration des Konstrukts im *ip*-Locus in UDS10 zu einer etwa 4-fach höheren Expression führt als die Expression im *hxt1*-Locus. Durch die einfache Integration wird im Vergleich zum WT eine etwa 50% reduzierte Expression erreicht. Eine Western-Blot Analyse zeigte, dass die gemessenen Verhältnisse der Transkriptmengen mit den Proteinmengen in den Zellen korrelieren (Abb. 2.8 C). Der Verlust der Pathogenität schien daher von einer starken Expression von Hxt1(R164K) abhängig. Die entsprechende Überexpression von Hxt1(R164K) im WT-Hintergrund führte dagegen zu keiner Beeinträchtigung der Pathogenität oder des Wachstums (Abb. 6.7 im Anhang). Die Mutation hat somit keinen über das WT-Allel dominanten Effekt.

Zur näheren Untersuchung der gestörten pathogenen Entwicklung von UDS10 wurden infizierte Blätter in verschiedenen Stadien mikroskopisch untersucht. Zur Visualisierung der Pilzhyphen wurden diese mit WGA-AF488 gefärbt. Dabei konnte festgestellt werden, dass UDS10 noch in der Lage ist, Appressorien auszubilden und die Pflanze zu penetrieren. Es konnte jedoch weder zwei noch sieben Tage nach Infektion eine Ausbildung von Schnallenzellen beobachtet werden, die charakteristisch für die Proliferation in der Pflanze sind (Scherer *et al.*, 2006). SG200 Δ *hxt1* zeigte dagegen 2 Tage nach Infektion entsprechend dem WT lange biotrophe Hyphen mit Schnallenzellen (Abb. 2.9 A, 7 dpi nicht gezeigt).

Durch die mikroskopische Untersuchung von UDS8 (SG200 Δ *hxt1* [*P_{hxt1}-hxt1-gfp*]^{*ipm*}) und UDS10 (SG200 Δ *hxt1* [*P_{hxt1}-hxt1(R164K)-gfp*]^{*ipm*}) einen Tag nach Infektion konnte gezeigt werden, dass die Lokalisierung von Hxt1(R164K)-GFP in der zellulären Peripherie und den Vakuolen zum Zeitpunkt des Abbruchs der pathogenen Entwicklung von UDS10 im Vergleich zu Hxt1-GFP nicht verändert ist (Abb. 2.9 B).

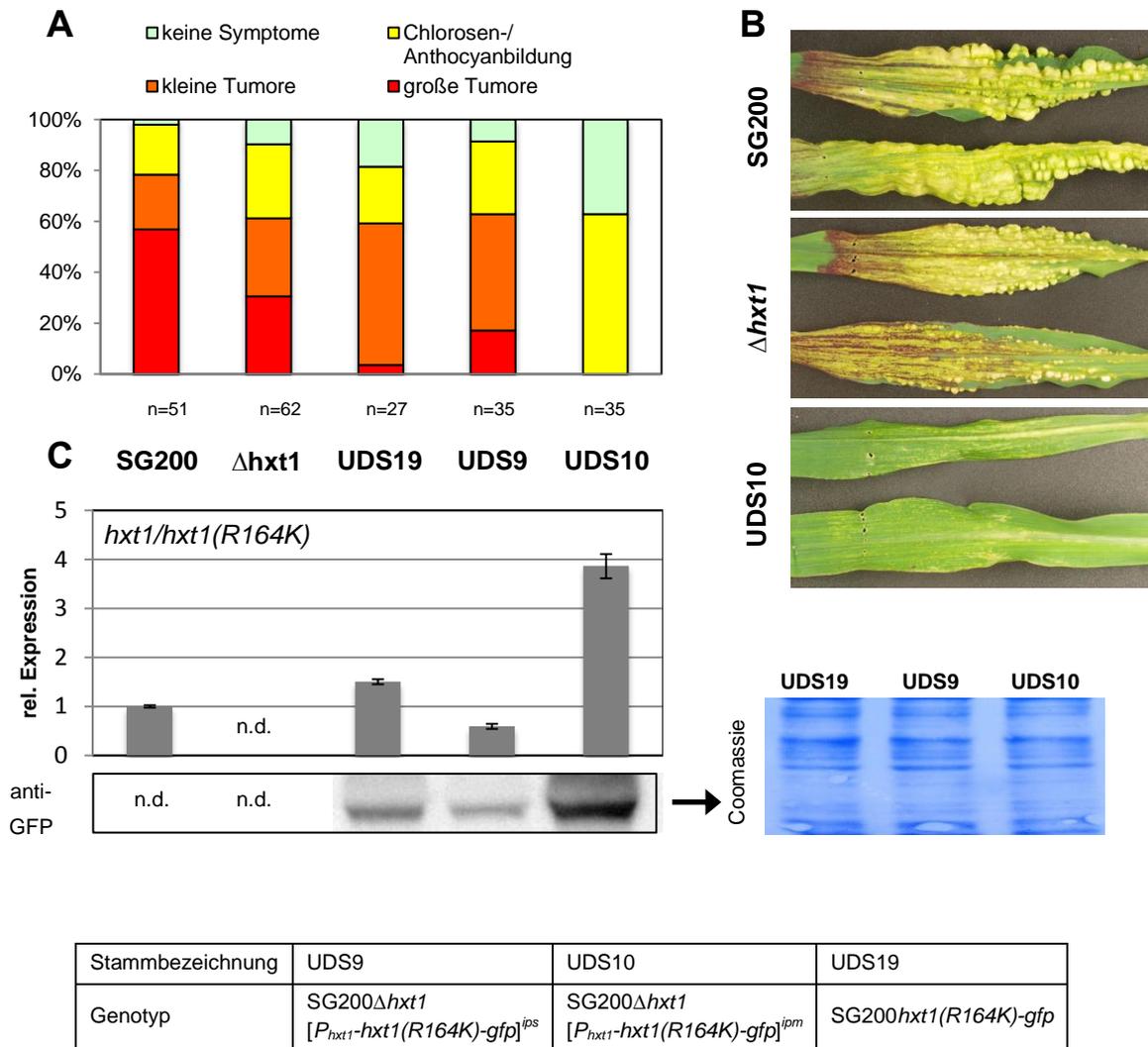


Abb. 2.8 Einfluss der Expression von *hxt1(R164)K* auf die pathogene Entwicklung. (A) Die Pathogenität der angegebenen Stämme wurde sieben Tage nach Injektion von Maiskeimlingen durch die Bewertung der Krankheitssymptome untersucht. Die mehrfache Integration des *hxt1(R164K)-gfp* Expressionskonstrukts im *hxt1*-Deletionsstamm führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität (UDS10). Bei der einfachen ektopischen Integration (UDS9) oder einer Integration in den nativen Locus von *hxt1* (UDS19) ist dies nicht der Fall. Die Zahl der untersuchten Pflanzen ist durch n angegeben. (B) Infektionssymptome hervorgerufen durch SG200, SG200 $\Delta hxt1$ und UDS10, sieben Tage nach Injektion. (C) Bestimmung der relativen Transkript- und Proteinmengen von *hxt1* bzw. *hxt1(R164K)* durch qRT-PCR bzw. eine semi-quantitative Western-Analyse. Die relative Expression in den Stämmen korreliert mit den relativen Proteinmengen des Hxt1(R164K)-GFP Fusionsproteins. Diese wurden in den Stämmen UDS9, UDS10 und UDS19 durch Verwendung eines anti-GFP Antikörper detektiert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Aktin (*um11232*) und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b um04869*) als Referenzgene. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus drei technischen Replikaten dar. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. n.d.: nicht detektiert. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge wurde die Membran nach der Western-Analyse mit Coomassie-Färbelösung gefärbt.

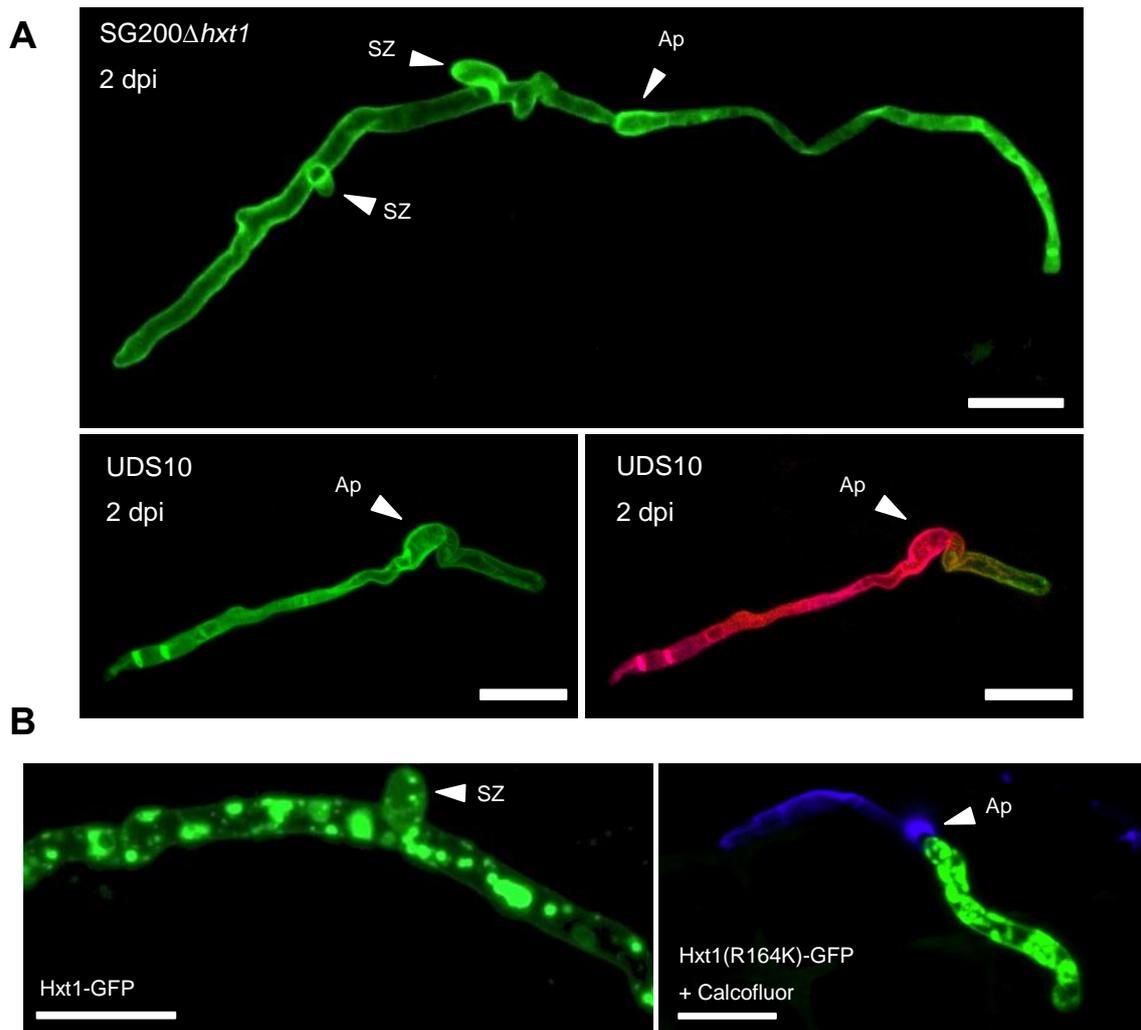


Abb. 2.9 Konfokalmikroskopische Beobachtung des Wachstums von SG200Δ*hxt1* und UDS10 auf und innerhalb der Pflanze.

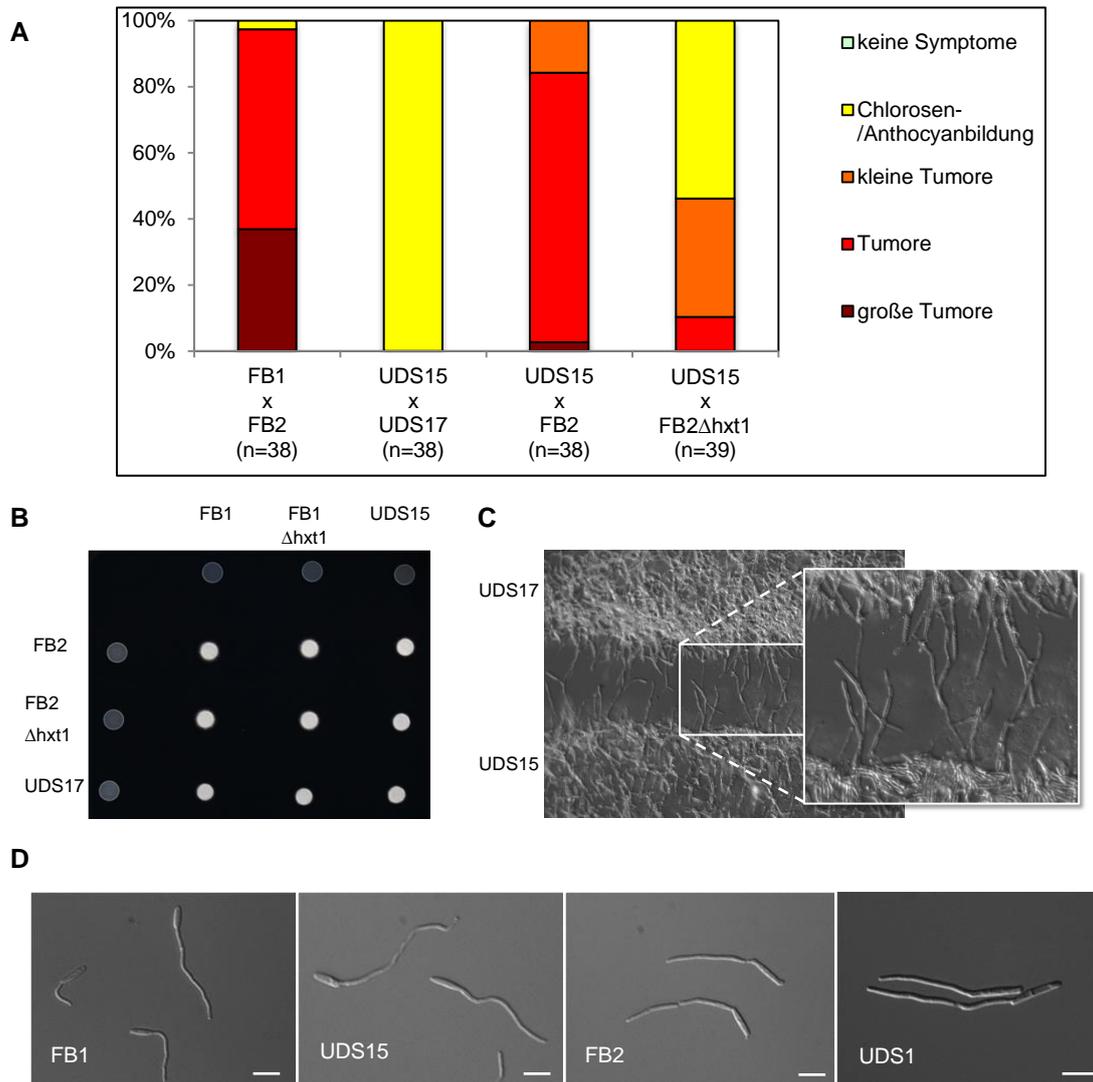
(A) Die Morphologie der Hyphen wurde zwei Tage nach Injektion durch eine WGA-AF488 Färbung von infiziertem Pflanzenmaterial konfokalmikroskopisch untersucht. Beim pathogenen Stamm SG200Δ*hxt1* kommt es nach der Penetration der Pflanzenoberfläche an der Stelle des Appressoriums (Ap) zur Ausbildung von Schnallenzellen (SZ). Der apathogene Stamm UDS10 ist ebenfalls zur Ausbildung eines Appressoriums und zur Penetration in der Lage, Schnallenzellen konnten jedoch in keinem Fall beobachtet werden. Die erfolgreiche Penetration der Pflanze an der Stelle des Appressoriums wurde durch die beobachtete Änderung der Wachstumsrichtung um etwa 90° bestätigt. Dies ist im rechten unteren Bild durch eine farbkodierte Darstellung der Z-Achse gezeigt. **(B)** Lokalisierung von Hxt1-GFP bzw. Hxt1(R164K)-GFP während des Wachstums innerhalb der Pflanze. Gezeigt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von infiziertem Pflanzenmaterial 1 dpi. Das Wachstum der Hyphen innerhalb der Pflanze wird durch die Anwesenheit einer Schnallenzelle (SZ) bzw. durch die Calcofluor-Färbung des Appressoriums und der leeren Hyphenkompartimente gezeigt, da Calcofluor nur Strukturen auf der Pflanzenoberfläche färbt. Sowohl Hxt1-GFP als auch Hxt1(R164K)-GFP lokalisieren entlang des Hyphen-Cortex sowie in den Vakuolen. Die Mutation hat daher im Stadium, in dem es zum Abbruch der pathogenen Entwicklung von UDS10 kommt, keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Hxt1. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm. Die Bilder wurden durch eine Maximum-Projektion von Z-Stapeln generiert.

2.6 Die Überexpression von Hxt1(R164K) führt nicht zur Beeinträchtigung der Paarungskompetenz

Die Initiation der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* wird von einem komplexen regulatorischen Netzwerk gesteuert. An dessen Anfang steht die Erkennung kompatibler Paarungspartner durch das im *a*-Locus kodierte Pheromon-/Pheromonrezeptorsystem, jedoch spielt der *a*-Signalweg auch nach der Paarung noch eine wichtige Rolle bei der Initiation der pathogenen Entwicklung (Bölker *et al.*, 1992; Heimel *et al.*, 2010a). Der zentrale Regulator des *a*-Signalwegs ist der Transkriptionsfaktor Prf1. Dieser wird als Folge der Pheromon-Perzeption posttranskriptionell über zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) und eine MAPK-Kaskade reguliert (Kaffarnik *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2006). Eine transkriptionelle Regulation erfolgt u.a. über cis-regulatorische Elemente im *prf1*-Promotor, über die Umweltsignale wie Glucose in die Regulation einbezogen werden (siehe Abb. 1.2; Hartmann *et al.*, 1999). Ein entsprechender Rezeptor für diese Umweltsignale ist jedoch bisher nicht bekannt. Es sollte daher untersucht werden, ob Hxt1 als putativer Sensor einen Einfluss auf die Regulation des *a*-Signalwegs und damit auf die Paarungskompetenz hat und ob die eingebrachte Mutation über diesen Weg zum Pathogenitätsverlust führt.

In den bisherigen Experimenten war die Mutation nur im Hintergrund des solopathogenen Stamms SG200 untersucht worden. Für die Paarungstests wurden daher die analogen, nicht solopathogenen Stämme UDS15 (*a1b1 Δhxt1 hxt1(R164K)-gfp*) und UDS17 (*a2b2 Δhxt1 hxt1(R164K)-gfp*) generiert. Beide Stämme enthalten wie der apathogene Stamm UDS10 eine mehrfache Integration des *hxt1(R164K)-gfp* Konstrukts im *hxt1*-Deletionshintergrund, müssen aber mit einem kompatiblen Partner fusionieren um ein infektiöses Dikaryon zu bilden.

Infektionen mit Mischungen von UDS15 und UDS17 führten entsprechend den Ergebnissen mit dem solopathogenen Stamm nicht zur Ausbildung von Tumoren. Die Kreuzung von UDS15 mit dem kompatiblen Wildtypstamm FB2 (*a2b2*) zeigte dagegen eine nur leicht reduzierte Pathogenität gegenüber der Kreuzung der beiden WT-Stämme (Abb. 2.10 A). Dies bestätigt vorangegangene Ergebnisse, wonach die Mutation nicht dominant über ein WT-Allel von *hxt1* ist (s.o. und Abb. 6.7 im Anhang). Die Infektion mit der Kreuzung von UDS15 und FB2 Δ *hxt1* führte zur Bildung weniger kleinerer Tumore und war somit nicht vollständig apathogen. Dies könnte auf die theoretisch um die Hälfte reduzierte Expression von *hxt1(R164K)* im Dikaryon zurückzuführen sein und somit belegen, dass nur eine starke Expression von *hxt1(R164K)* zum vollständigen Verlust der Pathogenität führt.



Stammbezeichnung	UDS15	UDS17
Genotyp	<i>a1b1 Δhxt1 [hxt1(R164K)-gfp]^{prom}</i>	<i>a2b2 Δhxt1 [hxt1(R164K)-gfp]^{prom}</i>

Abb. 2.10 Die Überexpression von *hxt1(R164K)* hat keinen Einfluss auf die Paarungskompetenz.

(A) Bewertung der Pathogenität von Kreuzungen *hxt1(R164K)* überexprimierender Stämme. Eine Kreuzung der Stämme UDS15 (*a1b1 Δhxt1 hxt1(R164K)-gfp*) und UDS17 (*a1b1 Δhxt1 hxt1(R164K)-gfp*) führte zum Verlust der Tumorbildung. Eine Kreuzung von UDS15 mit dem WT FB2 oder dem entsprechenden *hxt1*-Deletionsstamm führte zu einer reduzierten Ausbildung von Symptomen im Vergleich zur Infektion mit den WT-Stämmen FB1 und FB2. (B) Paarungstest auf Aktivkohle-haltigem Medium. Ein filamentöses Wachstum in gemischten Kolonien zeigte eine erfolgte Paarung bei allen Kombinationen. (C) Pheromoninduktion führte nach 5h bei UDS15 und UDS17 wie bei den WT-Stämmen zur Ausbildung von Konjugationshyphen. (D) Ein Konfrontationstest von UDS15 mit UDS17 zeigte, dass die beiden Stämme sich gegenseitig zur Induktion von Konjugationshyphen stimulieren können.

Zusätzlich zu den Infektionen wurden verschiedene paarungsbezogene Tests in axenischer Kultur durchgeführt. Dazu wurden Sporidien-Suspensionen aus Stämmen mit kompatiblen Paarungstyp-Loci auf aktivkohlehaltiges Medium getropft. Das filamentöse Wachstum der Stämme in den gemischten Kolonien weist auf eine erfolgreiche Paarung hin. Nach einer fünfstündigen Induktion mit künstlichem Pheromon wurde die Ausbildung von Konjugationshyphen beobachtet, was eine erfolgreiche Pheromon-Perzeption zeigt. In einem Konfrontationstest wurde zudem überprüft, ob die Stämme die Ausbildung von Konjugationshyphen bei kompatiblen Paarungspartnern stimulieren können. Diese wurden dazu in einem sehr geringen Abstand zueinander auf einen Agar-beschichteten Objektträger getropft, mit Paraffinöl überdeckt und nach fünfstündiger Inkubation mikroskopisch untersucht. Bei keinem dieser Tests zeigten die Stämme UDS15 und UDS17 eine von WT-Stämmen abweichende Reaktion (Abb. 2.10 B-D). Die Überexpression von *hxt1(R164K)* beeinträchtigt die pathogene Entwicklung somit nicht bereits bei der Paarung sondern wohl erst in den darauf folgenden Stadien.

2.7 Charakterisierung weiterer mutierter *hxt1*-Allele

Zur Identifizierung weiterer Faktoren, die bei der Hxt1-abhängigen Wachstums-Inhibition durch Galactose eine Rolle spielen, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit ein Mutagenese-Screen durchgeführt, bei dem Mutanten mit verbessertem Wachstum auf Galactose-haltigen Medien isoliert wurden. Ziel des Screens war die Identifizierung weiterer Komponenten eines putativen Hxt1-Signalwegs, deren Mutation ein verbessertes Wachstum auf Galactose-haltigem Medium bewirkt. In einem ersten Durchgang konnten etwa 70 Mutanten mit Mutationen im *hxt1*-Gen identifiziert werden. Drei der Mutationen führten dabei zum Austausch einer einzelnen Aminosäure in Hxt1 (Dillner, 2012). Da Punktmutationen, die zum Funktionsverlust führen, Rückschlüsse auf funktionelle Domänen erlauben, wurden diese *hxt1*-Varianten näher charakterisiert. Im Folgenden werden sie den Aminosäure-Substitutionen entsprechend *hxt1(W407C)*, *hxt1(S222L)* und *hxt1(E412K)* genannt.

Zur weiteren Analyse der Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion von Hxt1 wurden die drei *hxt1*-Varianten analog zu den vorangegangenen Komplementationen mit *hxt1* bzw. *hxt1(R164K)* als GFP-Fusionskonstrukte in den *ip*-Locus von *SG200Δhxt1* eingebracht. Es wurden jeweils nur Stämme mit mehrfacher Integration untersucht. Da die C-terminale Fusion von GFP hauptsächlich der Expressionskontrolle diene und die Funktion von Hxt1 in *U. maydis* nicht beeinträchtigt (vgl. Abb. 2.6), wird sie im folgenden Abschnitt der Einfachheit halber bei den Konstruktbeschreibungen nicht mehr erwähnt.

Durch Wachstumstests konnte zunächst bestätigt werden, dass durch die Expression der drei *hxt1*-Varianten das verbesserte Wachstum des *hxt1*-Deletionsstamms auf Medium mit

Galactose nicht aufgehoben wurde, wie das bei einer mehrfachen Integration von *hxt1* ohne Mutation oder beim SG200 WT der Fall war (vgl. Abb. 2.6 A). Auf Glucose-, Fructose- und Mannose-haltigen Medien konnte das Wachstum des *hxt1*-Deletionsstamms nur durch die Expression von *hxt1(W407C)* verbessert werden (Abb. 6.8 im Anhang). Die Expression der *hxt1*-Varianten im *S. cerevisiae* Stamm EBY.VW4000 zeigte, dass auch in Hefe nur *hxt1(W407C)* noch zum Transport von Hexosen fähig ist (Abb. 6.9 im Anhang).

Zum vollständigen Verlust der Pathogenität wie im Fall von *hxt1(R164K)* führte nur die Überexpression von *hxt1(S222L)*. Die beiden anderen Varianten hatten dagegen keinen Einfluss auf die Virulenz des Ausgangsstamms SG200 Δ *hxt1* (Abb. 6.10 im Anhang). Zur besseren Übersicht sind die Phänotypen in tabellarischer Form in Tab. 2.3 zusammengefasst. Daraus sollen folgende zwei Punkte hervorgehoben werden:

- 1.) Sowohl die Überexpression von *hxt1(R164K)* als auch von *hxt1(S222L)* führen zum Verlust der Pathogenität. Beide Mutationen haben ebenfalls den Verlust der Transportfunktion zur Folge.
- 2.) *Hxt1(E412K)* scheint ebenfalls die Fähigkeit zum Transport von Hexosen verloren zu haben. Im Gegensatz zu *hxt1(R164K)* und *hxt1(S222L)* beeinträchtigt die Überexpression von *hxt1(E412K)* jedoch nicht die Pathogenität.

Der apathogene Phänotyp scheint daher nicht allein durch die Überexpression eines Proteins ohne Transportfunktion verursacht zu werden, sondern spezifisch mit dem Austausch der Aminosäuren Arg164 bzw. Ser222 assoziiert zu sein. Eine topologische Vorhersage der Transmembrandomänen von *Hxt1* in der Plasmamembran zeigt, dass diese beiden Aminosäuren in enger räumlicher Nähe zueinander auf der zytoplasmatischen Seite der Membran liegen (Abb. 2.11).

Tab. 2.3 Zusammenfassung der durch die Expression der *hxt1*-Varianten verursachten Phänotypen. Gezeigt ist ein relativer Vergleich der Phänotypen bezüglich des Wachstums bzw. der Pathogenität, die durch die (Über-) Expression verschiedener *hxt1*-Varianten in *SG200Δhxt1* bzw. im Hefestamm *EBY.VW4000* beobachtet werden konnten. Zum Vergleich sind zusätzlich die Phänotypen des *hxt1*-Deletionsstamms bzw. der Transformation des Leervektors in *EBY.VW4000* angegeben. Die Angaben zum Wachstum sind jeweils in Relation zueinander zu verstehen und sollen lediglich einen Überblick verschaffen. Dabei können die Symbole folgendermaßen interpretiert werden: „-“: schlechter, „+“: besser. Die den Angaben zugrunde liegenden Daten finden sich im Anhang unter Abb. 6.8 - 6.10.

	$\Delta hxt1$ / Leervektor	<i>hxt1</i>	<i>hxt1</i> (R164K)	<i>hxt1</i> (W407C)	<i>hxt1</i> (S222L)	<i>hxt1</i> (E412K)
Wachstum auf Galactose	+	-	+/-	+/-	+	+
Wachstum auf Glucose, Fructose, Mannose	-	+	-	+	-	-
Pathogenität	+	+++	-	+	-	+
Transport in Hefe	-	+	-	+	-	-

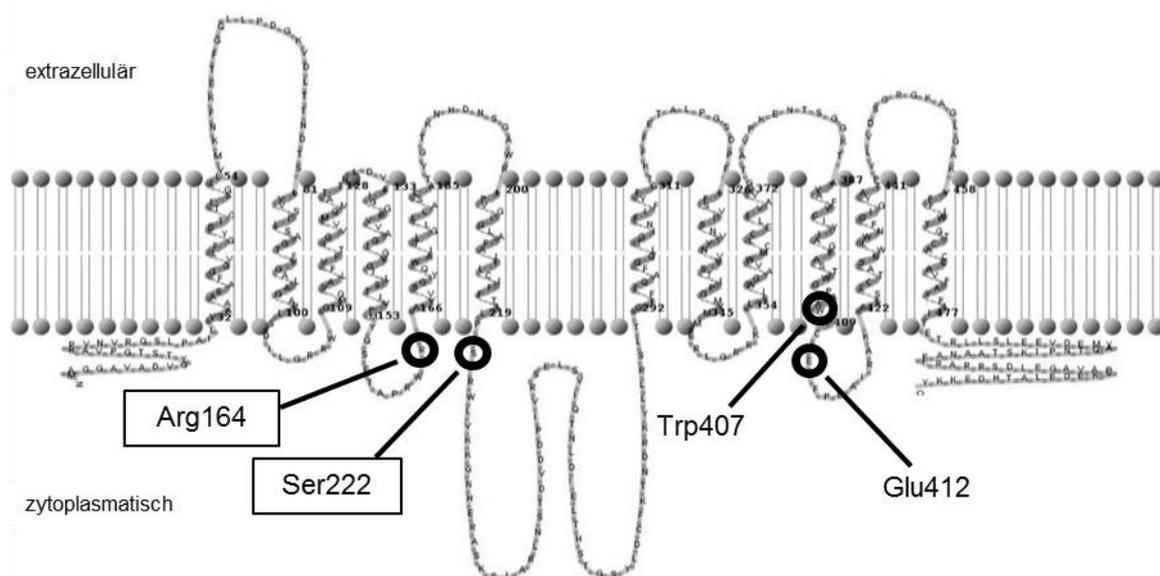


Abb. 2.11 Topologische Vorhersage der Transmembrandomänen von Hxt1 in der Plasmamembran. Aminosäuren deren Mutation zu einem verbesserten Wachstum auf Galactosehaltigen Medien führt sind durch Kreise markiert. Die Namen der Aminosäuren deren Mutation zusätzlich bei Überexpression des jeweiligen Gens zum Verlust der Pathogenität führt sind schwarz umrandet (vgl. Tab. 2.3). Zur Vorhersage der Topologie wurde TMRPres2D verwendet (Spyropoulos *et al.*, 2004).

2.8 Differenzielle Genregulation in Folge der Überexpression von *hxt1(R164K)*

Durch die bis hier beschriebenen Ergebnisse konnte der durch die Überexpression von *hxt1(R164K)* bzw. *hxt1(S222L)* hervorgerufene Verlust der Pathogenität nicht plausibel erklärt werden. Sie lassen jedoch nach wie vor die Möglichkeit eines Defekts in einem unbekanntem Signalweg offen, an dessen Spitze Hxt1 als Sensor fungiert. Da der Defekt eines Signalwegs sich im Allgemeinen auf die Regulation nachgeschalteter Gene auswirkt, wurden Transkriptomanalysen zur Identifizierung von potentiellen Zielgenen durchgeführt.

2.8.1 Die Überexpression von *hxt1(R164K)* beeinflusst die Glucose-abhängige Regulation von Genen in axenischer Kultur

In Vorexperimenten sollte zunächst überprüft werden, ob die Überexpression von *hxt1(R164K)* in axenischer Kultur einen Einfluss auf die Expression kohlenhydratabhängig regulierter bzw. pathogenitätsrelevanter Gene hat. Dazu wurden die Stämme SG200, SG200 Δ *hxt1* und UDS10 (SG200 Δ *hxt1* [*P_{hxt1}-hxt1(R164K)-gfp*]^{ipm}) für 6h in Minimalmedium mit entweder 1% Glucose oder ohne Zusatz von Zucker inkubiert und anschließend die Expression der Gene *bE*, *mfa1* und *um05033* untersucht (Abb. 2.12).

Das Gen *bE1* kodiert für eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors bE/bW, der einen zentralen Regulator für die Expression pathogenitätsrelevanter Gene darstellt (Heimel *et al.*, 2010b). Im WT SG200 war die Expression von *bE1* in Anwesenheit von Glucose reprimiert und in Abwesenheit etwa 30fach induziert. Eine ähnliche Regulation von *bE* wurde im *hxt1*-Deletionsstamm beobachtet. Im apathogenen Stamm UDS10 wurde dagegen kaum ein Unterschied der *bE*-Expression unter den gewählten Bedingungen beobachtet. Für den im *a*-Paarungstyp Locus kodierten Pheromon-Vorläufer *Mfa1* ist bekannt, dass seine Expression durch Glucose induziert wird (Hartmann *et al.*, 1999). Diese Induktion konnte in allen drei untersuchten Stämmen beobachtet werden, fiel jedoch in UDS10 deutlich geringer aus. Das für einen putativen Zuckertransporter kodierende Gen *um05033* konnte durch die Analyse früherer Transkriptom-Daten aus Wahl, 2009 als potentiell *hxt1*-abhängig reguliert identifiziert werden. Die qRT-PCR Analysen zeigten, dass die Expression von *um05033* in SG200 und SG200 Δ *hxt1* bei Anwesenheit von Glucose reprimiert und bei Abwesenheit etwa 30- bis 40-fach induziert ist. Ähnlich wie bei der Expression von *bE* scheint diese Glucose-abhängige Regulation in UDS10 dahingehend gestört zu sein, dass sowohl Repression als auch Induktion niedriger ausfallen, was wiederum zu einer nur 2- bis 3-fach erhöhten Expression bei Abwesenheit von Glucose führt.

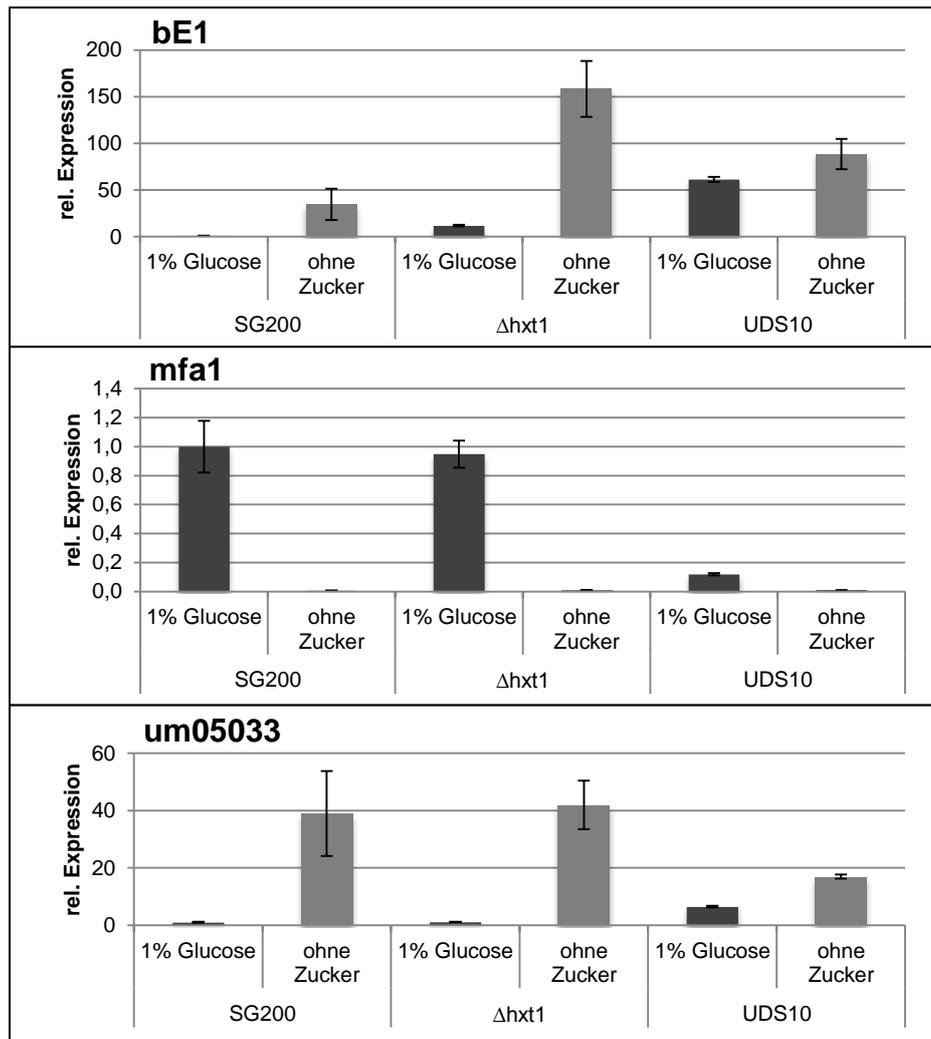


Abb. 2.12 Effekt der Überexpression von *hxt1(R164K)* auf die Regulation zuckerabhängig regulierter Gene. Untersucht wurde die Genexpression durch qRT-PCR nach 6 h in Glutamin-Minimalmedium mit 1% Glucose bzw. ohne Zucker. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von Aktin (*um11232*) und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b um04869*) als Referenzgene.

Diese Beispiele zeigen, dass die Glucose-abhängige Regulation einiger, u.a. pathogenitätsrelevanter Gene im Stamm UDS10 im Vergleich sowohl zum WT als auch dem *hxt1*-Deletionsstamm verändert ist. Da für das erfolgreiche Durchlaufen der initialen pathogenen Phase eine genau abgestimmte Regulation der Gene der *a*- und *b*-Paarungstyp Loci notwendig ist und diese wahrscheinlich zusätzlich durch Pflanzen- und Umweltsignale beeinflusst wird (Heimel *et al.*, 2010a; Wahl *et al.*, 2010b), könnte die beobachtete divergente Regulation von *bE1* und *mfa1* im Stamm UDS10 auf ein modifiziertes Hxt1-Signal hindeuten, welches zum Abbruch der pathogenen Entwicklung führt.

2.8.2 Transkriptomanalysen der frühen Infektionsphase von UDS10

Die in Folge der Überexpression von *hxt1(R164K)* veränderte Genregulation in axenischer Kultur deutete bereits einen Zusammenhang mit dem apathogenen Phänotyp an. Transkriptomanalysen der frühen Infektionsphase sollten weitere Hinweise auf den Grund des Abbruchs der pathogenen Entwicklung von UDS10 geben. Da der Entwicklungstopp von UDS10 bereits direkt nach der Penetration der Pflanze eintritt, wurde eine RNA Isolation von der Pflanzenoberfläche durchgeführt. Das infizierte Blattmaterial als Gesamtes ist in den frühen Infektionsphasen aufgrund des hohen Hintergrunds von pflanzlicher RNA nicht zur Isolation pilzlicher RNA geeignet. Daher wurden die *U. maydis* Zellen mit Hilfe von Flüssiglatex 20-24 h nach Inokulation der Pflanzen von der Blattoberfläche isoliert. Zur Kontrolle wurden dabei neben UDS10 auch die beiden Stämme SG200 und SG200 Δ *hxt1* mitgeführt.

Da sowohl SG200 als auch SG200 Δ *hxt1* die frühe Infektionsphase erfolgreich durchlaufen und im späteren Verlauf Tumore induzieren können, wurde nach Genen gesucht, die in UDS10 im Vergleich zu beiden Stämmen differenziell reguliert sind. Durch eine vergleichende Analyse konnten 153 Gene identifiziert werden, die in UDS10 im Vergleich zu beiden Stämmen (SG200 und SG200 Δ *hxt1*) mindestens 1,5-fach dereguliert waren. Die stärksten Expressionsänderungen wurden im Vergleich zu SG200 beobachtet und reichten dabei von 26,6-fach reprimiert bis zu 5,1-fach induziert. Durch eine hierarchische Cluster-Analyse der 153 Gene wurden Untergruppen erstellt, die in UDS10 im Vergleich mit den beiden anderen Stämmen reprimiert (Cluster 1 & 2) bzw. induziert (Cluster 3) sind (Abb. 2.13). Zusätzlich wurden die Cluster mit Hilfe des FunCats-Servers (mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/) auf Anreicherungen funktioneller Kategorien untersucht (Tab. 2.4). Listen der Cluster mit Expressionswerten der Gene finden sich im Anhang in den Tabellen 6.4 - 6.6.

Cluster 1 (in SG200 induziert, Δ *hxt1* reprimiert, UDS10 weiter reprimiert)

Unter den 23 Genen in Cluster 1 befinden sich die im Vergleich zu SG200 am stärksten reprimierten Gene. Alle Gene in diesem Cluster waren jedoch auch in SG200 Δ *hxt1* im Vergleich zu SG200 reprimiert und wurden in UDS10 noch schwächer exprimiert. Bis auf drei Ausnahmen (*um10609*, putativer mitochondrieller Citrat-Transporter; *um01829*, Arabinofuranosidase-Vorläufer; *um10608*, Quinat Permease) konnten diese Gene bei der FunCats-Analyse nur der Kategorie „unclassified proteins“ zugeordnet werden. 19 von 20 Proteinen, die von diesen Genen kodiert werden, sind in der *Ustilago maydis* Genomdatenbank laut einer TargetP-Prognose (Emanuelsson *et al.*, 2000) als wahrscheinlich sekretiert annotiert und könnten somit putative Effektoren darstellen.

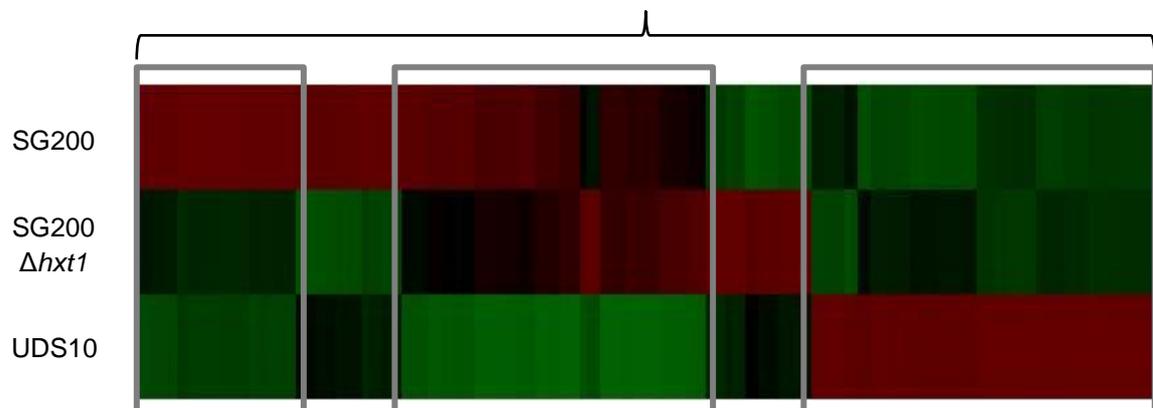


Abb. 2.13 Cluster-Analyse der in UDS10 differenziell regulierten Gene. Gezeigt ist ein relativer Vergleich der Expression, welche durch die Farbabstufungen von Rot (=induziert) bis Grün (reprimiert) dargestellt wird. Als Grundlage für die Analyse dienten Gene, die in UDS10 nach 24h auf der Pflanzenoberfläche im Vergleich zu SG200 und SG200 $\Delta hxt1$ mindestens 1,5-fach dereguliert waren.

Tab. 2.4 Einordnung der in UDS10 deregulierten Gene in funktionelle Kategorien. Die Angabe der Cluster bezieht sich auf Abb. 2.13. Die Analyse auf Anreicherungen funktioneller Kategorien erfolgte mit Hilfe des FunCats-Servers (mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/).

Cluster	Anzahl Gene	Regulation in UDS10	Funktionelle Kategorien	Übereinstimmungen	P-Value
1	24	1,5 fach - 26,5 fach reprimiert	unclassified Proteins	21 (87,5%)	8,17E-08
2	46	1,5 fach - 6,8 fach reprimiert	Metabolism	36 (80%)	2,31E-08
			C-compound an carbohydrate metabolism	30 (66,6%)	7,91E-13
			lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	16 (35,5%)	6,18E-05
			secondary metabolism	15 (33,3%)	3,30E-07
			extracellular metabolism	4 (8,9%)	1,02E-04
			cellular transport, Transport facilities and transport routes	25 (55,5%)	4,94E-0,5
3	51	1,5 fach - 5,1 fach induziert	detoxification	10 (20%)	1,31E-04
			peroxisome	5 (10%)	2,25E-04

Drei der Gene sind in Gen-Clustern sekretierter Proteine kodiert, von denen bekannt ist, dass die Deletion der gesamten Gen-Cluster zu einer Reduktion der Virulenz führt (*um03752* in Cluster 5A, *um05294* und *um05296* in Cluster 19A in (Kämper *et al.*, 2006). Des Weiteren finden sich unter den reprimierten Genen aus Cluster 1 die Gene *um01987* und *um01695*, welche für die sekretierten, pathogenitätsrelevanten Proteine Pep1 und Pst1 kodieren (Doehlemann *et al.*, 2009; M. Vranes, nicht publiziert).

Die Expression von 15 der 23 Gene in Cluster 1 (darunter auch *pep1* und *pst1*) ist zudem nach einer künstlichen Induktion des C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Biz1 induziert (M. Vranes, pers. Mitteilung). Biz1 ist essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*. Die Deletion von *biz1* führt zu einer reduzierten Appressorienbildung bzw. im Fall von Hyphen, welche Appressorien ausbilden, zu einem Arrest der pathogenen Entwicklung nach dem Eintritt in die Pflanze (Flor-Parra *et al.*, 2006). Die Expression von *biz1* selbst war in UDS10 jedoch nicht signifikant beeinträchtigt (-1,48-fach vs. SG200; +1,17-fach vs. SG200 Δ *hxt1*).

Cluster 2 (in SG200 & Δ *hxt1* induziert, UDS10 reprimiert)

Von den 46 Genen in Cluster 2 konnten 36 bzw. 25 den funktionellen Kategorien „Metabolism“ und „Cellular Transport“ zugeordnet werden. Innerhalb der Kategorie „Metabolism“ waren die Unterkategorien „C-Compound and carbohydrate metabolism“ (30 Gene), „lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism“ (16 Gene), „secondary metabolism“ (15 Gene) und „extracellular metabolism“ (4 Gene) signifikant vertreten. Unter den am stärksten reprimierten Genen aus Cluster 2 (mind. 2-fach im Vergleich zu SG200 und SG200 Δ *hxt1*) befanden sich Gene für eine potentielle Myo-Inositol Oxygenase (*um00029*), zwei Aldo-Keto-Reduktasen (*um11944* und *um10104*), eine Aldose-1-Epimerase (*um10248*), eine putative Beta-Galactosidase (*um02204*) sowie für drei putative Hexosetransporter (*um10072*, *um06076* und *um05033*). Die Analyse von Transkriptomdaten einer Arabinose-Induktion mit dem *U. maydis* Stamm AB32, der in der Studie als Kontrollstamm verwendet wurde (Heimel *et al.*, 2010b) zeigte außerdem, dass fast alle der o.g. Gene in Glucose-haltigem Medium reprimiert sind und nach dem Wechsel in Arabinose-haltiges Medium induziert werden (Abb. 6.11 im Anhang). Die Glucose-abhängige Expression der Gene und ihre putative Funktion in alternativen Stoffwechselwegen bzw. als Transporter macht sie zu potentiellen Zielgenen der Glucose-Repression. Somit könnte die Überexpression von Hxt1(R164K) zu einer verstärkten Glucose-Repression führen.

Cluster 3 (SG200 & $\Delta hxt1$ reprimiert, UDS10 induziert)

In Cluster 3 fanden sich 51 Gene deren Expression in UDS10 im Vergleich zu SG200 und SG200 $\Delta hxt1$ induziert ist. Darunter konnte nur für die funktionellen Kategorien „Detoxification“ und „Peroxisome“ eine signifikante Anreicherung festgestellt werden, wobei diese mit 10 bzw. 5 Genen (20% bzw. 10%) nicht sehr stark vertreten waren (Tab. 2.4). 19 der 51 Gene haben keine Annotation und konnten keiner funktionellen Kategorie zugeordnet werden. Eine Anreicherung von sekretierten Proteinen in dieser Gruppe wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Gene, die nicht innerhalb der Cluster 1-3 liegen, zeigen in UDS10 Expressionswerte, welche zwischen denen von SG200 und SG200 $\Delta hxt1$ liegen. Da sowohl SG200 als auch SG200 $\Delta hxt1$ die Pflanze infizieren können, wurde es als unwahrscheinlich erachtet, dass die Expressionsänderungen dieser Gene zu dem apathogenen Phänotyp führen. Innerhalb dieser Gruppen wurden keine Gene mit einem bekannten Bezug zur pathogenen Entwicklung gefunden und auch eine Analyse der funktionellen Kategorien ergab keine Auffälligkeiten (nicht gezeigt).

2.9 Untersuchung der Hxt1-abhängigen Wachstumsinhibition durch Galactose

Das verbesserte Wachstum von *hxt1*-Deletionsstämmen auf Medien mit Xylose oder Galactose als einziger Kohlenstoffquelle hatte zu der Vermutung geführt, Hxt1 könne neben der bereits in Hefe charakterisierten Transportfunktion eine zusätzliche Funktion als Sensor besitzen (Wahl, 2009). Es war jedoch nicht klar, ob Hxt1 dabei die Anwesenheit von Xylose bzw. Galactose oder die Abwesenheit von Glucose wahrnehmen kann oder ob die beobachteten Phänotypen von einer Sensorfunktion unabhängig und nur durch die Transportfunktion von Hxt1 bedingt sind. Daher sollte der Zusammenhang der Wachstumsinhibition mit der putativen Sensorfunktion genauer untersucht werden.

Das unterschiedliche Wachstum der WT- und $\Delta hxt1$ -Stämme auf Medien mit Xylose als einziger Kohlenstoffquelle ist von den im Medium enthaltenen Stickstoffquellen abhängig. So konnte der Phänotyp auf Medien mit komplexeren Stickstoffquellen wie CM-Vollmedium oder Glutamin-Minimalmedium beobachtet werden, auf Ammonium-Minimalmedium (AM) war jedoch kaum ein Wachstumsunterschied auszumachen (nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass ein beobachtetes Wachstum auf der Energiegewinnung aus dem Kohlenstoff von Aminosäuren oder auf Wechselwirkungen mit dem Aminosäurestoffwechsel beruht, wurde für weitere Wachstumstests AM verwendet. Bei den weiteren Untersuchungen lag die

Galactose-vermittelte Inhibition des Wachstums im Fokus, die unabhängig von der Stickstoffquelle auf allen Medien zu beobachten war.

Das Wachstum der $\Delta hxt1$ -Stämme auf Minimalmedium mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle ist sehr viel langsamer als auf Medien mit präferierten Kohlenhydraten wie z.B. Glucose oder auch Saccharose. Während dieses standardmäßig nach 3 Tagen beobachtet wurde, wurden Wachstumstests mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle im Medium erst nach 5 oder 10 Tagen ausgewertet. Beim Wachstum in flüssigem Minimalmedium konnte im Fall von Galactose als einziger Kohlenstoffquelle innerhalb von zwölf Stunden keine Änderung der optischen Dichte der Kultur gemessen werden (nicht gezeigt). Daher wurden die Versuche zum Wachstum in Anwesenheit von Galactose auf Festmedium durchgeführt.

Galactose wirkte sich in den Analysen inhibierend auf das Wachstum von *U. maydis* aus. Der verwendete WT-Stamm SG200 war in der Lage niedrige Galactose-Konzentrationen (0,01%) zu tolerieren und anscheinend auch zur Energiegewinnung zu nutzen, da ein etwas besseres Wachstum als auf Medium ohne Zuckerquelle beobachtet wurde (Abb. 2.14 A). Galactose-Konzentrationen ab 0,1% führten beim WT jedoch zu einem vollständigen Verlust des Wachstums. Ein anschließendes Überstreichen auf Vollmedium zeigte, dass diese Wachstumshemmung reversibel ist und die Zellen durch Galactose somit nicht abgetötet werden (nicht gezeigt). Der *hxt1*-Deletionsstamm zeigte im Gegensatz zum WT ein leicht zunehmendes Wachstum bei steigenden Galactose-Konzentrationen bis 5%. Dieser Phänotyp konnte, wie bereits zuvor gezeigt, durch die Integration eines *hxt1-gfp*-Expressionskonstrukts in den *ip*-Locus komplementiert werden.

Um die Beobachtung eines Stamm-spezifischen Effekts auszuschließen, wurde *hxt1* in weiteren *U. maydis* WT-Stämmen deletiert. Es handelte sich dabei um den ursprünglich aus Nordamerika stammenden Standard-Laborstamm FB1 (Banuett und Herskowitz, 1989) sowie zwei Feld-Isolate aus Deutschland, BUB8 (Weinzierl *et al.*, 2002) und MB215 (Hewald *et al.*, 2005). Wachstumstests mit diesen Stämmen zeigten nach der Deletion von *hxt1* ebenfalls ein deutlich verbessertes Wachstum bei 1% Galactose im Medium (Abb. 2.14 B). Sowohl BUB8 als auch MB215 waren jedoch in der Lage, Konzentrationen von bis zu 0,1% Galactose im Medium zu tolerieren und angesichts des Wachstums wohl auch zu verwerten. Die von Hxt1 abhängige Wachstumshemmung durch Galactose scheint demnach innerhalb der *U. maydis* Spezies konserviert zu sein. Die unterschiedlichen Hemmschwellen zeigen jedoch auch, dass der Effekt konzentrationsabhängig ist und zwischen verschiedenen Stämmen variieren kann.

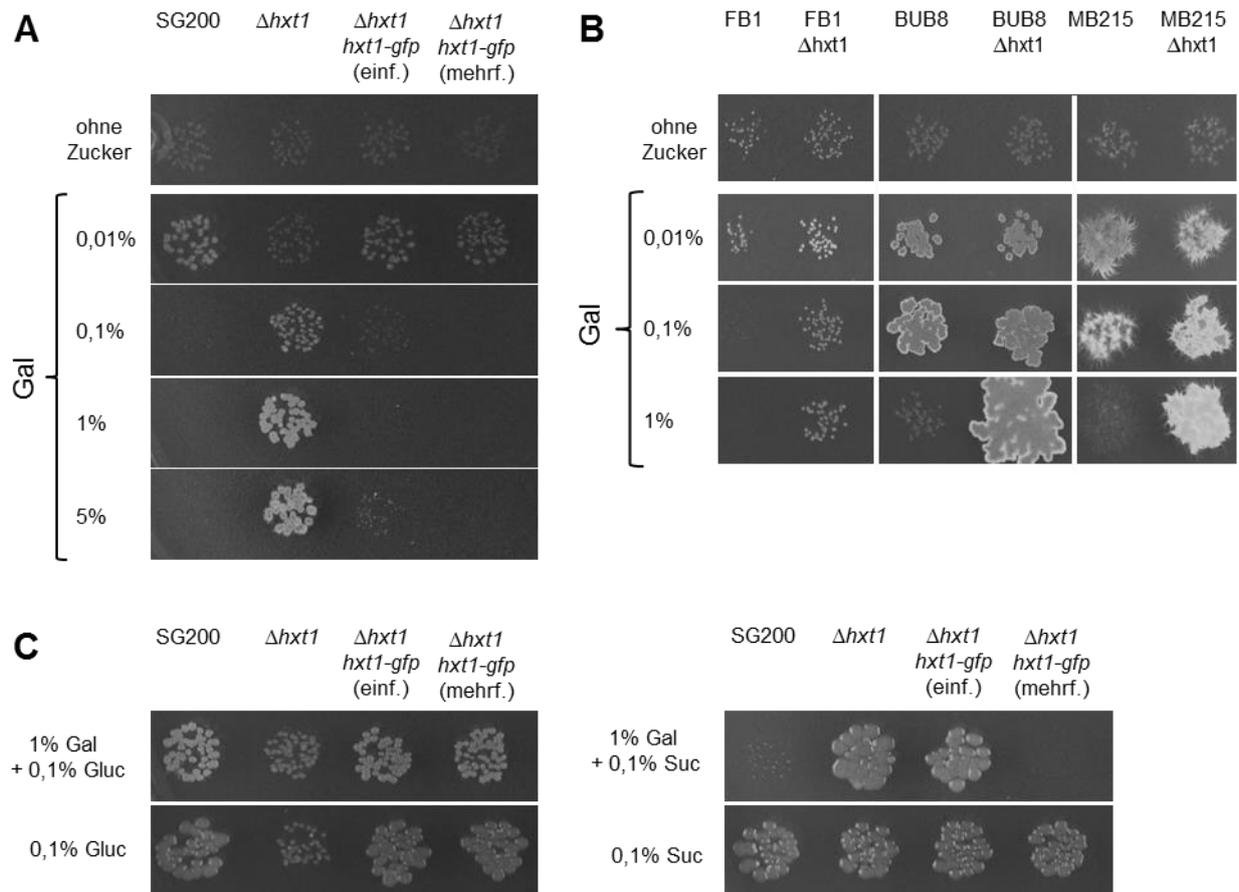


Abb. 2.14 Galactose inhibiert das Wachstum von *U. maydis* in Abhängigkeit von Hxt1. (A) Galactose (Gal) inhibiert das Wachstum von SG200 ab Konzentrationen von 0,1%. Gezeigt ist das Wachstum auf AM mit den angegebenen Kohlenstoffquellen nach 10 Tagen. **(B)** Die Galactose-vermittelte Wachstumshemmung ist auch in anderen nicht verwandten Stämmen *hxt1*-abhängig. Gezeigt ist das Wachstum auf AM mit den angegebenen Kohlenstoffquellen nach 5 Tagen. **(C)** Die Galactose-vermittelte Inhibition des Wachstums kann durch den Zusatz von Glucose (Gluc), aber nicht von Saccharose (Suc) aufgehoben werden. Gezeigt ist das Wachstum auf AM mit den angegebenen Kohlenstoffquellen nach 3 Tagen.

2.9.1 Die Galactose-vermittelte Wachstumshemmung ist dominant über die Anwesenheit von Saccharose jedoch nicht von Glucose

Das Wachstum der WT-Stämme auf niedrigen, jedoch nicht auf hohen Galactose-Konzentrationen deutete eher auf eine Galactose-vermittelte Inhibition des Wachstums hin als auf das Unvermögen diesen Zucker energetisch umzusetzen. Um zu überprüfen, ob diese Inhibition dominant über die Anwesenheit präferierter Kohlenhydrate ist, wurden Wachstumstests auf Medien mit gemischten Kohlenstoffquellen durchgeführt. Dazu wurden dem Medium 1% Galactose zusammen mit entweder 0,1% Glucose oder 0,1% Saccharose zugegeben. Durch die Zugabe von Glucose zum Galactose-Medium wurde das Wachstum des WT-Stamms SG200 wiederhergestellt und war nur geringfügig schlechter als auf dem entsprechenden Kontrollmedium ohne Galactose (Abb. 2.14 C). Der *hxt1*-Deletionsstamm

zeigte auf diesem Medium im Vergleich zum WT ein schlechteres Wachstum. Der Phänotyp glich somit dem Wachstum auf Medien mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle. Die komplementierten Stämme verhielten sich dem WT entsprechend. Der inhibitorische Effekt von Galactose wird demnach durch die Anwesenheit von Glucose weitestgehend aufgehoben. Die zusätzliche Anwesenheit von Saccharose im Galactose-Medium führte im WT dagegen nicht zu einem verbesserten Wachstum, während der *hxt1*-Deletionsstamm ein zum Galactose-freien Kontrollmedium mit Saccharose vergleichbares Wachstum zeigte (Abb. 2.14 C). Die Galactose-vermittelte Wachstumsinhibition ist somit dominant über die Anwesenheit des von *U. maydis* gut verwertbaren Zuckers Saccharose. Da Saccharose als Disaccharid im Gegensatz zu Glucose kein Substrat für Hxt1 darstellt, deuten die Ergebnisse auf einen kompetitiven Effekt durch Glucose hin. Daher scheinen die Bindung und/oder der Transport von Galactose an Hxt1 für die Wachstumshemmung notwendig zu sein. Überraschenderweise war auch der Stamm mit einem einfach integrierten Komplementations-Konstrukt in der Lage, auf Saccharose/Galactose-haltigem Medium zu wachsen. Die mehrfache Integration des Konstrukts führte dagegen wie beim WT zum Verlust des Wachstums. Die Expression von *hxt1* führt demzufolge wahrscheinlich erst ab einem gewissen Schwellenwert zu der Galactose-vermittelten Inhibition des Wachstums. Ob Galactose von Hxt1 dabei nur transportiert oder auch in der Funktion eines Sensors detektiert wird, kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

2.9.2 Heterologe Komplementation der *hxt1*-Deletion

Um die Transportfunktion und die putative Sensorfunktion von Hxt1 getrennt zu untersuchen, wurde versucht, durch heterologe Komplementationen mit bereits charakterisierten Zuckertransportern die Phänotypen des *hxt1*-Deletionsstamms den jeweiligen Funktionen zuzuordnen. Falls die Wachstumsinhibition von *U. maydis* auf Medien mit Galactose bzw. Xylose durch ein von Hxt1 ausgehendes Signal vermittelt wird, sollte eine Komplementation des Deletionsstamms mit einem reinen Transporter nicht zu einem äquivalenten Signal und damit nicht zu einem reprimierten Wachstum führen.

Zur Komplementation wurden die Hexosetransporter HXT3 und HXT5 aus *Colletotrichum graminicola* in SG200 Δ *hxt1* exprimiert. Durch Aufnahmestudien in Hefe konnte bereits gezeigt werden, dass beide neben dem Transport anderer Hexosen (darunter auch Galactose) einen effizienten Transport von Glucose vermitteln. CgHXT3 besitzt mit einem K_m -Wert von etwa 13 μ M eine hohe, CgHXT5 mit einem $K_m = 920 \mu$ M dagegen eine niedrige Affinität für Glucose (Lingner *et al.*, 2011). Zudem wurde der Transporter STP1 aus *A. thaliana* zur Komplementation des *hxt1*-Deletionsstamms verwendet. Die Sequenz von *AtSTP1* wurde dafür zunächst in Bezug auf GC-Gehalt und Codon-Gebrauch für *U. maydis* angepasst und anhand eines etablierten Datensatzes zur Bestimmung der Codon- und Dicondon-Häufigkeit (Nakamura *et al.*, 2000; Zarnack *et al.*, 2006) optimiert (<http://dicodon-optimization.appspot.com/>). *AtSTP1* wurde bereits durch Untersuchungen in *A. thaliana*-Keimlingen sowie durch die heterologe Expression in *Xenopus*-Oozyten und *S. pombe*-Zellen funktionell als hochaffiner Transporter für Glucose, Mannose und Galactose charakterisiert (Boorer *et al.*, 1994; Sauer *et al.*, 1990; Sherson *et al.*, 2000; Stolz *et al.*, 1994).

Die drei Transporter wurden entsprechend den bisherigen Komplementationen mit C-terminaler GFP-Fusion unter Kontrolle des *hxt1*-Promotors im *ip*-Locus exprimiert. Für die weiteren Analysen wurden Stämme mit mehrfach integriertem Expressionskonstrukt verwendet. In allen drei Fällen konnte die erfolgreiche Expression sowie die erwartete Lokalisierung entlang des Zell-Cortex durch die Beobachtung des GFP-Fluoreszenz-Signals bestätigt werden (Abb. 2.15 A). Ein verbessertes Wachstum der jeweiligen Stämme auf Glucose-haltigem Medium zeigte zudem, dass die Expressionskonstrukte in allen drei Fällen für in *U. maydis* funktionelle Zuckertransporter kodieren (Abb. 2.15 B). Das Wachstum des Δ *hxt1*-Ausgangsstamms auf Galactose-haltigem Medium wurde durch die Expression von CgHXT3 vollständig aufgehoben. Dies entspricht dem Phänotyp der *Umhxt1*-exprimierenden Stämme. Auch die Komplementation mit *AtSTP1* führte zu einer Reduktion des Wachstums auf Galactose-haltigen Medien, die jedoch weniger stark war als im Fall von CgHXT3. Für CgHXT5 wurde eine deutliche Reduktion des Wachstums nur bei der höchsten getesteten Galactose-Konzentration von 5% beobachtet (Abb. 2.15 B).

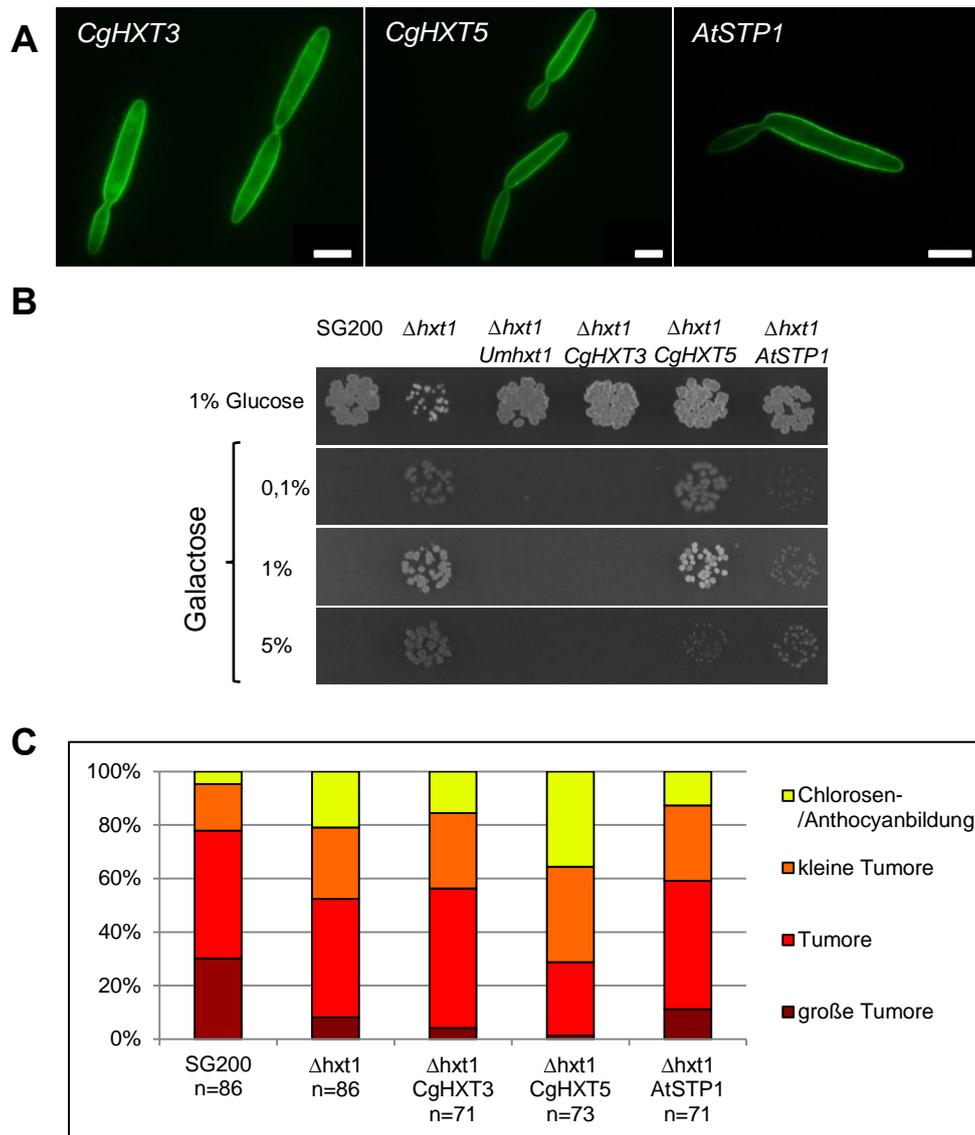


Abb. 2.15 Heterologe Komplementation des *hxt1*-Deletionsstamms mit *CgHXT3*, *CgHXT5* und *AtSTP1*. (A) Subzelluläre Lokalisierung der Transporter in *U. maydis*. Die jeweils angegebenen Transporter wurden als GFP-Fusionsproteine in *U. maydis* exprimiert. Ein GFP-Fluoreszenzsignal konnte entlang der zellulären Peripherie detektiert werden, was mutmaßlich der Position der Plasmamembran entspricht. Der Längenmaßstab entspricht 5 μ m. (B) Wachstum von *CgHXT3*-, *CgHXT5* und *AtSTP1*-exprimierenden *hxt1*-Deletionsstämmen auf AM nach 3 (Glucose) bzw. 10 (Galactose) Tagen. Die Expression aller drei Transporter mit C-terminaler GFP-Fusion führt zur vollständigen Komplementation des Wachstums auf Glucose-haltigem Medium, was auf einen funktionellen Transport hindeutet. Die Wachstumshemmung durch Galactose wird durch *CgHXT3* und *AtSTP1*, bei höheren Konzentrationen auch durch *CgHXT5* vermittelt. Alle verwendeten Stämme trugen mehrere Kopien der jeweiligen Expressionskonstrukte. (C) Bestimmung der Pathogenität. Die Komplementation führt in keinem Fall zur vollständigen Wiederherstellung der Pathogenität des *hxt1*-Deletionsstamms. Die Expression von *CgHXT3* und *AtSTP1* führt 7 dpi zu einer leicht verstärkten, die Expression von *CgHXT5* dagegen zu einer leicht reduzierten Ausbildung von Symptomen.

In Infektionsexperimenten zeigten die *CgHXT3*- bzw. *AtSTP1*-exprimierenden Stämme eine leicht verbesserte Pathogenität gegenüber dem *hxt1*-Deletionsstamm, eine vollständige Komplementation wurde jedoch in beiden Fällen nicht beobachtet. Die Expression von *CgHXT5* führte im Vergleich zu *SG200Δhxt1* dagegen eher zu einer leicht reduzierten Ausbildung von Symptomen (Abb. 2.15 C).

Durch die funktionelle Expression der heterologen Transporter konnte der mit der Transportfunktion von Hxt1 assoziierte Phänotyp des *hxt1*-Deletionsstamms auf Glucose-haltigem Medium komplementiert werden. Für eine vollständige Komplementation der reduzierten Pathogenität des *hxt1*-Deletionsstamms war diese nicht ausreichend, führte aber im Fall von *CgHXT3* und *AtSTP1* noch zu einer leichten Verbesserung. Der mit einer putativen Sensorfunktion von Hxt1 in Verbindung gebrachte Phänotyp des *hxt1*-Deletionsstamms auf Galactose-haltigem Medium konnte ebenfalls durch die Expression der drei heterologen Transporter komplementiert werden, wenn auch in unterschiedlichem Maße. Diese Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang der Wachstumshemmung mit dem Transport von Galactose hin. Dass eine Komplementation durch den niedrig affinen Transporter *CgHXT5* nur auf hohen Galactose-Konzentrationen erfolgte, unterstützt diese Interpretation.

2.9.3 Messung der Galactose-Aufnahme in *hxt1*-Deletionsstämmen

Da die Hxt1-abhängige Wachstumshemmung durch Galactose ebenfalls durch die Expression von heterologen Transportern vermittelt werden kann, erschien eine putative Sensorfunktion von Hxt1 als Ursache für die Inhibition unwahrscheinlich. Daher wurde der von Hxt1 vermittelte Galactose-Transport näher untersucht.

Um den Anteil von Hxt1 an der Galactose-Aufnahme in *U. maydis* zu bestimmen, wurde die Aufnahme von [¹⁴C]-Galactose in *hxt1*-Deletionsstämmen gemessen. Dafür wurde nach Zugabe des radioaktiven Substrats in einer Endkonzentration von 10 mM (entspricht etwa 0,2%) zu einer Zellsuspension mit definierter Dichte die aufgenommene Galactose-Menge über zehn Minuten hinweg alle zwei Minuten gemessen. Für die Messung wurden die Stämme FB1 bzw. *FB1Δhxt1* sowie BUB8 bzw. *BUB8Δhxt1* verwendet, da in den Stammhintergründen unterschiedliche Galactose-Konzentrationen zu einer Wachstumshemmung geführt hatten (vgl. Abb. 2.14 B). Bei den Messungen konnte für beide Stammhintergründe eine signifikant reduzierte Galactose-Aufnahme der *hxt1*-Deletionsstämme beobachtet werden (Abb. 2.16). Der Unterschied zwischen WT und *hxt1*-Deletionsstamm war im FB1-Hintergrund jedoch deutlich höher als im BUB8-Hintergrund. Im direkten Vergleich zwischen den Stämmen zeigten die *hxt1*-Deletionsstämme eine ähnliche Aufnahmerate, bei den WT-Stämmen lag die Aufnahmerate in FB1 jedoch deutlich höher als in BUB8. Zusätzlich wurde auch die Aufnahme von Glucose gemessen. Diese war im FB1-

Hintergrund durch die Deletion von *hxt1* leicht reduziert, zwischen BUB8 und BUB8 Δ *hxt1* konnte kein Unterschied festgestellt werden. Hxt1 ist demnach für einen signifikanten Teil der Galactose-Aufnahme und zumindest in FB1 für einen messbaren Teil der Glucose-Aufnahme in *Ustilago maydis* verantwortlich.

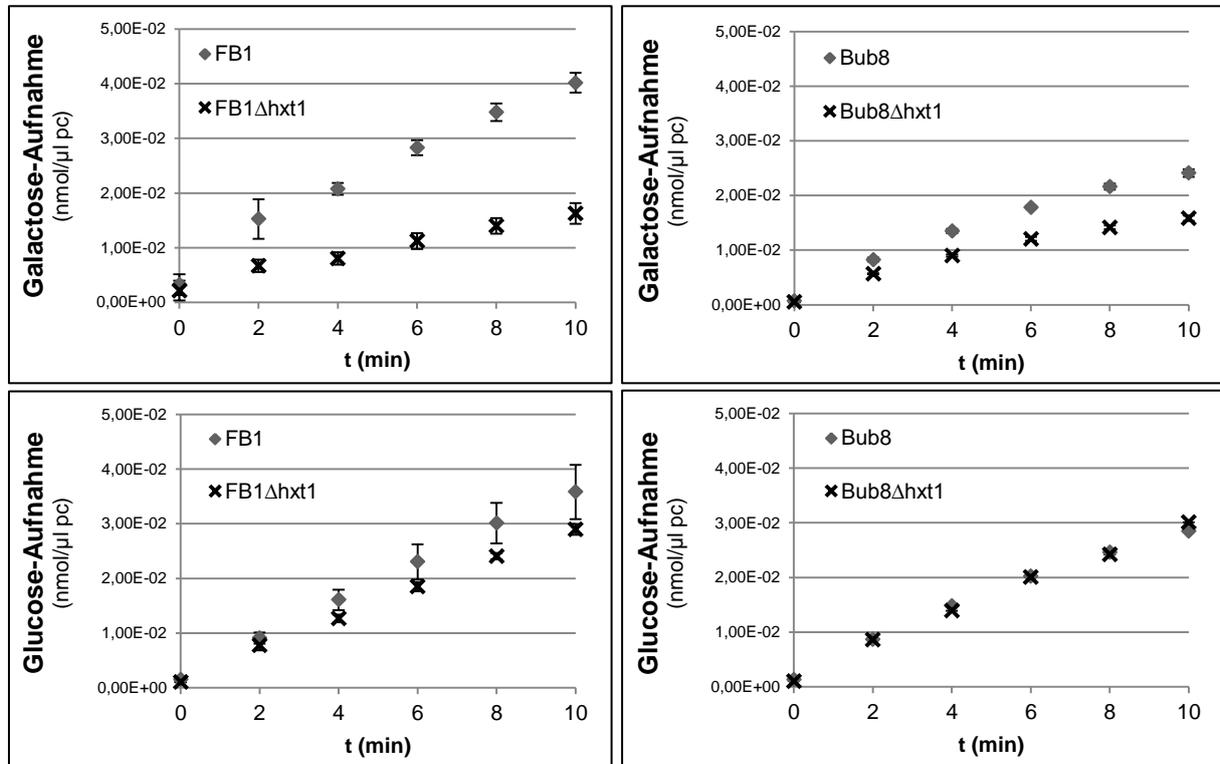


Abb. 2.16 Zeitabhängige Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Glucose und $[^{14}\text{C}]$ Galactose durch *hxt1*-Deletionsstämme. Die Aufnahme von radioaktiven Substraten wurde über einen Zeitraum von 10 min. nach Zugabe von 10 mM radioaktivem Substrat gemessen und mit dem „packed cell“ (pc) - Volumen der eingesetzten Zellen normalisiert. Die Deletion von *hxt1* führt zu einer signifikant reduzierten Galactose-Aufnahme. Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten an.

2.10 Der Austausch einer einzelnen Aminosäure der Galactokinase Gal1 erlaubt *U. maydis* das Wachstum auf Galactose-haltigem Medium

Zur Identifizierung weiterer Faktoren, die bei der Galactose-vermittelten Wachstumshemmung eine Rolle spielen, wurde ein auf UV-Bestrahlung basierender Mutagenese-Screen durchgeführt, bei dem Mutanten mit besserem Wachstum auf Galactose-haltigem Medium isoliert wurden. Eine erste Analyse von ca. 70 Mutanten ergab, dass bei allen eine Mutation im *hxt1*-Gen ursächlich für die verbesserte Galactose-Toleranz war (Dillner, 2012). Erst durch das Einbringen mehrerer Kopien von *hxt1* konnten nach der

anschließenden Mutagenese zwei Mutanten identifiziert werden, die trotz der Anwesenheit von Hxt1 ein verbessertes Wachstum auf Galactose-haltigem Medium zeigten. Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms einer der beiden Mutanten konnten zwei Mutationen in ORFs identifiziert werden. Eine dieser Mutationen liegt in dem Gen *um01962*, welches für die Galactokinase Gal1 kodiert, und führt in dieser zum Austausch von Tyrosin 67 zu Phenylalanin (Höll, 2012).

Die postulierte Verbindung zwischen der Mutation und dem verbesserten Wachstum auf Galactose-haltigem Medium wurde durch die Sequenzierung des *gal1*-Gens der zweiten Mutante gestützt. In diesem wurde ebenfalls eine Mutation gefunden, die zum Austausch von Tyrosin 67 führt, welches in diesem Fall jedoch durch Histidin ersetzt wird (Abb. 2.17 A). Ein Sequenzvergleich zeigte, dass die betroffene Aminosäure hochkonserviert ist und innerhalb der konservierten Galactose-Bindesignatur der *U. maydis* Galactokinase liegt (Abb. 2.17 B, UmGal1 38-84, PFAM, $E=3,6e^{-20}$).

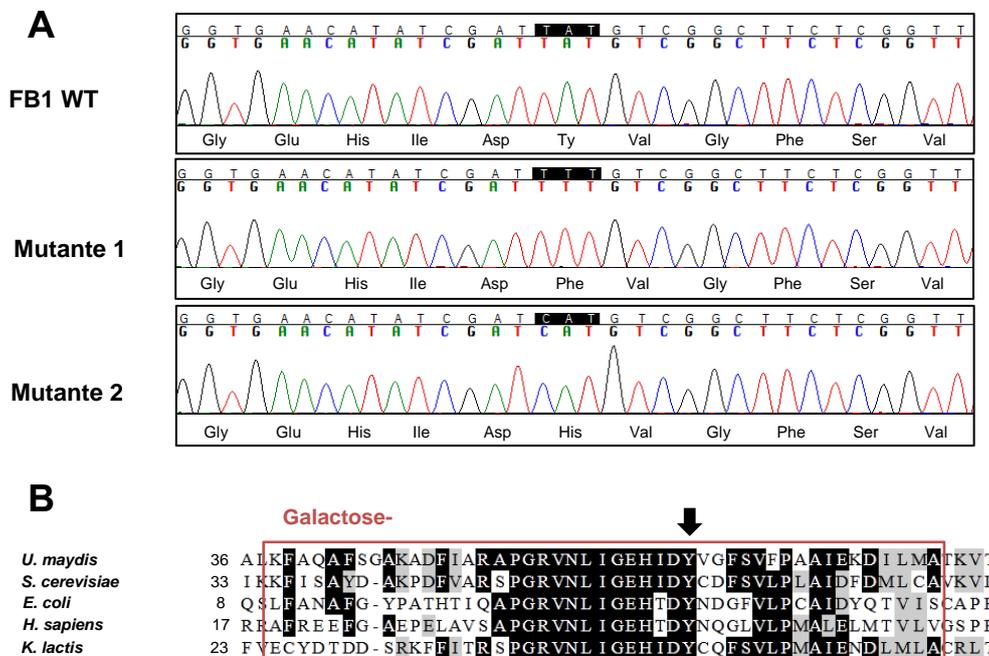


Abb. 2.17 Identifizierung von Mutationen im ORF der Galactokinase Gal1 in *U. maydis*. (A) Sequenzierung der *gal1* ORFs aus *U. maydis* UV-Mutanten mit verbessertem Wachstum auf Galactose-haltigem Medium. In beiden isolierten Mutanten führt eine Mutation zum Austausch von Tyrosin 67 in Gal1. (B) Partieller Sequenzvergleich von Gal1-homologen Proteinen. Die von der Mutation betroffene Aminosäure (mit schwarzem Pfeil markiert) ist Teil der hochkonservierten Galactose-Bindedomäne von Gal1. Die Software ClustalW wurde verwendet um Gal1-homologe Proteine aus *S. cerevisiae* (YBR020W), *E. coli* (GalK), *H. sapiens* (GALK1) und *K. lactis* (KLLA0F08393g) abzugleichen. Gleiche bzw. ähnliche AS sind schwarz bzw. grau hinterlegt.

2.10.1 Charakterisierung von *gal1*(Y67F)

Um die Beobachtung von Sekundäreffekten durch weitere Mutationen in der mit UV-Strahlung behandelten Mutante auszuschließen, wurde die Mutation zur weiteren

Charakterisierung gezielt in den WT-Stamm FB1 eingebracht. Dafür wurde der *gal1*-ORF mit der zum Austausch von Tyrosin 67 zu Phenylalanin führenden Mutation gegen den WT-ORF ausgetauscht und so der Stamm UDS68 (FB1 *gal1*(Y67F)) erstellt. Außerdem wurde der Stamm UDS72 (FB1 [*gal1*(Y67F)-*gfp*]^{*ipm*}) generiert, der neben dem nativen *gal1*-Gen die mutierte Variante *gal1*(Y67F) mit C-terminaler GFP-Fusion unter der Kontrolle eines 2,5kb großen Promotorfragments von *gal1* im *ip*-Locus exprimiert. Das entsprechende Expressionskonstrukt wurde dabei in mehrfacher Kopie integriert.

Wachstumstests mit diesen Stämmen bestätigten, dass der Austausch von Tyrosin 67 zu Phenylalanin in Gal1 ausreichend für ein verbessertes Wachstum von *U. maydis* auf Galactose-haltigen Medien ist (Abb. 2.18). Dieses konnte jedoch auf AM mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle nur bei einer permissiven Temperatur von 19°C beobachtet werden. Eine Temperatur von 28°C führte dagegen zum Verlust des Wachstums.

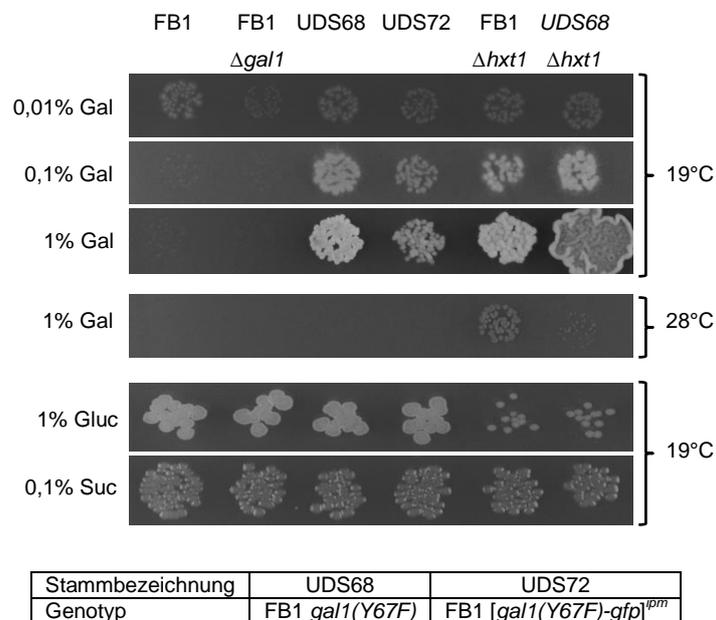


Abb. 2.18 Wachstum von *gal1*(Y67F)-exprimierenden Stämmen (A) Um die Auswirkungen der Mutation im Galactokinase-Gen zu untersuchen, wurden Stämme mit der Mutation im nativen *gal1*-Gen oder mit einem ektopisch integrierten ORF, der die entsprechende Mutation enthält, auf Medien mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft und das Wachstum bei den angegebenen Temperaturen nach 10 (Galactose (Gal)) bzw. 5 (Glucose (Gluc) und Saccharose (Suc)) Tagen beobachtet. Die Mutation führt sowohl in An- als auch Abwesenheit des WT-Allels zu einem verbesserten Wachstum auf Galactose-haltigen Medien. Dies konnte jedoch nur bei einer restriktiven Temperatur von 19°C beobachtet werden. Die zusätzliche Deletion von *hxt1* verstärkt das Wachstum. Das Wachstum auf Glucose- bzw. Saccharose-haltigen Medien wurde durch die Mutation nicht beeinflusst.

Die zusätzliche ektopische Expression von *gal1*(Y67F)-*gfp* in UDS72 erlaubte bei permissiver Temperatur ebenfalls ein verbessertes Wachstum. Dieses war jedoch schwächer als das von UDS68 und konnte nach fünf Tagen noch nicht beobachtet werden (nicht

gezeigt). Dennoch scheint die Mutation für das Wachstum auf Galactose-haltigem Medium nach 10 Tagen dominant über das WT-Allel zu sein. Da *gal1(Y67F)* nicht zu dem gleichen Phänotyp führte wie die Deletion von *gal1*, scheint die Mutation zu einem Funktionsgewinn zu führen. Das Wachstum auf Glucose- bzw. Saccharose-haltigen Medien wurde von der Mutation nicht beeinflusst. Durch die zusätzliche Deletion von *hxt1* in UDS68 konnte das Wachstum auf Galactose-haltigen Medien weiter verstärkt werden (Abb. 2.18). Dieser additive Effekt deutet darauf hin, dass die Deletion von *hxt1* und die Mutation in *gal1(Y67F)* das Wachstum auf Galactose-haltigen Medien über zwei unabhängige Mechanismen beeinflussen.

2.10.2 Vergleich des inhibitorischen Effekts von Galactose und 2-Deoxy-Galactose

Der Einfluss der Mutation in *gal1(Y67F)* auf die enzymatische Umsetzung von Galactose sollte durch den Einsatz des Galactose-Analogs 2-Deoxy-Galactose (2dGal) untersucht werden. 2dGal wird über die Enzyme des Leloir-Wegs metabolisiert und wirkt infolgedessen toxisch (Fischer und Weidemann, 1964). In Galactokinase-defizienten Hefe- und Säugerzellen ist der toxische Effekt von 2dGal aufgehoben (Platt, 1984; Thirion *et al.*, 1976). Demnach ist eine Phosphorylierung von 2dGal durch die Galactokinase für den toxischen Effekt notwendig. Zur Untersuchung der enzymatischen Funktion der Galactokinase in *U. maydis* wurden entsprechende Wachstumstests mit Galactose-toleranten Stämmen auf Medium mit 0,1 % 2dGal durchgeführt. Als verwertbare Kohlenstoffquelle wurde dem Medium zusätzlich Saccharose zugegeben, da dieses in *U. maydis* sehr wahrscheinlich nicht mit der Aufnahme von Galactose bzw. 2dGal interferiert (siehe 2.9.1). Die Deletion von *gal1* führte zu einer erhöhten Toleranz gegenüber 2dGal, während das Wachstum des WT-Stamms vollständig inhibiert war (Abb. 2.19). Dies zeigt, dass auch in *U. maydis* die von 2dGal vermittelte Toxizität von der Galactokinase Gal1 abhängt.

Die Expression von *gal1(Y67F)* im Stamm UDS68 (FB1 *gal1(Y67F)*) führte bei einer für die Mutation restriktiven Temperatur (28°C) zu einem deutlichen Wachstum auf 2dGal-haltigem Medium, das verglichen mit dem Wachstum des *gal1*-Deletionsstamms nur leicht schwächer war. Die Inkubation von UDS68 bei permissiver Temperatur (19°C) hatte im Vergleich zur Inkubation bei 28°C ein stark dezimiertes jedoch nicht vollständig inhibiertes Wachstum zur Folge. Da der toxische Effekt von 2dGal durch die Galactokinase-Aktivität vermittelt wird, deutet dies einen fast vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität von Gal1(Y67F) bei restriktiver Temperatur an, während bei permissiver Temperatur die Aktivität weniger stark reduziert zu sein scheint. Die ektopische Expression von *gal1(Y67F)* in Anwesenheit des WT-Allels vermittelte kein Wachstum auf 2dGal-haltigem Medium. Daher scheint *gal1(Y67F)* unter den verwendeten Bedingungen für den 2dGal-Stoffwechsel nicht dominant über das WT-Allel zu sein, was ebenfalls mit einer verminderten enzymatischen Aktivität von

Gal1(Y67F) im Einklang steht. Die Deletion von *hxt1* hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber 2dGal. Wahrscheinlich ist bereits eine geringere, unabhängig von Hxt1 aufgenommene Menge 2dGal für einen toxischen Effekt ausreichend.

Als Ursache für die Galactose-vermittelte Wachstumsinhibition wurde ein durch akkumulierende Galactose-Metabolite verursachter, toxischer Effekt vermutet. Daher wurden analog zu den Versuchen mit 2dGal Wachstumstests mit Galactose/Saccharose-haltigem Medium durchgeführt. Hierbei wurden in Vorversuchen als geeignet festgestellte Konzentrationen von 1% Galactose und 0,1% Saccharose verwendet. Früheren Versuchen entsprechend (vgl. Abb. 2.14 C) zeigte der WT-Stamm FB1 unter diesen Bedingungen fast kein Wachstum, der *hxt1*-Deletionsstamm im Vergleich dazu ein deutlich verbessertes Wachstum (Abb. 2.19). Im Fall des *gal1*-Deletionsstamms konnte wie beim WT trotz der zusätzlichen Anwesenheit von Saccharose kein Wachstum beobachtet werden. Galactose vermittelt demnach in FB1 auch unabhängig von *gal1* einen inhibitorischen Effekt, was im Gegensatz zu den Versuchen mit 2dGal steht (s.o.). Die Mutation in *gal1*(Y67F) ermöglichte ein Wachstum von UDS68 (FB1 *gal1*(Y67F)) in Anwesenheit von Saccharose und Galactose, sowohl bei permissiver als auch restriktiver Temperatur. Dieses Ergebnis schließt wiederum einen vollständigen Funktionsverlust von Gal1(Y67F) bei 28°C aus, da die Deletion von *gal1* unter diesen Bedingungen kein Wachstum erlaubte. Der dominante Effekt von *gal1*(Y67F) im Stamm UDS72 (FB1 [*gal1*(Y67F)]^{ipm}) war zum Zeitpunkt der Beobachtung (nach 5 Tagen) nur sehr schwach ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt konnte auf Medium mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle jedoch ebenfalls noch kein Wachstum von UDS72 beobachtet werden (siehe 2.10.1).

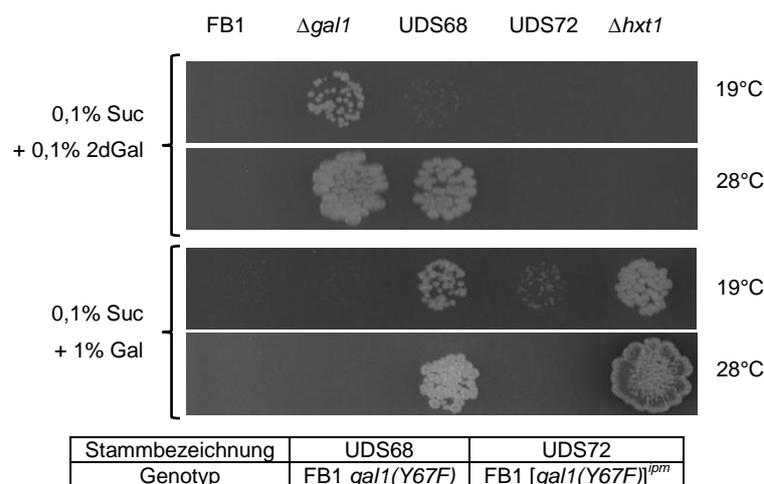


Abb. 2.19 Untersuchung der Sensitivität von *U. maydis*-Stämmen gegen Galactose (Gal) bzw. 2-Deoxy-Galactose (2dGal) in Abhängigkeit von Gal1 bzw. Gal1(Y67F). Beobachtet wurde das Wachstum von *U. maydis*-Stämmen nach 5 Tagen. Saccharose (Suc) wurde dem Medium als verwertbare Kohlenstoffquelle zugegeben um einen dominant-inhibitorischen Effekt von 2dGal bzw. Galactose zu untersuchen.

2.10.3 Heterologe Expression von Gal1(Y67F) in Hefe

Zum Vergleich der enzymatischen Funktion wurden Gal1 und Gal1(Y67F) in einem *GAL1*-Deletionsstamm in Hefe exprimiert, der auf Medium mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle kein Wachstum zeigt. Da Gal1p in *S. cerevisiae* für die Induktion der *GAL*-Gene keine Rolle spielt und allein für die Phosphorylierung von Galactose zuständig ist (Thoden *et al.*, 2005a), sollte ein verbessertes Wachstum dieses Stamms auf Medium mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle auf die enzymatische Aktivität einer exprimierten Galactokinase zurückzuführen sein. Neben *Umgal1(Y67F)* und *Umgal1* (ohne Mutation) wurde auch *ScGAL1* zur Expression unter der Kontrolle des konstitutiven *PMA1*-Promotors in den Vektor pNEV-GW (Derivat von pNEV-E; Sauer und Stolz, 1994) kloniert und in BY4741 Δ *GAL1* transformiert. Als Negativkontrolle dienten mit dem Leervektor transformierte Zellen. Das wiederhergestellte Wachstum der mit *ScGAL1*-exprimierenden Zellen nach fünftägiger Inkubation bei 19°C auf Medium mit 1% Galactose zeigte, dass das verwendete Expressionssystem für eine Komplementation ausreichend war. Die Expression der Gal1-Varianten aus *U. maydis* führte im Fall des WT-Gens zu einem deutlich verbesserten Wachstum des *GAL1*-Deletionsstamms, während die Expression von Gal1(Y67F) nur eine sehr schwache aber sichtbare Verbesserung bewirkte. Die Inkubation der Stämme bei 28°C führte zu einer noch etwas schlechteren Komplementation durch Gal1(Y67F) (Abb. 2.20). Die Ergebnisse deuten daher auf eine deutlich niedrigere, aber dennoch vorhandene enzymatische Aktivität von Gal1(Y67F) im Vergleich zu Gal1 bei 19°C hin, die bei 28°C noch weiter reduziert zu sein scheint.

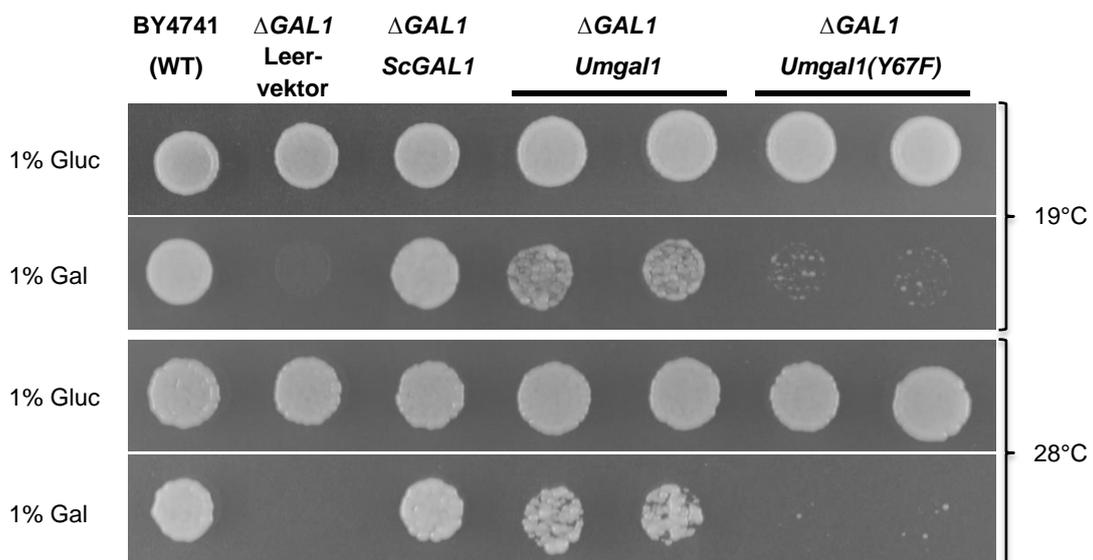


Abb. 2.20 Wachstum *Umgal1*- bzw. *Umgal1*(Y67F)-exprimierender Hefezellen. *Umgal1* bzw. *Umgal1*(Y67F) wurden im Δ *GAL1*-Hintergrund des Hefestamms BY4741 exprimiert und das Wachstum auf Galactose-haltigem Medium nach fünftägiger Inkubation bei 19°C beobachtet. Die Expression von *GAL1* aus Hefe bzw. die Transformation des Leervektors sowie das Wachstum auf Glucose-haltigem Medium dienten als Kontrollen.

2.10.4 Der Leloir-Weg ist notwendig für ein verbessertes Wachstum auf Galactose-haltigen Medien

Galactose wird im Leloir-Weg zunächst durch die Galactokinase (Gal1) zu Galactose-1-Phosphat (Gal-1-P) phosphoryliert und anschließend durch die Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase (Gal7) in einer gekoppelten Reaktion mit UDP-Glucose zu Glucose-1-Phosphat und UDP-Galactose umgewandelt (siehe Abb. 1.8 A). Gal7-defiziente Hefezellen sind nicht nur unfähig Galactose als Energiequelle zu nutzen, ihr Wachstum ist auch bereits bei geringen Galactose-Konzentrationen und trotz der Anwesenheit alternativer Kohlenstoffquellen inhibiert (Douglas und Hawthorne, 1964). Beim Wachstum in Galactose-haltigem Medium konnte in Gal7-defizienten Hefe-Zellen eine Akkumulation von Gal-1-P beobachtet werden und es wird vermutet, dass dieses Zwischenprodukt für den toxischen Effekt in den Galactose-sensitiven Stämmen verantwortlich ist (Ross *et al.*, 2004; Slepak *et al.*, 2005).

In *U. maydis* WT-Stämmen wirkt Galactose trotz der Anwesenheit von Gal7 inhibierend auf das Wachstum. Dies könnte auf einen gestörten oder ineffizienten Leloir-Weg in *U. maydis* hindeuten, der bei hohen intrazellulären Galactose-Konzentrationen zur Anhäufung toxischer Zwischenprodukte führt. Zur Untersuchung der Relevanz des Leloir-Wegs für den Galactose-Stoffwechsel in den Galactose-toleranten Stämmen FB1 Δ *hxt1*, UDS68 (FB1*gal1*(Y67F)) und UDS68 Δ *hxt1* (FB1*gal1*(Y67F) Δ *hxt1*) wurde in diesen Stämmen zusätzlich *gal7* (*um01875*) deletiert. Die Deletion von *gal10* (*um11600*), das für die Galactose-Epimerase kodiert, hatte einen pleiotropen Wachstumsphänotyp zur Folge (nicht gezeigt) und wurde nicht weiter untersucht.

Die Deletion von *gal7* im WT-Stamm FB1 führte bereits bei einer Galactose-Konzentration von nur 0,01% zu einer Inhibition des Wachstums, während das Wachstum bei höheren Galactose-Konzentrationen im WT ohnehin gehemmt ist (vgl. Abb. 6.12 im Anhang). In den Galactose-toleranten Stämmen hatte die Deletion von *gal7* auch bei Anwesenheit von Saccharose als alternativer Kohlenstoffquelle eine Reduktion des Wachstums auf Galactose-haltigen Medien zur Folge (Abb. 2.21). Dies könnte entsprechend den Erkenntnissen in Hefe auf eine Akkumulation von Galactose-1-Phosphat zurückgeführt werden. Für FB1 Δ *hxt1* Δ *gal7* konnte sowohl auf Galactose- als auch auf Galactose/Saccharose-haltigem Medium noch ein abgeschwächtes Wachstum beobachtet werden, was durch eine geringere Galactose-Aufnahme und eine daraus resultierende geringere Akkumulation von Gal-1-P erklärt werden könnte.

Das Wachstum von UDS68 Δ *gal7* und UDS68 Δ *hxt1* Δ *gal7* war dagegen sowohl auf Galactose- als auch auf Galactose/Saccharose-haltigem Medium vollständig inhibiert. Gal7 ist demnach essentiell für das Gal1(Y67F)-vermittelte Wachstum auf Galactose-haltigen Medien. Außerdem scheint Gal1(Y67F) im Δ *hxt1* Δ *gal7*-Hintergrund zu einem stärkeren

toxischen Effekt zu führen als Gal1 ohne Mutation (vgl. Abb. 2.21, FB1 Δ hxt1 Δ gal7 und UDS68 Δ hxt1 Δ gal7). Dies könnte auf einen erhöhten Galactose-Stoffwechsel im UDS68-Hintergrund und einer dadurch wichtigeren Rolle für Gal7 hindeuten (siehe Abb 1.8 A für eine Übersicht des Leloir-Wegs).

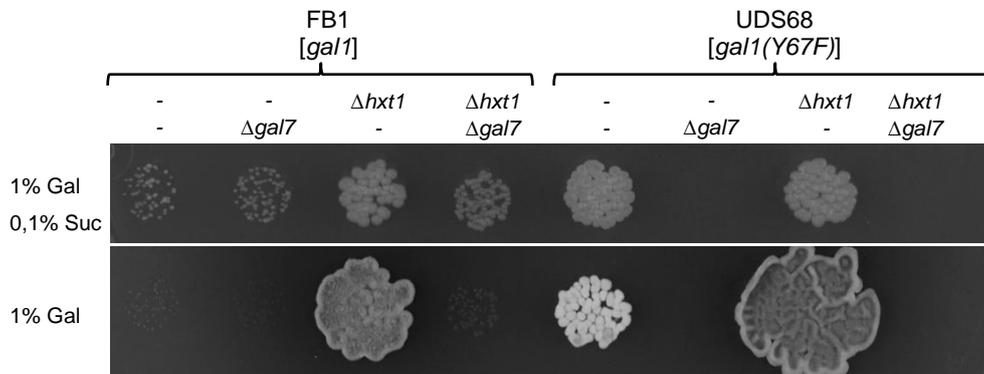


Abb. 2.21 Einfluss der Deletion von gal7 auf das Wachstum Galactose-toleranter *U. maydis* Stämme. Gezeigt ist das Wachstum der angegebenen gal1-Deletionsstämme sowie der jeweiligen Ausgangsstämme auf Medium mit Galactose (Gal) und Saccharose (Suc) bzw. nur Galactose nach 5 bzw. 10 Tagen bei einer für Gal1(Y67F) permissiven Temperatur von 19°C.

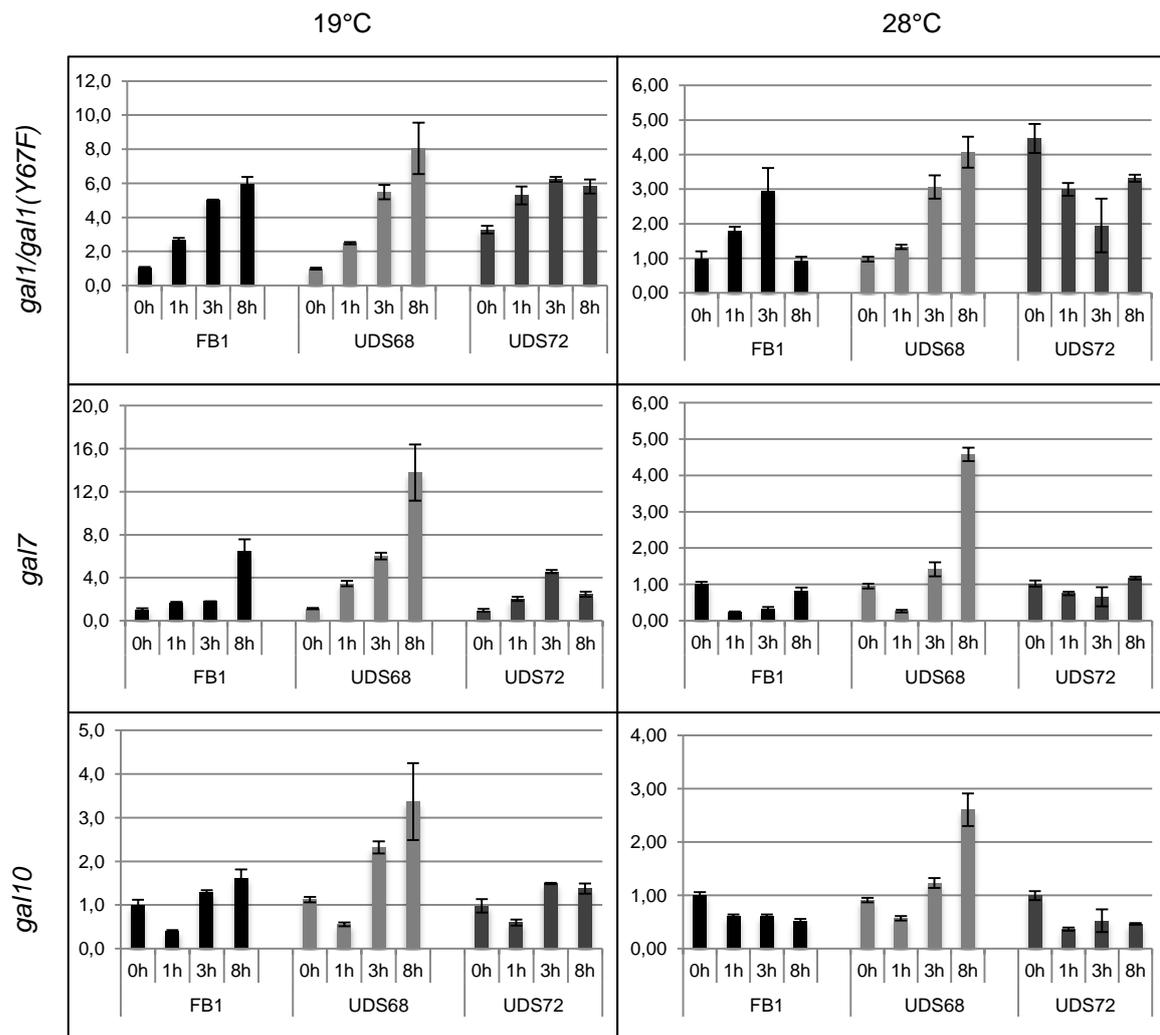
2.10.5 Expression der Enzyme des Leloir-Wegs

Die Gal1-Homologe in *S. cerevisiae* und *K. lactis* besitzen neben ihrer enzymatischen Funktion als Galactokinase zusätzlich eine Funktion als Induktor. Während KIGal1 *in vivo* beide Funktionen ausfüllt, wurde in *S. cerevisiae* die Induktorfunktion größtenteils von dem nahverwandten Protein ScGal3p übernommen (Meyer *et al.*, 1991; Thoden *et al.*, 2005a). Ein verbleibendes Induktorpotential von ScGal1p konnte jedoch durch *in vitro* Experimente gezeigt werden (Platt und Reece, 1998). ScGal3p bzw. KIGal1p inaktivieren in Anwesenheit von Galactose den Repressor Gal80p, was in der Folge zu einer durch den Transkriptionsfaktor Gal4p vermittelten Induktion der GAL-Gene führt (Bhat und Hopper, 1992; Platt und Reece, 1998).

Da auch in *U. maydis* eine vergleichbare Doppelfunktion von Gal1 vorliegen könnte, wurde die Auswirkung der Mutation in gal1(Y67F) auf die Regulation der gal-Gene analysiert. Hierzu wurde die Expression von gal1 (um01962), gal7 (um01875) und gal10 (um11600) in den Stämmen FB1, UDS68 (FB1gal1(Y67F)) und UDS72 (FB1 [gal1(Y67F)-gfp]^{ipm}) untersucht. Die Stämme wurden dafür in Minimalmedium mit Glucose angezogen und in Minimalmedium mit Galactose überführt. Die Inkubation in Galactose-Medium erfolgte bei 28°C sowie bei 19°C. Die Expression der gal-Gene wurde vor der Überführung (0h) bzw. 1 h, 3 h und 8 h nach der Überführung in Galactose-haltiges Medium untersucht.

Dabei konnte in UDS68 in Relation zum WT-Stamm FB1 nach dem Wechsel in Galactosehaltiges Medium sowohl bei 19°C als auch bei 28°C eine etwa zweifach stärkere Induktion von *gal7* und *gal10* beobachtet werden (Abb. 2.22). Die beobachtete Induktion von *gal1* verlief in FB1 und UDS68 nahezu gleich. Nur nach 8 h bei 28°C war die *gal1*-Expression in FB1 deutlich niedriger als in UDS68. Die relativ geringen Expressionsänderungen machen einen direkten Einfluss von Gal1(Y67F) auf die Regulation der *gal*-Gene unwahrscheinlich. Insgesamt konnte bei 19°C eine stärkere Induktion der *gal*-Gene beobachtet werden als bei 28°C (man beachte die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse). Die erhöhte Expression von *gal7* und *gal10* könnte auf einen verstärkten Galactose-Metabolismus in UDS68 hindeuten. In einem analogen Experiment konnte im *hxt1*-Deletionsstamm keine signifikant vom WT abweichende Regulation der *gal*-Gene beobachtet werden (nicht gezeigt).

Interessanterweise führte die ektopische Expression von *gal1*(Y67F) im Stamm UDS72 innerhalb des beobachteten Zeitraums nicht zu einer stärkeren Expression von *gal7* und *gal10*. Die Expression der beiden Gene verhielt sich ähnlich zu der im WT. Daher scheint Gal1(Y67F) auch in diesem Fall nicht dominant über das WT-Gen zu sein. Auffallend war jedoch, dass die Expression von *gal1* bzw. *gal1*(Y67F) in UDS72 nur zum Zeitpunkt t=0 h etwa 4-fach höher war als in FB1 und UDS68. Da das mehrfach integrierte *gal1*(Y67F)-Expressionskonstrukt unter der Kontrolle des *gal1*-Promotors steht und zusätzlich zum nativen *gal1*-Gen exprimiert wird, war eine dementsprechend höhere Expression von *gal1/gal1*(Y67F) in UDS72 erwartet worden (die Detektion der Transkripte erfolgte unabhängig von der Mutation). Während der Inkubation in Galactose-haltigem Medium bewegte sich die relative Expression von *gal1/gal1*(Y67F) in UDS72 dann jedoch auf dem Niveau der in FB1 und UDS68 beobachteten Expression und war teilweise sogar geringer als in diesen Stämmen. Da trotz der mehrfachen Kopien des *gal1*(Y67F)-Expressionskonstrukts keine erhöhte globale Expression von *gal1/gal1*(Y67F) beobachtet wurde, scheint der *gal1*-Promotor zumindest in Anwesenheit von Galactose einem autoregulatorischen Effekt zu unterliegen.



Stammbezeichnung	UDS68	UDS72
Genotyp	FB1 <i>gal1(Y67F)</i>	FB1 [<i>P_{gal1}-gal1(Y67F)-gfp</i>] ^{ipm}

Abb. 2.22 Relative Expression der *gal*-Gene in *U. maydis* nach dem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose zu Galactose. Die relative Genexpression wurde durch qRT-PCR Analysen bestimmt. Die Inkubation in Medium mit 1% Galactose erfolgte sowohl bei 19°C als auch bei 28°C. Der Wert bei 0h gibt die Expression in Medium mit 1 % Glucose an. Die Y-Achse gibt die relative Expression der Gene jeweils als Vielfaches der Expression in FB1 bei 0h an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*, *um04869*) als Referenzen.

3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Akquisition von Kohlenhydraten in *Ustilago maydis* bearbeitet. Bei der Untersuchung der Rolle von Zuckertransportern während der biotrophen Entwicklung konnten zum ersten Mal Effluxtransporter der SWEET-Familie in Mais identifiziert werden, deren Expression während einer pathogenen Interaktion induziert ist. Die in zwei verschiedenen Testsystemen durchgeführte funktionelle Charakterisierung dieser Transporter legt nahe, dass sie durch den Export von Glucose bzw. Saccharose in den Apoplast eine Versorgung des Pilzes mit Kohlenhydraten gewährleisten. Die zu den SWEET-Proteinen komplementären Transportsysteme in *U. maydis*, welche die Aufnahme der apoplastischen Kohlenhydrate vermitteln, sind durch den Saccharose-Transporter Srt1 und den Hexosetransporter Hxt1 repräsentiert. Srt1 und Hxt1 stellen unabhängig von den variierenden Kohlenhydrat-Verhältnissen in Sink- und Source-Organen der Wirtspflanze, die einzigen pathogenitätsrelevanten Zuckertransporter in *U. maydis* dar. Während die Deletion von *hxt1* nur eine leichte Reduktion der Virulenz zur Folge hat, führte der Austausch einer einzelnen Aminosäure in Hxt1 zum Abbruch der pathogenen Entwicklung. Dieser Phänotyp deutet auf eine zusätzliche Sensorfunktion von Hxt1 hin, die bereits aufgrund einer Hxt1-abhängigen Wachstumsinhibition durch Galactose postuliert wurde. Untersuchungen zur Galactose-vermittelten Wachstumsinhibition zeigten jedoch, dass diese unabhängig von einer Sensorfunktion mit der Transportfunktion von Hxt1 assoziiert ist. Die Hxt1-vermittelte Galactose-Aufnahme konnte durch heterologe Transporter komplementiert werden und führt wahrscheinlich zu einer hemmenden Akkumulation von Galactose-Stoffwechselprodukten. Die Galactose-Toleranz von *U. maydis* konnte zudem durch eine Mutation in der Galactokinase erhöht werden, die nicht zu einem Funktionsverlust, sondern zu einer Manipulation des Galactose-Stoffwechsels führte und Einblicke in die Mechanismen der Galactose-Toxizität in *U. maydis* erlaubt.

3.1 Srt1 und Hxt1 stellen in *U. maydis* unabhängig von den Wirtsorganen die wichtigsten Zuckertransporter während der biotrophen Phase dar

Bei der Untersuchung einer putativen wirtsorganspezifischen Funktion von Zuckertransportern in *U. maydis* wurden durch die Analyse von Microarray-Daten neben *hxt1* und *srt1* zunächst fünf weitere Gene identifiziert, die für putative Zuckertransporter kodieren und während der biotrophen Phase exprimiert sind. Tieferegehende Analysen mittels qRT-

PCR zeigten für keinen der sieben untersuchten Transporter eine auffällige, wirtsorganspezifische Expression. Dabei wurde die Expression in infizierten Keimlingen sowie in infizierten Fahnen als Sink-Organ und adulten Blättern als Source-Organ gemessen. Infektionen adulter Maispflanzen mit entsprechenden *U. maydis* Deletionsstämmen führten nur bei den $\Delta hxt1$ - und $\Delta srt1$ -Stämmen zu einer reduzierten Ausbildung von Symptomen an Blättern und Fahnen, wobei die Deletion von *srt1* einen stärkeren Effekt hatte. Dies entspricht früheren Untersuchungen an Maiskeimlingen, bei denen die Deletion von 20, für putative Zuckertransporter kodierenden Genen ebenfalls nur in den Fällen von *hxt1* und *srt1* zu einer reduzierten Virulenz führten (Wahl, 2009).

Die Virulenz der Deletionsstämmen war organunabhängig in Blättern und Fahnen jeweils etwa gleich stark reduziert. Den beiden Transportern scheint daher trotz der vermutlich unterschiedlichen Hexose/Saccharose-Verhältnisse in Sink- und Source- Organen die gleiche Bedeutung zuzukommen. Auch die Erwartung, dass in Sink-Organen aufgrund der möglicherweise höheren Kohlenhydrat-Konzentrationen weiteren Transportern mit niedrigerer Affinität eine pathogenitätsrelevante Rolle zukommt, konnte somit nicht bestätigt werden. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse eine wirtsorganspezifische Anpassung der Kohlenhydrataufnahme-Mechanismen in *U. maydis* unwahrscheinlich erscheinen.

Die Infektion von Source-Gewebe durch Pathogene führt in den meisten Fällen zu einer Herabregulation der Photosynthese, einem Anstieg der Zellatmung und in Folge zur Ausbildung von charakteristischen Sink-Eigenschaften, die auch mit einer erhöhten Zufuhr von Nährstoffen verbunden sind (zusammengefasst in Berger *et al.*, 2007; Biemelt und Sonnewald, 2006). Ein Vergleich von infizierten und nicht-infizierten Maiskeimlingen zeigte, dass durch die Infektion mit *U. maydis* die Etablierung der Photosynthese in den jungen, infizierten Blättern verhindert wird und diese für Sink-Gewebe charakteristische Merkmale wie einen hohen Hexose/Saccharose-Quotient beibehalten (Doehlemann *et al.*, 2008; Horst *et al.*, 2008). Auch wenn bisher keine vergleichbaren Studien für die Infektion adulter Maisblätter durch *U. maydis* vorliegen, ist aufgrund des erhöhten Energieverbrauchs davon auszugehen, dass auch in diesen Geweben nach der Infektion eine Verlagerung des Stoffwechsels hin zu Sink-Eigenschaften erfolgt. Die Manipulation der metabolischen Eigenschaften des Wirtsgewebes könnte daher eine Sink- oder Source-spezifische Anpassung der Kohlenhydrataufnahme überflüssig machen.

Das Hexose/Saccharose-Verhältnis stellt ein wichtiges Signal für verschiedene Prozesse in Pflanzen dar. Es beeinflusst neben der Sink-/Source-Identität von Geweben beispielsweise auch die Samenentwicklung und wird durch die koordinierte Expression von zellwandständigen Invertasen und Hexosetransportern streng kontrolliert (Weschke *et al.*, 2003; Wobus und Weber, 1999). In Tabak konnte zudem gezeigt werden, dass eine

Erhöhung der Hexosekonzentrationen, welche durch die Überexpression einer sekretierten Invertase aus Hefe ausgelöst wurde, zur Induktion von Abwehrmechanismen führt (Herbers *et al.*, 1996). Die einzige sekretierte Invertase in *U. maydis* scheint keine pathogenitätsrelevante Rolle zu spielen, da ihre Deletion weder in Keimlingen noch in adulten Pflanzen einen Einfluss auf die Ausbildung von Krankheitssymptomen hatte (nicht gezeigt, R. Wahl, pers. Mitteilung). Es ist denkbar, dass der hochaffine Saccharose-Transporter Srt1 durch die Aufnahme freier Saccharose den Anstieg des Hexose/Saccharose-Verhältnisses in Source-Geweben und damit dessen Umwandlung in Sink-Gewebe verstärkt. Möglicherweise spielt auch die gemeinsame Funktion von Hxt1 und Srt1 bei der Aufrechterhaltung eines für die Tumorentwicklung vorteilhaften Hexose/Saccharose-Spiegels eine Rolle. Dies könnte auch erklären, warum sowohl die Aufnahme von Saccharose als auch von Hexosen für die vollständige Pathogenität von *U. maydis* essentiell sind.

In jedem Fall stellt die Aufnahme von Saccharose und Glucose bzw. Fructose durch die hochaffinen Transporter Srt1 und Hxt1 unabhängig von den befallenen Organen die wichtigsten Kohlenhydrat-Aufnahmemechanismen für *U. maydis* während der biotrophen Entwicklung dar. Auch der nahezu vollständige Verlust der Pathogenität von *hxt1/srt1*-Doppeldeletionsstämmen (siehe Abb. 1.5; Wahl, 2009) deutet darauf hin, dass den anderen im Genom kodierten Zuckertransportern während der biotrophen Phase nur eine untergeordnete Rolle bei der Kohlenhydrataufnahme zukommt. Zudem scheint trotz der erhöhten Konzentration von freien Zuckern in den Blättern der *tdy*-, *psc*- oder *sxd*-Mutanten keiner der anderen Zuckertransporter in der Lage zu sein, die Deletion von *hxt1* oder *srt1* effizient zu kompensieren.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Bewertung der Pathogenität der infizierten Stämme in adulten Pflanzen subtile Unterschiede nicht erfasst wurden. Neben SG200 Δ *srt1* und SG200 Δ *hxt1* fielen auch einige der anderen Deletionsstämmen teilweise durch eine geringere Ausbildung von Symptomen auf. Diese lagen jedoch zumeist im Bereich der auch beim WT beobachteten Schwankungen oder konnten in einer zweiten Infektion nicht reproduziert werden. Die Ausbildung der Symptome war zudem stark von einem guten physiologischen Zustand der Pflanze abhängig. Aufgrund der im Versuchszeitraum sehr konstanten Wetterverhältnisse (Juni - September 2011, Stanford, CA, USA) wurde dieser hauptsächlich vom Standort innerhalb des Versuchsfeldes beeinflusst (Bodenbeschaffenheit, Unregelmäßigkeiten bei der Bewässerung). Um daraus resultierende Fehler zu minimieren, wurden die Pflanzen für die Infektion der einzelnen Stämme nach dem Zufallsprinzip ausgesucht. Dies sollte eine gleichmäßige Verteilung der infizierten *U. maydis* Stämme innerhalb einer Gruppe von Pflanzen gewährleisten. Dennoch

können Varianzen, die bei der Infektion von im Feld wachsenden Pflanzen auftreten, nur über einen größeren Stichprobenumfang zuverlässig minimiert werden.

3.2 Die Infektion mit *Ustilago maydis* führt in Mais zur Induktion von Zucker-Effluxtransportern

Im Verlauf der Infektion mit *U. maydis* kommt es in Mais zu einer verstärkten Expression von Genen, die für Zuckertransporter der SWEET-Familie kodieren (Abb. 2.3). Durch die Expression in humanen HEK293T-Zellen und in Hefe wurde die Fähigkeit von ZmSWT4a und ZmSWT4b zum Glucose-Import bzw. von ZmSWT11 zum Saccharose-Import demonstriert. (Abb. 2.4 und 2.5). Die Transporter der SWEET-Familie wurden ursprünglich als bidirektionale Uniporter identifiziert, indem ein SWEET-vermittelter Transport über die Plasmamembran in das Zytoplasma sowie der Transport vom Zytoplasma in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (als topologisches Äquivalent zu einem Efflux) mit Hilfe von FRET-basierten Glucose-Nanosensoren detektiert wurde (Chen *et al.*, 2010). Im vorliegenden Fall wurde nur die Aufnahme von Glucose bzw. Saccharose in das Zytoplasma getestet. Bei der Glucose-Aufnahme durch SWT4a und SWT4b war direkt nach Entfernung der Glucose-Lösung ein Rückgang des FRET-Quotienten auf den Ausgangswert zu beobachten (Abb. 2.4). Dies zeigt eine spontane Verminderung der Glucose-Konzentration im Zytoplasma, die wahrscheinlich durch einen SWEET-vermittelten Efflux zustande kam. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften des Saccharose-Sensors konnte bei der Saccharose-Messung unter den gewählten Bedingungen kein Rückgang des FRET-Quotienten beobachtet werden (D. Sosso, pers. Mitteilung). Die hohen strukturellen Ähnlichkeiten zu den anderen Proteinen der SWEET-Klasse lassen jedoch erwarten, dass neben SWT4a/b auch SWT11 und andere SWEET-Proteine in Mais als Uniporter fungieren, die abhängig vom Konzentrationsgradienten sowohl den Influx als auch den Efflux von Zuckern vermitteln können. Dass ZmSWT4a und ZmSWT4b im Gegensatz zu UmHxt1 nur bei der höheren Glucose-Konzentration zur Komplementation des Wachstums von EBY.VW4000 führten, deutet auf einen weniger effizienten Transport hin und spricht ebenfalls für einen Uniporter-typischen, energieunabhängigen Transport entlang eines Konzentrationsgradienten. Ähnliches gilt für die Expression von ZmSWT11 in DBY2617. Durch seine nicht näher charakterisierte Saccharose-Aufnahmekapazität ist DBY2617 trotz der fehlenden extrazellulären Invertaseaktivität zu einem geringen Wachstum auf Saccharose-haltigem Medium in der Lage (Kaiser und Botstein, 1986). Wachstumstests mit DBY2617 zur Überprüfung einer Saccharose-Transportfunktion sind daher nicht so sensitiv wie Wachstumstests mit dem Hexosetransporter-Teststamm EBY.VW4000. Den Transporteigenschaften entsprechend wurde das Wachstum von DBY2617 auf Saccharose-

haltigem Medium durch die Expression des hochaffinen, energieabhängigen Saccharose-Transporters Srt1 deutlich verbessert (Wahl *et al.*, 2010a), während die Expression von SWT11 nur zu einem sehr leicht verbesserten Wachstum führte (Abb. 2.5).

Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es auch in Mais nach einem Pathogenbefall zu einer verstärkten Expression von Zucker-Effluxtransportern kommt. Deren Transportmechanismus suggeriert eine Versorgung des Pilzes mit Zuckern aus dem Zytoplasma des Wirts und ihre Substratspezifität stellt für den pathogenorientierten Zuckerfluss eine bemerkenswerte Ergänzung zu den pathogenitätsrelevanten Transportern Hxt1 und Srt1 in *U. maydis* dar. Eine Untersuchung der Relevanz des SWEET-vermittelten Transports für die Interaktion mit *U. maydis* steht noch aus. Entsprechende Mais-Insertionslinien sind jedoch bisher nicht verfügbar (www.maizegdb.org).

Auch in *A. thaliana* führt eine Infektion mit dem Mehltau *Golovinomyces cichoracearum* oder mit *Botrytis cinerea* zu einer Induktion von SWEET-Genen, die im Fall von *B. cinerea* u.a. auch *AtSWEET4* betrifft (Chen *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2007). Die Induktion von SWEET-Genen durch bakterielle Pathogene kann gezielt durch sekretierte Effektoren erfolgen. Bei der Interaktion von *Xanthomonas oryzae* mit Reis vermittelt ein sekretierter TAL (transcriptional activator like) Effektor durch die Bindung an den Promotor von *OsSWEET11* dessen Expression, was essentiell für den Infektionsverlauf ist (Chen *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2006a). Die Induktion von SWEET-Genen während einer pathogenen Interaktion wird als eine Umleitung der Nährstoffrouten zu Gunsten des Pathogens interpretiert (Chen *et al.*, 2010; Sonnewald, 2011). Auch während der Interaktion von *U. maydis* mit Mais kommt es zu weitreichenden Änderungen des Stoffwechsels und der Genexpression der Wirtspflanze (Doehlemann *et al.*, 2008; Horst *et al.*, 2010a; Horst *et al.*, 2008). Die Umleitung von Zuckerflüssen zum Ort der Infektion wäre in jedem Fall eine für *U. maydis* vorteilhafte Modulation und eine gezielte Induktion der Sweet-Gene daher denkbar.

Im Vergleich zur Induktion von *OsSWEET11* (bzw. *Os8N3*) in Reis, wo nach einer Infektion mit dem *Xanthomonas*-Stamm PXO99^A eine über 100-fach erhöhte Expression beobachtet wurde (Yang *et al.*, 2006), waren die Expressionsunterschiede der Sweet-Gene in Mais nach der Infektion mit *U. maydis* eher moderat. Eine direkte Induktion der Gene wie im Fall der TAL Effektor-vermittelten Induktion durch *Xanthomonas* erscheint daher unwahrscheinlich. Es wäre jedoch auch denkbar, dass die Induktion durch *U. maydis* nicht systemisch erfolgt und nur die in unmittelbarer Nähe der Hyphen befindlichen Zellen betrifft. Weiterhin wäre eine Zelltyp-spezifische Induktion möglich, bei der die Effluxtransporter beispielsweise nur im Phloemgewebe induziert werden um das für die Tumorbildung notwendige Zellwachstum bzw. die Proliferation der anderen Zellen nicht zu beeinträchtigen. Da die verwendete RNA aus ganzen Blättern, Keimlingen und Fahnen isoliert wurde, könnten die detektierten Expressionsunterschiede deutlich niedriger ausfallen, als sie in einzelnen Zellen tatsächlich

sind. Zur Untersuchung einer möglicherweise lokalen Induktion der *Sweet*-Gene könnten Zelltyp-spezifische Expressionsanalysen von infiziertem Pflanzengewebe mit Hilfe von Laser-Mikrodissektion durchgeführt werden.

Eine Modulation des Wirtsmetabolismus durch einen pilzlichen Effektor konnte bereits für die *U. maydis*/Mais-Interaktion beschrieben werden. Die sekretierte Chorismat Mutase Cmu1 wird in die Wirtszellen aufgenommen und manipuliert dort über die Interaktion mit einer pflanzlichen Chorismat Mutase den Shikimat Weg. Dies führt zu einer vermehrten Produktion aromatischer Aminosäuren und verringert so gleichzeitig die Synthese von Salicylsäure, was wahrscheinlich der Vorbeugung von Abwehrmaßnahmen dient (Djamei *et al.*, 2011). Die Funktion von Cmu1 ist ein Beispiel für eine direkte Modulation des Wirtsmetabolismus durch *U. maydis*, welche sich auf ein Signalmolekül auswirkt. Nach einem vergleichbaren Modell wäre auch eine indirekte Induktion von *Sweet*-Genen denkbar, die beispielsweise durch eine Manipulation von Zuckersignalen erfolgen und dabei auch Zelltyp-spezifische Unterschiede aufweisen könnte. *SWEET*-Gene sind oft in Sink-Geweben exprimiert, wo sie wahrscheinlich in die Nährstoffversorgung symplastisch isolierter Gewebe involviert sind (Chen *et al.*, 2010). Die Induktion der *Sweet*-Gene in Mais während der Interaktion mit *U. maydis* könnte daher ebenso als Nebeneffekt bei der Bildung einer metabolen Senke im infizierten Gewebe auftreten. Dafür spricht, dass in den bereits als Sink-Organen etablierten Fahnen nach Infektion keine erhöhte Expression von *Sweet*-Genen beobachtet wurde. Es ist jedoch bekannt, dass *U. maydis* u.a. Effektorgene organspezifisch exprimiert (Skibbe *et al.*, 2010), weshalb auch eine Source-spezifische Induktion denkbar ist. Da über die Regulationsmechanismen der *Sweet*-Gene bisher nur wenig bekannt ist, sind weitere Erkenntnisse in dieser Richtung nötig um deren Induktion während der Infektion mit *U. maydis* näher zu charakterisieren.

3.3 Hxt1 ist der wichtigste Glucose-Transporter in *U. maydis*

Die Deletion von *hxt1* führt zu einer reduzierten Virulenz und zu einem reduzierten Wachstum auf Glucose-, Fructose- und Mannose-haltigen Medien (Wahl, 2009). Eine Erklärung dieser Phänotypen durch die fehlende Transportfunktion von Hxt1 in *hxt1*-Deletionsstämmen liegt nahe. Das verminderte Wachstum und die signifikant verminderte Aufnahme von [¹⁴C]-Glucose durch *hxt1*-Deletionsstämmen (Abb. 2.6 und 2.16) zeigen zudem, dass Hxt1 der wichtigste Glucose-Transporter in *U. maydis* ist.

Der große Anteil von Hxt1 an der Glucose-Aufnahmekapazität von *U. maydis* kann neben einem möglicherweise konzentrationsunabhängigen sehr effizienten Glucose-Transport auch durch die starke Expression von *hxt1* erklärt werden. In RNA-Sequenzierungsanalysen gehörte das *hxt1*-Transkript zu den 40 am häufigsten detektierten mRNAs in *U. maydis*

(N. Kellner, J. Kämper, pers. Mitteilung). Auch wenn man von einer Korrelation von hoher Affinität mit niedriger Transportkapazität ausgeht, wie es bereits für andere Transportsysteme gezeigt wurde (Delrot und Bonnemain, 1981; Leonardi *et al.*, 1998), könnte der hoch affine Transporter Hxt1 durch seine starke Expression für einen signifikanten Teil der Glucose-Aufnahme auch bei höheren extrazellulären Konzentrationen verantwortlich sein. Eine weitere Erklärung für das deutlich reduzierte Wachstum wäre eine Sensorfunktion von Hxt1, die zur Regulation weiterer Glucose-Transporter nötig ist. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Deletion von *hxt1* in Glucose-haltigem Medium nicht zu einer veränderten Expression putativer Glucose-Transporter in *U. maydis* führt (Wahl, 2009). Um den Anteil von anderen Zuckertransportern an der Glucose-Aufnahme in *U. maydis* aufzuklären, müssten Mehrfachdeletionen im *hxt1*-Deletionshintergrund durchgeführt werden, da zumindest die Einzeldelation von drei in axenischer Kultur exprimierten, putativen Transportern (*um02037*, *um05033* und *um10072*) zu keinem sichtbaren Wachstumsdefekt auf Glucose-haltigem Medium führten (nicht gezeigt).

Die Expression der Hexosetransporter aus *C. graminicola* bzw. *A. thaliana* im *hxt1*-Deletionsstamm zeigte, dass unter der Kontrolle des *hxt1*-Promotors auch andere hoch und niedrig affine Transporter in der Lage sind, den Wachstumsdefekt auf Glucose-haltigem Medium zu kompensieren (Abb. 2.15 B). Jedoch waren auch die beiden hoch affinen Transporter CgHXT3 und AtSTP1 nicht ausreichend, um die reduzierte Virulenz des *hxt1*-Deletionsstamms vollständig wiederherzustellen. Dies ist wahrscheinlich auf einen im Vergleich zu Hxt1 weniger effizienten Transport unter den Bedingungen im Apoplast zurückzuführen. Da die Affinitäten der Transporter für Glucose mit K_m -Werten von 6,6 μM (Hxt1), 13 μM (CgHXT3), 20 μM (AtSTP1) auf vergleichbar hohem Niveau liegen (Boorer *et al.*, 1994; Lingner *et al.*, 2011; Sauer *et al.*, 1990; Sherson *et al.*, 2000; Wahl, 2009), könnte eine geringere Aufnahme anderer Zucker wie z.B. Fructose oder eine durch die Expression im heterologen System bedingte geringere Transporteffizienz zu dem beobachteten Unterschied führen. Als Ursache ebenfalls nicht auszuschließen ist eine zusätzliche Sensorfunktion von Hxt1, die durch CgHXT3 bzw. AtSTP1 nicht komplementiert werden kann.

3.4 Hxt1 ist ein potentieller Glucose-Sensor

Neben dem verminderten Wachstum auf Glucose-haltigem Medium führte die Deletion von Hxt1 auch zu einem verbesserten Wachstum auf Galactose- bzw. Xylose-haltigen Medien, was durch eine putative Sensorfunktion erklärt wurde (Wahl, 2009). Membranständige Glucose-Rezeptoren mit Ähnlichkeit zu Hexosetransportern wurden bereits in verschiedenen Hefen beschrieben: Snf3p und Rgt2p in *S. cerevisiae*, Hxs1 in *H. polymorpha*, Rag4 in

K. lactis und Hgt4 in *C. albicans* spielen eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation von Hexosetransportern als Antwort auf extrazelluläre Glucose-Signale (Betina *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006; Ozcan *et al.*, 1996; Stasyk *et al.*, 2008). Diese Sensoren besitzen im Gegensatz zu Hexosetransportern keine Transportaktivität und weisen einen langen, C-terminalen, zytoplasmatischen Fortsatz auf, der in die Signalweiterleitung involviert ist. Der Austausch eines konservierten Arginins zu Lysin führt bei diesen Transportern zu einem konstitutiv aktiven Signalweg und damit zur Glucose-unabhängigen Induktion von Hexosetransportern (Betina *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006; Ozcan *et al.*, 1996; Stasyk *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass die Mutation zu einer Konformationsänderung führt, die eine Glucose-Bindung imitiert (Ozcan und Johnston, 1999). Die Signalweiterleitung in *K. lactis* und *C. albicans* erfolgt, analog zu *S. cerevisiae*, über die funktionelle Homologe von Yck1/2p, Mth1p und Std2p sowie des Repressors Rgt1p (vgl. Abb. 1.6; Moriya und Johnston, 2004; Rolland *et al.*, 2006b; Sexton *et al.*, 2007). Auch in *H. polymorpha* wird ein entsprechender Signalweg vermutet, da im Genom die zu den o.g. Signalkomponenten homologen Proteine kodiert sind (Stasyk *et al.*, 2008).

Obwohl Hxt1 aus *U. maydis* in den o.g. Organismen jeweils das ähnlichste Protein zu den beschriebenen Sensoren darstellt, unterscheidet es sich in mehreren Punkten von ihnen. So ist Hxt1 zum Transport von Hexosen in der Lage und besitzt nur 55 C-terminale, zytoplasmatische Aminosäuren im Vergleich zu den 217 bzw. 342 zytoplasmatischen Aminosäuren am C-Terminus von Rgt2p bzw. Snf3p. Im Gegensatz zu den bekannten Sensoren scheint Hxt1 zumindest in axenischer Kultur keinen Einfluss auf die Expression anderer Zuckertransporter zu haben, wie Expressionsanalysen des *hxt1*-Deletionsstamms in Glucose-haltigem Medium zeigten (Wahl, 2009). Auch die Komponenten des Snf3/Rgt2-Signalwegs sind in *U. maydis* mit Ausnahme einer putativen Casein Kinase (Um00274.2, 70% Sequenzidentität zu ScYck1p, $E=3,9e^{-128}$, WUBLAST MUMDB) nicht konserviert.

Während es sich bei den o.g. Organismen, in denen bisher Rgt2p/Snf3p-ähnliche Sensoren beschrieben wurden, ausschließlich um Ascomyceten handelt, wurden erst kürzlich auf Basis der Homologie zu Rgt2p und Snf3p die beiden Hexosesensor-ähnlichen Proteine Hxs1 und Hxs2 in dem mit *U. maydis* näher verwandten Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* identifiziert (Liu *et al.*, 2013). Hxs1 und Hxs2 sind die UmHxt1-ähnlichsten Proteine in *C. neoformans* (Hxs1: 43% Sequenzidentität, $E = 4e^{-135}$; Hxs2: 47% Sequenzidentität, $E = 9e^{-127}$, NCBI BLAST) und besitzen wie Hxt1 beide keine zytoplasmatische Verlängerung des C-Terminus. Eine funktionelle Analyse zeigte, dass Hxs1 einen pathogenitätsrelevanten, hochaffinen Glucose-Transporter darstellt; eine Sensorfunktion konnte für Hxs1 jedoch nicht nachgewiesen werden. *HXS2* kodiert der Studie nach für ein nur sehr schwach exprimiertes, nicht-funktionelles Protein (Liu *et al.*, 2013). Somit sind außerhalb der Abteilung der Ascomyceten auch weiterhin keine Hexosetransporter-ähnlichen Zuckersensoren in Pilzen

bekannt. Auch im Fall von Hxt1 deuten die Vergleiche mit den bekannten Sensoren nicht zwangsläufig auf eine Sensorfunktion hin. Dennoch führte die gezielte Mutation in *hxt1*, die zum Austausch des konservierten Arginins 164 zu Lysin führt, im Stamm UDS10 (SG200 $\Delta hxt1$ [P_{hxt1} -*hxt1*(R164K)-*gfp*]^{ipm}) zu einem Phänotyp, der nicht allein durch einen Verlust der Transportfunktion zu erklären ist.

3.4.1 Die Überexpression von Hxt1(R164K) im *hxt1*-Deletionshintergrund führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität

Die Expression von Hxt1(R164K)-GFP im *hxt1*-Deletionsstamm führte in axenischer Kultur weder auf Galactose- noch auf Glucose-haltigem Medium zu einer Komplementation des Wachstums (Abb. 2.7). Für den Fall eines von Hxt1(R164K) ausgehenden, konstitutiven Signals war eine Inhibition des Wachstums auf Galactose-haltigem Medium ähnlich wie im WT erwartet worden. Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass das verbesserte Wachstum von *hxt1*-Deletionsstämmen auf Galactose-haltigen Medien durch den Verlust der Transportfunktion und nicht durch den Verlust einer putativen Sensorfunktion bedingt ist. Sowohl das Wachstum der mit Hxt1(R164K) komplementierten Stämme auf Glucose-haltigem Medium als auch die Expression in Hefe zeigen, dass die Mutation in Hxt1(R164K) zum Verlust der Transportfunktion führt. Eine potentielle Sensorfunktion von Hxt1 kann aus diesen Ergebnissen daher nicht abgeleitet werden.

Überraschenderweise führte die Überexpression von Hxt1(R164K)-GFP in SG200 $\Delta hxt1$ im resultierenden Stamm UDS10 (SG200 $\Delta hxt1$ [P_{hxt1} -*hxt1*(R164K)-*gfp*]^{ipm}) zum vollständigen Verlust der Pathogenität. Dieser Phänotyp ist nicht alleine mit dem Verlust der Transportfunktion von Hxt1 zu erklären, da der *hxt1*-Deletionsstamm nur eine leicht reduzierte Virulenz aufweist.

Da Effektoren wie Transmembranproteine im ER synthetisiert und über den klassischen Sekretionsweg in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert werden (de Jonge *et al.*, 2011; Rafiqi *et al.*, 2012), könnte die Überexpression eines funktionslosen Transmembranproteins theoretisch durch eine Überlastung der Sekretionsmaschinerie mit der Sekretion von pathogenitätsrelevanten Effektoren interferieren. Auch ein Auslösen der „unfolded protein response“ (UPR), die neben der Antwort auf ungefaltete Proteine im ER einen für die frühe pathogene Entwicklung essentiellen Regulationsmechanismus in *U. maydis* darstellt (Heimel *et al.*, eingereicht), könnte prinzipiell zum Abbruch der pathogenen Entwicklung führen.

Jedoch sollte ein äquivalenter Nebeneffekt auch durch eine Überexpression von Hxt1(R164K)-GFP im WT-Hintergrund oder die Überexpression von Hxt1(E412K)-GFP (besitzt ebenfalls keine Transportfunktion, siehe Abb. 6.8 und 6.9) in SG200 $\Delta hxt1$ ausgelöst werden. In beiden Fällen kommt es jedoch zu keiner Beeinträchtigung der Pathogenität im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen (Abb. 6.7 und 6.10 im Anhang), was ein

Überexpressionsartefakt als Ursache für den Verlust der Pathogenität von UDS10 unwahrscheinlich erscheinen lässt. Zudem konnte weder auf der Pflanzenoberfläche noch in axenischer Kultur eine veränderte Expression des konservierten UPR Zielgens *bip1* (*um15034*, K. Heibel, pers. Mitteilung) in UDS10 beobachtet werden (nicht gezeigt).

Ein zusätzlicher Hinweis auf einen spezifischen Effekt der Mutation und damit auf ein konstitutives Signal ist die räumliche Nähe, in der sich die Aminosäuren Arginin 164 und Serin 222 der prognostizierten Topologie von Hxt1 zufolge befinden (Abb. 2.11). Da nur die Überexpression von Hxt1(R164K) oder Hxt1(S222L) den Verlust der Pathogenität zur Folge hatte, könnten beide Mutationen eine ähnliche Konformationsänderung in Hxt1 bewirken und so zu einem von Hxt1 ausgehenden Signal führen. Beide Aminosäuren sind sowohl in Hexosetransportern als auch in den bekannten Glucose-Sensoren hochkonserviert. Es wäre daher denkbar, dass eine zu Hxt1(S222L) analoge Mutation in Rgt2p/Snf3p-ähnlichen Sensoren ebenfalls zu einem konstitutiven Signalweg führt. Bis jetzt liegen jedoch keine Studien zu entsprechenden Mutationen vor.

Der Nährstoffstatus stellt in vielen Fällen ein entscheidendes Signal für Entwicklungsschritte dar. So führt beispielsweise ein Nährstoffmangel zu einem Pseudohyphen-Wachstum und zur Sporulation von diploiden Zellen der Bäckerhefe und in *C. albicans* stellt *N*-Acetylglucosamin ein Signal zum Wechsel vom Knospungswachstum zum infektiösen Hyphenwachstum dar (Biswas *et al.*, 2007; Lengeler *et al.*, 2000). Auch für *U. maydis* wird eine Integration von Umweltsignalen, wie die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten, in die Regulationsmechanismen der initialen pathogenen Entwicklung postuliert (Hartmann *et al.*, 1999; Kahmann und Kämper, 2004; Kruger *et al.*, 1998). Da kein Einfluss auf die pheromonvermittelte Fusion haploider Zellen gefunden wurde und die pathogene Entwicklung von UDS10 bereits direkt nach dem Eintritt in die Pflanze abbricht (Abb. 2.9 und 2.10), kann der Einfluss von Hxt1(R164K) bzw. eines putativen Hxt1-abhängigen Signals auf die pathogene Entwicklung auf ein enges Zeitfenster nach der Fusion der Hyphen und vor der Proliferation in der Pflanze eingegrenzt werden. Expressionsanalysen, die zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden, zeigen u.a. eine Hxt1(R164K)-abhängige Repression von Genen alternativer Kohlenhydratstoffwechselwege und putativen Zuckertransportern, die auf eine Funktion von Hxt1 bei der Glucose-Repression hindeuten.

3.4.2 Die Auswirkungen von Hxt1(R164K) auf die Genexpression

Die auf der Blattoberfläche detektierten, globalen Expressionsunterschiede in UDS10 waren trotz des Abbruchs der pathogenen Entwicklung im untersuchten Zeitfenster im Vergleich zu den pathogenen Stämmen SG200 bzw. SG200 Δ *hxt1* relativ gering. Die deutliche differenzielle Regulation von *bE* und *mfa1* in axenischer Kultur, die als Hinweis auf einen Defekt bei der Initiation des Pathogenitätsprogramms in UDS10 gedeutet worden war,

konnte bei der Transkriptomanalyse nicht mehr detektiert werden (fold change im Vergleich zu SG200/SG200 Δ *hxt1*: *bE* -1,5/+1,1; *mfa1* -1,7/-1,3). Möglicherweise handelte es sich dabei um einen transienten Effekt, da er sechs Stunden nach dem Wechsel des Mediums, aber nicht mehr nach 24 Stunden auf der Pflanzenoberfläche beobachtet werden konnte.

Die gravierenden Expressionsunterschiede, die in Verbindung mit einem Abbruch der pathogenen Entwicklung erwartet wurden, treten wahrscheinlich nicht bereits auf der Pflanzenoberfläche sondern erst nach der Penetration der Pflanze auf. Bei Infektionen mit Sporidien-Suspensionen von *U. maydis* bildet der überwiegende Teil der inokulierten Zellen im Allgemeinen keine Appressorien und penetriert die Pflanzenoberfläche nicht (nicht gezeigt). Daher befand sich wahrscheinlich nur ein sehr kleiner Anteil der geernteten Zellen im Penetrationsstadium. Durch eine effiziente Anreicherung penetrierender Hyphen könnten die fraglichen Expressionsunterschiede möglicherweise besser detektiert werden. Dazu käme theoretisch das Ausschneiden einzelner *U. maydis* Zellen durch Laser-Mikrodissektion in Frage. Diese Methode ist jedoch sehr zeit- und kostenintensiv und führte bei bisherigen Versuchen nicht zu einer für Microarray-Analysen ausreichenden Anreicherung pilzlicher RNA (V. Walbot, pers. Mitteilung). Die auf der Blattoberfläche detektierten Expressionsunterschiede müssen daher als Indizien für Änderungen angesehen werden, die im weiteren Verlauf der Infektion zum Verlust der Pathogenität führen.

Die Repression von bekannten und putativen Effektorgenen in UDS10 (siehe Gene in Cluster 1 in Abb. 2.13 und, Tab. 2.4) kann als Ursache für eine erfolglose Infektion angesehen werden. Dass sich unter diesen Genen die beiden bereits bekannten, pathogenitätsrelevanten Gene *pep1* und *pst1* befinden, verstärkt diesen Eindruck. Das Pst1-Protein besitzt neben einem Signal-Peptid zur Sekretion auch eine vorhergesagte Kernlokalisations-Sequenz und ein Pst1-GFP Fusionsprotein konnte bei der Expression in Tabakzellen im Zellkern lokalisiert werden. Die Deletion von *pst1* führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität, die durch die ektopische Expression von *pst1* wiederhergestellt werden kann (Langner, 2010). Pep1 lokalisiert nach der Penetration der Pflanze im Apoplast und inhibiert die ROS-Antwort der Pflanze durch eine Interaktion mit der Mais-Peroxidase POX12. Die pathogene Entwicklung von *pep1*-Deletionsstämmen bricht direkt nach Penetration der Pflanze ab und es kommt zu einer starken Induktion der Pflanzenabwehr, die sich u. a. durch die Bildung von Nekrosen auszeichnet (Doehlemann *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2012).

Bei einer unzureichenden Expression dieser und weiterer Effektorgene würde daher u.a. eine Induktion von Abwehrmechanismen erwartet. Eine Färbung von UDS10-infizierten Blättern mit Diamino-Benzidin, die der Visualisierung von reaktiven Sauerstoffspezies dient, blieb jedoch ohne sichtbares Ergebnis (nicht gezeigt). Es wurden weder nekrotische Läsionen auf den infizierten Blättern noch die Bildung von Papillen-förmigen Strukturen an

den Infektionsstellen festgestellt, wie es bereits zuvor bei apathogenen Effektorvarianten beobachtet wurde (Hofmann, 2012). Somit konnten keine Anzeichen für eine erhöhte Pflanzenabwehr gefunden werden. Um eine solche weiter auszuschließen, könnte zusätzlich die Expression von PR-Genen in infizierten Pflanzen als Antwort auf eine Infektion mit UDS10 untersucht werden. Einigen der Effektoren könnten auch andere Aufgaben bei der Etablierung der biotrophen Interaktion zukommen, so dass sich deren Repression nicht in einer induzierten Pflanzenabwehr widerspiegelt.

Dass die Repression der Effektorgene nicht die Hauptursache für den apathogenen Phänotyp darstellt, deutet jedoch die bereits stark reprimierte Expression der meisten dieser Gene in SG200 Δ *hxt1* im Vergleich zu SG200 hin. Gemessen daran war die Expression dieser Gene in UDS10 nur leicht weiter reduziert, was für die neun am stärksten reprimierten Gene zur Verdeutlichung in Form eines Diagramms dargestellt ist (siehe Abb. 3.1).

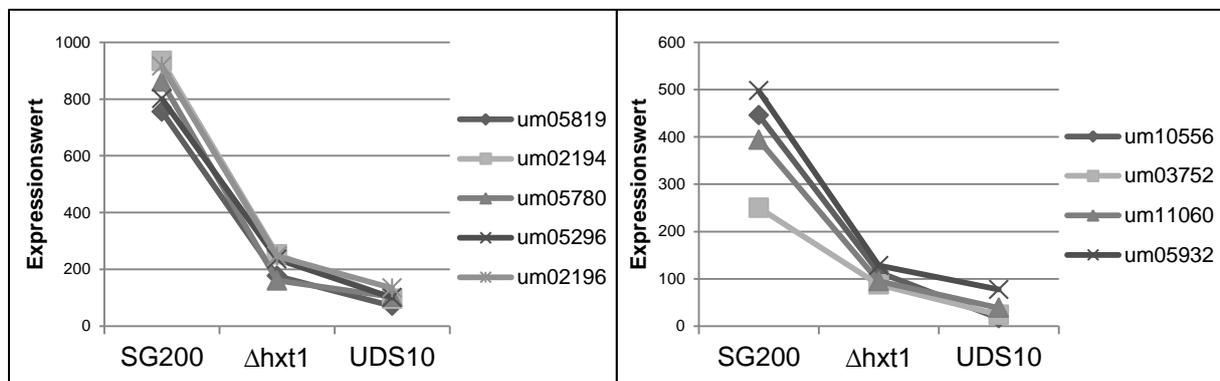


Abb. 3.1 Expression putativer Effektorgene in SG200, SG200 Δ *hxt1* und UDS10 auf der Pflanzenoberfläche. Gezeigt sind gemittelte Expressionswerte der neun Gene aus Cluster 1, die in UDS10 im Vergleich zu SG200 am stärksten reprimiert waren (vgl. Abb. 2.14 und Tab. 2.4). Alle Gene werden sowohl in UDS10 als auch in SG200 Δ *hxt1* deutlich schwächer exprimiert als in SG200. Die Daten entstammen den Microarray-Analysen von der Blattoberfläche (vgl. Tab. 6.4 im Anhang).

Die Repression der Gene wird daher wahrscheinlich bereits durch den Verlust der Transportfunktion von Hxt1 in SG200 Δ *hxt1* hervorgerufen und könnte in UDS10 durch einen nicht näher bekannten Nebeneffekt weiter verstärkt werden. Die Überlappung der Gene aus Cluster 1 mit Biz1-regulierten Genen könnte auf die Integration eines Nährstoffsignals bei der Biz1-abhängigen Genregulation hindeuten. Möglicherweise trägt die reprimierte Expression dieser Gene zur reduzierten Virulenz von SG200 Δ *hxt1* bei. Eine entsprechend reduzierte Virulenz wäre dementsprechend auch in UDS10 zu beobachten, jedoch führt in diesem Stamm sehr wahrscheinlich die Deregulation weiterer Gene zum vollständigen Verlust der Pathogenität. Diese sind in Cluster 2 oder 3 zu suchen, da die Regulation dieser Gene UDS10 als einzigen apathogenen Stamm von den beiden anderen Stämmen deutlich unterscheidet (vgl. Abb. 2.13). Da die drei in UDS10 am stärksten reprimierten Gene aus

Cluster 1 (*um10556*, *um05819*, *um03752*) im Gegensatz zu *SG200Δhxt1* als nicht exprimiert (absent) gewertet wurden (Tab. 6.4 im Anhang), muss jedoch auch deren Repression als Ursache für den Verlust der Pathogenität in Betracht gezogen werden. Die Deletion dieser Gene kann weiteren Aufschluss über ihre Relevanz für die Pathogenität geben.

Unter den 51 in UDS10 induzierten Genen in Cluster 3 konnten durch Verwendung des FunCats-Servers 10 bzw. 5 in die Kategorien „Detoxification“ und „Peroxisome“ eingeordnet werden, was auf einen veränderten Stoffwechsel hindeuten könnte (Tab. 2.4 und 6.6). Da für die induzierten Gene in Cluster 3 jedoch weder zur Pathogenität noch zu einem Zuckersignal ein direkter Bezug hergestellt werden konnte, sind diese nicht Gegenstand der weiteren Diskussion. Die Mehrzahl der in UDS10 reprimierten Gene in Cluster 2 konnte dagegen den Kategorien „Metabolism“ bzw. „Carbohydrate Metabolism“ zugeordnet werden (vgl. Abb. 2.13 und Tab. 2.4), was auf einen Zusammenhang mit einem putativen Nährstoffsignal hindeutet. Bereits früher war für den putativen Sensor Hxt1 eine Verbindung zur Glucose-Repression vermutet worden, da im *hxt1*-Deletionsstamm in Anwesenheit von Glucose eine erhöhte Expression Gluconeogenese-assoziiierter Gene beobachtet wurde (Wahl, 2009). Auch in *H. polymorpha* wurde mit Gcr1 ein Hexosetransporter-ähnliches Protein identifiziert, das trotz einer fehlenden C-terminalen Extension möglicherweise eine Sensorfunktion besitzt. Die Deletion von *GCR1* führte zu einer erhöhten Expression peroxisomaler Enzyme, die in WT-Zellen nur unter Kohlenstoffmangelbedingungen beobachtet werden konnte, weshalb eine Sensor-Funktion von Gcr1 bei der Glucose-Repression postuliert wurde (Stasyk *et al.*, 2004). Im Allgemeinen wird angenommen, dass im Gegensatz zur Glucose-vermittelten Induktion von Genen, die Glucose-Repression eine Aufnahme von Glucose in die Zelle voraussetzt (Betina *et al.*, 2001; Kruckeberg und Bisson, 1990). In den beiden o.g. Fällen könnte die Deletion der Transporter daher auch über eine reduzierte Glucose-Aufnahme zu einer verminderten Glucose-Repression führen. Im Gegensatz dazu wurde in UDS10 eine verstärkte Repression von Glucose-reprimierten Genen auf der Pflanzenoberfläche beobachtet (vgl. Tab. 2.4 Cluster 2, Abb. 6.11 und Tab. 6.5). Eine erhöhte Aufnahme von Glucose als Ursache ist unwahrscheinlich, da Hxt1(R164K) selbst keine Transportaktivität besitzt und im Vergleich zu den Kontrollstämmen keine anderen Transportergene induziert waren. Ein von Hxt1(R164K) ausgehendes, konstitutives Signal könnte daher positiv auf die Glucose-Repression wirken, was gut mit der postulierten Glucose-gebundenen Konformation von Hxt1(R164K) zu vereinbaren wäre. Auch die in UDS10 beobachtete Deregulierung Glucose-abhängig exprimierter Gene (Abb. 2.12) und das generell leicht verschlechterte Wachstum auf hexosehaltigen Medien (Abb. 2.7) deuten auf ein manipuliertes Zuckersignal hin.

3.4.3 Modell zur Integration eines Hxt1(R164K)-abhängigen Signals in pathogenitätsrelevante Entwicklungsschritte

Eine allein von Hxt1(R164K) abhängige Deregulierung bekannter Pathogenitätsfaktoren auf der Pflanzenoberfläche konnte nicht beobachtet werden. Ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen einem putativen Zuckersignal und dem Verlust der Pathogenität ergibt sich aus den Expressionsdaten daher nicht. Über die Signale, welche zur Induktion der biotrophen Wachstumsform nötig sind, ist bisher nichts bekannt. Eine cAMP-abhängige Regulation wäre aber denkbar, da in *U. maydis* auch die Paarung und der morphogenetische Wechsel vom Hefe-artigen zum filamentösen Wachstum u.a. über cAMP reguliert werden (Gold *et al.*, 1994a; Regenfelder *et al.*, 1997), zusammengefasst in (Garcia-Pedrajas *et al.*, 2008). Die G-Protein- α -Untereinheit Gpa3 und weitere Komponenten des cAMP-Signalwegs sind außerdem in solopathogenen Stämmen für die Ausbildung von Krankheitssymptomen essentiell, was zeigt, dass cAMP auch nach der Paarung eine Rolle für die pathogene Entwicklung spielt (Kruger *et al.*, 2000; Regenfelder *et al.*, 1997). Durch die Verwendung des konstitutiv aktiven Allels *gpa3*_{Q206L} bzw. der Deletion der regulatorischen Untereinheit der PKA *ubc1* wurde weiterhin gezeigt, dass ein konstitutiver cAMP-Signalweg die Ausbildung von Tumoren und die Proliferation innerhalb der Tumore zwar beeinträchtigt, die pathogene Entwicklung aber nicht vollständig verhindert (Gold *et al.*, 1997; Kruger *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass über Gpa3 ein umwelt- oder nährstoffabhängiges Signal in den cAMP-Signalweg integriert wird und dieses so in die Regulation der sexuellen und biotrophen Entwicklung einfließt (Hartmann *et al.*, 1999; Kruger *et al.*, 1998). Ein entsprechender Rezeptor ist bisher nicht bekannt und Hxt1 könnte diese Funktion theoretisch ausfüllen. Jedoch besitzen im Gegensatz zu Hxt1 alle bisher bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nur sieben Transmembrandomänen (Rosenbaum *et al.*, 2009). Zudem wäre bei einer direkten Beteiligung von Hxt1 in diesem Signalweg für ein von Hxt1(R164K) ausgehendes, konstitutives Signal ein über Hxt1 dominanter Effekt zu erwarten, das Gegenteil war jedoch der Fall (Abb. 2.10 und 6.7).

Da von den reprimierten Genen aus Cluster 2 auch drei für putative Zuckertransporter kodieren (*um10072*, *um05033*, *um06076*, siehe Tab. 6.5), könnte die von Hxt1(R164K) induzierte Repression den cAMP-Signalweg indirekt über eine reduzierte Aufnahme von Kohlenhydraten beeinflussen. Es wäre denkbar, dass nach dem Eintritt in die Pflanze ein Zuckerimport nötig ist, um nährstoffabhängiges cAMP-Signal zu generieren, welches für die Initiation der biotrophen Entwicklung notwendig ist. Neben dem in *U. maydis* postulierten, Gpa3-abhängigen Einfluss von Nährstoffen auf den cAMP-Signalweg ist eine Integration von Nährstoffsignalen über cAMP z.B. aus Pankreas-Zellen bekannt, wo Glucose die cAMP-abhängige PKA aktiviert und so die Insulin-Ausschüttung induziert (Costes *et al.*, 2004; Hatakeyama *et al.*, 2006). Auch in Hefe führt die Zugabe von präferierten Kohlenhydraten zu

de-reprimierten Zellen zu einer transienten Aktivierung des cAMP-Signalwegs (Kraakman *et al.*, 1999; Thevelein und de Winde, 1999). Dieser Signalweg wird zwar über die Detektion extrazellulärer Glucose durch den G-Protein gekoppelten Rezeptor Gpr1 induziert, gleichzeitig ist jedoch auch die Aufnahme von Kohlenhydraten und die Phosphorylierung von Glucose essentiell für die Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA (Rolland *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2001). Der zugrunde liegende Mechanismus, bei dem der Glucose-Stoffwechsel die Aktivität der cAMP-abhängigen PKA wahrscheinlich durch ein ATP-abhängiges Signal beeinflusst, ist in Hefe- und Säugerzellen konserviert. Die Signalweiterleitung erfolgt dabei über Änderungen des zytosolischen pH-Werts, welcher als sekundärer Botenstoff fungiert, sowie die Aktivität einer vakuolären ATPase, welche den entsprechenden pH-Sensor darstellt und zur Aktivierung der PKA notwendig ist (Dechant *et al.*, 2010). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei dem Glucose-induzierten cAMP-Anstieg in *C. albicans* involviert sein, da gezeigt werden konnte, dass dieser unabhängig von dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor CaGpr1 erfolgt (Maidan *et al.*, 2005).

Bei einem analogen Mechanismus in *U. maydis* wäre der cAMP-Spiegel im dikaryotischen Filament durch die Mangelbedingungen auf der Pflanzenoberfläche wahrscheinlich reprimiert. Die Aufnahme von Kohlenhydraten nach der Penetration wird wahrscheinlich durch Hxt1 sowie alternative Zuckertransporter vermittelt, deren Transportkapazität auch in SG200 Δ *hxt1* noch ausreichend für die Aktivierung des cAMP-Signalwegs über die glycolytische Aktivität zu sein scheint. In UDS10 könnte die Aktivierung des cAMP-Wegs dagegen ausbleiben, da aufgrund der fehlenden Transportaktivität von Hxt1(R164K) und der gleichzeitigen Repression alternativer Zuckertransporter nicht genügend Nährstoffe in die Zelle gelangen (siehe Modell in Abb. 3.2).

Die putative Sensorfunktion von Hxt1 würde dieser Hypothese nach die pathogene Entwicklung nur indirekt beeinflussen, weshalb möglicherweise nur eine Überexpression von Hxt1(R164K) zum Verlust der Pathogenität führt. Auch ein direkter Einfluss von Hxt1 auf den cAMP-Signalweg in der Funktion eines Sensors für extrazelluläre Zucker wäre denkbar. Wie bereits erwähnt, sollte ein konstitutives Signal von Hxt1(R164K) dann jedoch dominant über das WT-Allel sein bzw. ein durch die Mutation verursachter Verlust von Transport- und Sensorfunktion zum Phänotyp des *hxt1*-Deletionsstamms führen. Nach dem beschriebenen Modell wäre ein Hxt1-vermittelter Transport dominant über ein von Hxt1(R164K) ausgehendes Signal, was erklären könnte, warum es bei der gleichzeitigen Expression von Hxt1 und Hxt1(R164K) zu keiner Beeinträchtigung der Pathogenität kommt (vgl. Abb. 2.10 und 6.7). Dass kein *hxt1*-Allel gefunden wurde, welches sowohl einen Zuckertransport als auch den Verlust der Pathogenität vermittelt, könnte einen weiteren Hinweis auf eine fehlende Transportaktivität als Ursache für den apathogenen Phänotyp von UDS10 darstellen.

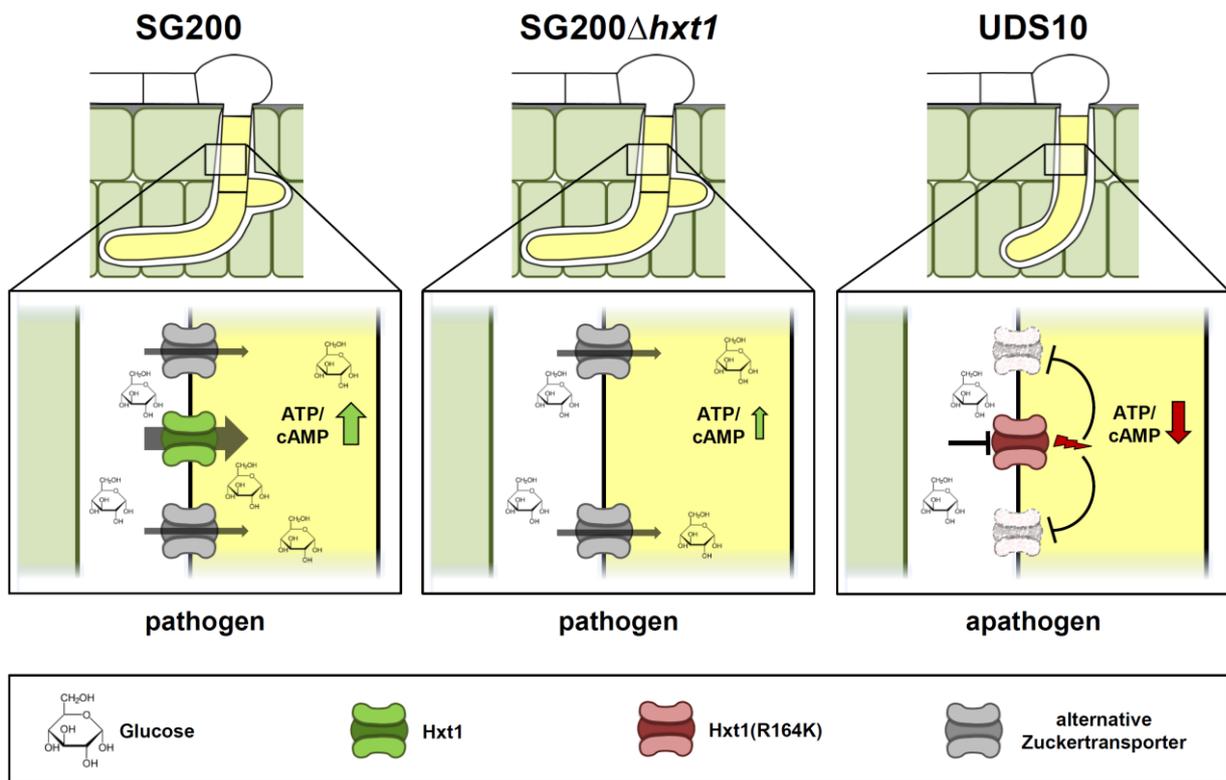


Abb. 3.2 Modell für die Auswirkungen der Überexpression von Hxt1(R164K) im *hxt1*-Deletionshintergrund. Nach Penetration der Pflanze könnte ein intrazelluläres Nährstoffsignal nötig sein, um die biotrophe Phase einzuleiten. Dieses könnte über Änderungen des ATP- oder cAMP-Spiegels detektiert und weitergeleitet werden. In SG200 und SG200 Δ hxt1 werden apoplastische Kohlenhydrate durch Hxt1 bzw. durch alternative Zuckertransporter aufgenommen. In UDS10 wird infolge der Überexpression von Hxt1(R164K) die Expression alternativer Zuckertransporter (*um10072*, *um05033*, *um06076*) reprimiert. Da Hxt1(R164K) selbst keinen Transport vermittelt, kann kein Nährstoffsignal generiert werden, das zur Fortsetzung der pathogenen Entwicklung nötig wäre.

Der beschriebene Mechanismus kann zwar die meisten beobachteten Phänotypen erklären, er ist jedoch sehr spekulativ und müsste durch weitere Experimente näher untersucht werden. So sollte beispielsweise durch eine konstitutive Expression der in UDS10 reprimierten Transporter oder anderer Hxt1-ähnlicher Transporter die Pathogenität von UDS10 wiederhergestellt werden können. Die hier postulierten, unterschiedlichen intrazellulären Zuckerkonzentrationen in UDS10 und SG200 nach der Penetration der Pflanzenoberfläche könnten durch den Einsatz von zytoplasmatisch lokalisierten, FRET-basierten Glucose-Nanosensoren detektiert werden (Deuschle *et al.*, 2005; Frommer *et al.*, 2009). Durch das Einbringen des *gpa3*_{Q206L}-Allels bzw. der Deletion von *ubc1* in UDS10 könnte der potentiell reduzierte cAMP-Spiegel und der daraus resultierende Pathogenitätsverlust komplementiert werden, da in *gpa3*_{Q206L} Stämmen bzw. Δ *ubc1*-Stämmen der cAMP-Weg konstitutiv aktiv ist und diese noch in der Lage sind Tumore zu induzieren (Gold *et al.*, 1997; Kruger *et al.*, 1998; Kruger *et al.*, 2000). Weitere

Transkriptomanalysen von UDS10 könnten zudem zeigen, ob Hxt1(R164K) auch in axenischer Kultur zur Repression von Stoffwechselgenen führt, was eine Sensorfunktion bestätigen würde.

3.5 Die mögliche Doppelfunktion von Hxt1 als Transporter und Sensor

Ausgehend von einer Sensorfunktion deuten die Expressionsdaten auf eine Funktion von Hxt1 bei der Glucose-Repression hin. Da in *U. maydis* keine näheren Homologe zu reinen Glucose-Sensoren wie Rgt2p oder Snf3p existieren, könnte die Kopplung eines Signalwegs mit einem funktionellen Transporter als zuckerbindendes Protein durchaus einen Weg darstellen, um extrazelluläre Zuckerkonzentrationen zu detektieren. Eine duale Funktion sogenannter „Transzeptoren“ konnte bereits für Aminosäuretransporter in *S. cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* gezeigt werden (Donaton *et al.*, 2003; Goberdhan *et al.*, 2005) zusammengefasst in (Hundal und Taylor, 2009). Transzeptoren werden als evolutionäre Zwischenstufe der Entwicklung von reinen Transportern zu reinen Sensoren angesehen. Dabei wird angenommen, dass die Bindung eines Liganden an einen Transzeptor eine für den Transport nötige Änderung von einer nach außen zu einer nach innen gerichteten Konformation induziert, welche dann den Signalweg auslöst (Thevelein und Voordeckers, 2009).

Eine von Hxt1 ausgehende Signalweiterleitung könnte, analog zum Mechanismus des Rgt2p/Snf3p-Wegs in Hefe, durch die Übertragung der bei der Zuckerbindung auftretenden Konformationsänderung auf eine assoziierte Kinase stattfinden. Dass die in Hxt1 fehlende, C-terminale Verlängerung nicht essentiell für die Signalweiterleitung ist, konnte in Hefe bereits durch die Überexpression eines verkürzten Rgt2p-Derivats gezeigt werden (Moriya und Johnston, 2004).

Die Übertragung des Signals könnte jedoch auch an einem anderen Teil des Proteins stattfinden. So konnte durch die Expression einer zytoplasmatischen Schlaufe des Glucose-Transporters GLUT2 in murinen Leberzellen die Glucose-abhängige Induktion zweier hepatischer Gene inhibiert werden (Guillemain *et al.*, 2000). Die daraus abgeleitete Hypothese einer Transzeptor-Funktion von GLUT2 konnte durch die Identifizierung eines Kernimport-Rezeptors gestützt werden, der mit diesem zytoplasmatischen Teil von GLUT2 interagiert und in die Induktion der beiden Glucose-abhängig regulierten Gene involviert ist (Guillemain *et al.*, 2002). Da in Hxt1 die beiden Aminosäuren, deren Mutation zum Verlust der Pathogenität führt, in räumlicher Nähe zu der entsprechenden zytoplasmatischen Schlaufe zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne liegen (vgl. Abb. 2.11), könnten die Mutationen deren Struktur und so eine mögliche Bindung von

Signalkomponenten beeinflussen. Eine Signalweiterleitung durch Hxt1 nach dem gleichen Prinzip könnte durch die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern mittels einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse untersucht werden, bei der die fragliche zytoplasmatische Schlaufe von Hxt1 als Köder-Protein verwendet wird.

Theoretisch wäre auch eine Signalweiterleitung über Hxt1-assoziierte G-Proteine möglich. Während Hxt1 jedoch zwölf Transmembrandomänen besitzt, beinhalten alle bisher identifizierten, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nur sieben Transmembrandomänen (Rosenbaum *et al.*, 2009). Eine Signalweiterleitung von Hxt1 über G-Proteine würde daher einen unkonventionellen Mechanismus darstellen. Von den vier im Genom von *U. maydis* kodierten G α -Untereinheiten ist nur für Gpa3 eine Funktion bei der Pheromonantwort und der weiteren sexuellen und pathogenen Entwicklung bekannt, während Gpa1, 2 und 4 für die pathogene Entwicklung nicht notwendig sind (Regenfelder *et al.*, 1997). Weder *gpa1*-, *gpa2*- und *gpa4*-Deletionsstämme noch die jeweiligen Doppeldeletionsmutanten im $\Delta hxt1$ -Hintergrund zeigten ein verändertes Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Dillner, 2012; Höll, 2012). Die Untersuchung eines potentiellen gemeinsamen Signalwegs von Hxt1 und Gpa3 und dessen Rolle bei der pathogenen Entwicklung kann ein Ziel zukünftiger Studien darstellen. Eine direkte Interaktion von Hxt1 und Gpa3 erscheint jedoch eher unwahrscheinlich.

Eine Rolle von Hxt1 bei der Glucose-Repression würde von den bisher bekannten Funktionen transporterähnlicher Zuckerrezeptoren abweichen, deren Signalwege im Allgemeinen zu einer Induktion der jeweiligen Zielgene führen (Betina *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006; Ozcan *et al.*, 1996; Sexton *et al.*, 2007; Stasyk *et al.*, 2008). Die aus Hefe bekannten, zuckerabhängigen Regulationsmechanismen scheinen in *U. maydis* jedoch auf molekularer Ebene nicht konserviert zu sein. So hat beispielsweise die Deletion von *snf1* in *U. maydis* keinen Einfluss auf die Verwertung alternativer Kohlenhydrate, während das homologe *SNF1*-Gen in Hefe für einen zentralen Regulator der Glucose-Repression kodiert (Carlson, 1999; Nadal *et al.*, 2010).

Da nur eine Überexpression von Hxt1(R164K) bzw. Hxt1(S222L) zum Verlust der Pathogenität führt, diese in axenischer Kultur jedoch keinen offensichtlichen Effekt hat, scheint ein potentielles, von Hxt1 vermitteltes Signal keinen starken Einfluss zu haben und dürfte eher einen Mechanismus zur Feinregulation der Glucose-Repression darstellen. Wahrscheinlich ist zudem, dass weitere Signalwege an der Glucose-abhängigen Genregulation beteiligt sind. So ist z.B. auch in Hefe neben dem Snf3p/Rgt2p-Signalweg die cAMP/PKA-abhängige Phosphorylierung des Repressors Rgt1p zur Induktion der *HXT*-Gene nötig, die unabhängig von Snf3p bzw. Rgt2p über den Sieben-Transmembrandomänenrezeptor Gpr1p induziert wird (Kim *et al.*, 2006; Kim und Johnston, 2006).

Auch zusammengenommen stellen die Ergebnisse noch keinen letztendlichen Beweis für eine Sensorfunktion von Hxt1 dar. Aufgrund ihrer Transportfunktion ist es schwierig ein von „Transzeptoren“ ausgehendes Signal von den Signalen zu trennen, die durch Änderungen der intrazellulären Konzentrationen ihrer jeweiligen Liganden entstehen. Das Transzeptor-Konzept konnte für aminosäure- oder phosphatbindende Proteine bereits mehrfach gezeigt werden und ist allgemein anerkannt (Hundal und Taylor, 2009; Kriel *et al.*, 2011; Thevelein und Voordeckers, 2009). Bisherige Studien zu putativen Zucker-Transzeptoren liefern dagegen, ähnlich wie die vorliegende Untersuchung, zwar zum Teil Hinweise jedoch keine eindeutigen Belege für eine gekoppelte Sensor- und Transportfunktion (Guillemain *et al.*, 2000; Guillemain *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2013; Stasyk *et al.*, 2004).

Eine Mutation, die zum Verlust der Transport- jedoch nicht der Sensorfunktion führt, kann durchaus ein probates Mittel zur Untersuchung solcher Doppelfunktionen darstellen. In diesem Fall deuten der Verlust der Pathogenität durch eine solche Mutation, die Limitierung dieses Phänotyps auf zwei, in enger räumlicher Nähe zueinander stehenden Aminosäuren (R164 bzw. S222, vgl. Tab. 2.3 und Abb. 2.11) sowie die beobachtete Deregelung von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels als Folge dieser Mutationen auf eine Spezifität hin, die eine Sensorfunktion von Hxt1 befürwortet. Eine essentielle Rolle dieses Hxt1-Signals für die pathogene Entwicklung kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Deletion von *hxt1* die Virulenz nur geringfügig beeinträchtigt und die Mutation bei einer Expression von Hxt1(R164K) im nativen Locus nicht zum Verlust der Pathogenität führte (vgl. Abb. 2.8). Einen weiteren Hinweis darauf, dass die kohlenhydratabhängige Genregulation nicht direkt essentiell für die Initiation des biotrophen Wachstums ist, lieferte die Deletion eines putativen zentralen Regulators der Glucose-Repression. *um04909* kodiert für das mit dem aus Hefe bekannten, zentralen Repressor Mig1p (vgl. Abb. 1.7) am nächsten verwandte Protein (62% Sequenzidentität, $E = 1,5e^{-23}$, NCBI BLAST). Die Deletion von *um04909* führte zu einem starken pleiotropen Wachstumsphänotyp in axenischer Kultur, *um04909*-Deletionsmutanten waren aber dennoch in der Lage, die Pflanze zu kolonisieren, wenngleich dabei auch keine Ausbildung von Tumoren beobachtet werden konnte (R. Wahl, pers. Mitteilung; Bachelorarbeit Jonas Ulrich). Da $\Delta um04909$ -Zellen theoretisch Glucose-dereprimiert sind, widerspricht diese Beobachtung jedoch nicht dem postulierten Zusammenhang der Hxt1(R164K)-induzierten Repression mit dem Abbruch der pathogenen Entwicklung in UDS10.

3.6 Der Hxt1-vermittelte Transport ist ausschlaggebend für die Wachstumsinhibition durch Galactose

Das in Folge der Deletion von *hxt1* verbesserte Wachstum auf Galactose-haltigen Medien war als Hinweis auf eine Sensorfunktion von Hxt1 mit Galactose als möglichem Ligand interpretiert worden. Zur Perzeption von Galactose ist beispielsweise auch der Hxt1-verwandte Glucose-Sensor Hgt4 in *C. albicans* (42% Sequenzidentität, $E = 2e^{-124}$, NCBI BLAST) in der Lage (Brown *et al.*, 2009). Im Verlauf der Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die beobachtete Wachstumshemmung in *U. maydis* mit einem Hxt1-vermittelten Transport von Galactose zusammenhängt. Eines der Indizien dafür stellt die verminderte Galactose-Aufnahme in *hxt1*-Deletionsstämmen dar, die zudem zeigt, dass Hxt1 den wichtigsten Galactose-Transporter in *U. maydis* darstellt (Abb. 2.16). Die Aufhebung der Inhibition durch Glucose, aber nicht durch Saccharose (Abb. 2.14 C) kann ebenfalls durch eine unterschiedliche Galactose-Aufnahme erklärt werden, da Hxt1 Glucose als Transportsubstrat gegenüber Galactose auch bei einem 100-fachen Galactose-Überschuss noch stark präferiert (Wahl, 2009), während Saccharose als Disaccharid nicht durch Hxt1 transportiert wird.

Der toxische Effekt von Galactose ist zudem abhängig von der Expressionsstärke von *hxt1*, da Stämme mit nur einer Kopie des *hxt1*-Expressionskonstrukts ein besseres Wachstum auf Galactose-haltigem Medium zeigten (Abb. 2.14 C). Eine stammspezifische, geringere Expression von *hxt1* könnte auch den Grund für die geringere Galactose-Aufnahme und die daraus resultierende höhere Galactose-Toleranz von BUB8 im Vergleich zu FB1 darstellen (vgl. Abb. 2.14 B und Abb. 2.16). Eine Korrelation von Wachstumshemmung und Galactose-Transport konnte auch bei der Komplementation von SG200 Δ *hxt1* mit heterologen Transportern festgestellt werden, wo der hoch affine Transporter CgHxt3 bereits bei niedrigen, der niedrig affine Transporter CgHxt5 dagegen erst bei hohen Galactose-Konzentrationen zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führte (Abb. 2.15 B; Lingner *et al.*, 2011). Der Transporter AtSTP1 vermittelte eine weniger effiziente Wachstumshemmung, obwohl er als hoch affiner Monosaccharid-Transporter beschrieben wurde, der auch Galactose effizient transportiert (Boorer *et al.*, 1994; Sauer *et al.*, 1990; Sherson *et al.*, 2000). Möglicherweise ist die Funktion von AtSTP1 trotz der Codon-Optimierung durch die heterologe Expression beeinträchtigt. Ein Grund hierfür könnte eine unterschiedliche Zusammensetzung der Membranen von Pflanzen und Pilzen sein, da Membranproteine für eine optimale Aktivität oft ein spezifisches Verhältnis der verschiedenen Membranlipide voraussetzen (Opekarova und Tanner, 2003).

Insgesamt kann der toxische Effekt von Galactose in Abhängigkeit des Transports gesehen werden, der mit der Expression bzw. der Effizienz der jeweiligen Transporter korreliert. Die Komplementation des Galactose-Phänotyps mit drei verschiedenen Transportern aus zwei

unterschiedlichen Organismen schließt eine Sensorfunktion von Hxt1 als Ursache für die Inhibition durch Galactose nahezu aus, da eine erfolgreiche Verknüpfung aller drei Transporter mit nachgeschalteten Signalkomponenten sehr unwahrscheinlich ist.

Obwohl die Aufnahme und der inhibierende Effekt von Xylose nicht näher untersucht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass hier ebenfalls ein Transport von Xylose durch Hxt1 zu einem reduzierten Wachstum auf Xylose-haltigen Medien führt. Auf einen Xylose-Transport durch Hxt1 deutet auch die bereits früher beobachtete Konkurrenz der Hxt1-vermittelten Aufnahme von [^{14}C]-Glucose durch einen 100-fachen molaren Überschuss von Xylose hin, die im Fall von Galactose nicht beobachtet werden konnte (Wahl, 2009).

3.7 Die Wachstumsinhibition durch Galactose

Erste Befunde über eine Galactose-vermittelte Toxizität in Pflanzen reichen bereits fast 100 Jahre zurück (Knudson, 1915; Knudson, 1917). Als limitierender Schritt wird die Umsetzung von UDP-Galactose zu UDP-Glucose vermutet, da eine Überexpression der UDP-Glucose/Galactose Epimerase (*GAL10*) in *A. thaliana*-Keimlingen zu einer reduzierten Galactose-Sensitivität führte (Dormann und Benning, 1998). Vor kurzem konnte ebenfalls in *A. thaliana* gezeigt werden, dass der Verlust der Galactokinase-Aktivität ebenfalls zu einer erhöhten Galactose-Toleranz und zu einer Hyperakkumulation von freier Galactose in den Blättern von *atgalk*-Mutanten führt (Egert *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht Galactose selbst, sondern Gal-1-P oder UDP-Galactose für den toxischen Effekt in Pflanzen verantwortlich sind. Der erfolgreiche Einsatz des *galT*-Gens aus *Escherichia coli*, das für die Gal-1-P-Uridyltransferase kodiert, als Marker für eine Galactose-basierte Selektion transgener Kartoffelpflanzen lässt jedoch eher eine Akkumulation von Gal-1-P als kritischen Faktor für die Galactose-Sensitivität in Pflanzen vermuten (Joersbo *et al.*, 2003).

Auch in Pilzen wurde relativ früh ein im Vergleich mit anderen Zuckern wachstumsinhibierender Effekt von Galactose beobachtet, was jedoch auf eine ineffiziente Aufnahme und Verwertung zurückgeführt wurde (Edgecombe, 1938; Horr, 1936). Eine über alternative Kohlenstoffquellen dominante Galactose-Sensitivität wurde bei saprophytischen Pilzen dagegen bisher nur in Zusammenhang mit Mutationen in den Genen des Leloir-Wegs beschrieben. So ist das Wachstum von *S. cerevisiae* *GAL7*- und *GAL10*-Deletionsstämmen schon bei niedrigen Galactose-Konzentrationen und trotz der Anwesenheit von Ethanol oder Glycerin inhibiert. Dieser inhibierende Effekt kann durch den zusätzlichen Verlust der Galactokinase vollständig aufgehoben werden (Douglas und Hawthorne, 1964; Ross *et al.*, 2004), was wie in Pflanzen auf eine Hemmung durch Zwischenprodukte des Galactose-Stoffwechsels hindeutet. Auch im Menschen ist eine Galactose-Sensitivität in Form der rezessiv vererbten Krankheit Galaktosämie mit Mutationen in den *GAL*-Genen assoziiert.

Während die Krankheit bei einem Defekt der Galactokinase mit relativ milden Symptomen verläuft, können Defekte der Transferase oder der Epimerase unbehandelt zu einem massiveren Krankheitsbild führen das Erbrechen, eine Sepsis oder Leberfunktionsstörungen beinhalten und zum Tod führen kann. Als Langzeitfolgen können trotz strikter Galactose-Diät Störungen der geistigen und motorischen Entwicklung sowie Ovarialinsuffizienz bei Frauen auftreten (Widhalm *et al.*, 1997). Trotz jahrzehntelanger Forschung ist erst wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, die der Galactose-Sensitivität von Galaktosämie-Patienten zugrunde liegen (Lai *et al.*, 2009). Sowohl im Menschen als auch in Hefe bewirkt ein Funktionsverlust der Transferase GalT bzw. Gal7 eine Akkumulation von Gal-1-P in den Zellen. Dessen möglicherweise hemmender Effekt auf die Phospho-Glucomutase (PGM) wird als Ursache der Galactose-Sensitivität diskutiert (Gitzelmann, 1995; Sidbury, 1960). Die PGM katalysiert die Umwandlung von Gluc-1-P zu Gluc-6-P in zwei Schritten: Zunächst wird Gluc-1-P zu Gluc-1,6-Bisphosphat phosphoryliert um im zweiten Schritt bei der Re-Phosphorylierung der PGM in Gluc-6-P umgewandelt zu werden (Najjar und Pullman, 1954). Akkumulierendes Gal-1-P könnte als alternatives Substrat der PGM zur De-Phosphorylierung des PGM-Pools führen, wodurch die Bildung von Gluc-6-P gehemmt wird (Sidbury, 1960). Auf einen derartigen Mechanismus deutet auch eine jüngere Studie hin, in der gezeigt wurde, dass Gal-1-P die Bildung von Gluc-6-P und Gal-6-P hemmt (de Jongh *et al.*, 2008). Auch eine Inhibition der UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGP), welche die Reaktion von UTP und Gluc-1-P zu UDP-Glucose katalysiert, kommt als Ursache in Frage, da in *GALT*-defizienten Fibroblasten eine Reduktion der UDP-Glucose-Vorkommen beobachtet wurde und Gal-1-P mit Gluc-1-P *in vitro* um UGP konkurrieren (Lai und Elsas, 2000; Lai *et al.*, 2003).

Über einen alternativen Stoffwechselweg kann Galactose auch zu Galactitol umgewandelt werden (Gitzelmann *et al.*, 1974; Seiboth und Metz, 2011). In mit Galactose gefütterten Hühnern konnte eine Akkumulation von Galactitol im Hirngewebe beobachtet werden (Wells und Segal, 1969). Hohe Galactitol-Konzentrationen können zu einer Trübung der Linse führen, was eines der Symptome der Galactosämie im Menschen darstellt und möglicherweise durch einen osmotischen Effekt von Galactitol verursacht wird (Bosch, 2006; Hunter *et al.*, 2002). Galactitol wird im Vergleich zur Akkumulation von Gal-1-P jedoch als weniger ausschlaggebend für einen toxischen Effekt angesehen (Lai *et al.*, 2009; Wells und Segal, 1969).

Da die Galactose-vermittelte Inhibition in *U. maydis* dominant über die Anwesenheit des ansonsten gut verwertbaren Zuckers Saccharose ist, scheint Galactose auch in diesem Fall einen toxischen Effekt auszuüben. Dass ein verbessertes Wachstum von zwei unabhängigen Mutanten auf Galactose-haltigen Medien auf den Austausch derselben Aminosäure in der Galactokinase Gal1 zurückgeführt werden konnte, ist neben dem Hxt1-abhängigen

Galactose-Transport ein weiteres Indiz gegen die Verwicklung eines putativen Hxt1-Signalwegs in die Galactose-Inhibition und deutet eher auf eine Ursache im Galactose-Stoffwechsel hin. Die Enzyme des Leloir-Wegs sind in *U. maydis* zwar konserviert, da *U. maydis* in seiner natürlichen Umgebung jedoch wahrscheinlich nie mit hohen Galactose-Konzentrationen konfrontiert wird, wäre es nicht überraschend, wenn der Leloir-Weg durch den fehlenden Selektionsdruck an Effizienz verloren hat und es durch einen Flaschenhals-Effekt zu einer toxischen Akkumulation von Zwischenprodukten des Galactose-Stoffwechsels kommt.

3.7.1 Die Mutation in *gal1(Y67F)* führt zu einer reduzierten Galactokinase-Aktivität

Da eine Mutation in der Galactokinase Gal1 in *U. maydis* zu einem verbesserten Wachstum auf Galactose-haltigem Medium führte, erscheint auch in *U. maydis* eine Akkumulation von Gal-1-P als toxisches Intermediat bei der Galactose-vermittelten Wachstumsinhibition plausibel. Der Austausch von Tyrosin 67 zu Phenylalanin in Gal1 könnte durch eine reduzierte enzymatische Aktivität zu einem reduzierten Gal-1-P Spiegel und einem besseren Wachstum führen. Das hochkonservierte Tyrosin 67 ist zwar Teil der Galactose-Bindedomäne von Gal1, gehört aber nicht zu den Aminosäuren, die Röntgenstrukturanalysen zufolge in den homologen Proteinen aus Hefe und dem Menschen direkt an der Galactose-Bindung beteiligt sind (Thoden *et al.*, 2005a; Thoden *et al.*, 2005b). Die beiden identifizierten Mutationen führen zu einem Austausch von Tyrosin zu den strukturell ähnlichen Aminosäuren Phenylalanin und Histidin, denen im Vergleich zu Tyrosin jedoch eine Hydroxy-Gruppe fehlt. Es liegt daher nahe, dass der Aminosäure-Austausch zum Verlust einer Wasserstoffbrücke führt, der möglicherweise über eine strukturelle Veränderung der Galactose-Bindedomäne die Affinität für Galactose und somit auch die enzymatische Aktivität der Galactokinase beeinträchtigt. Eine reduzierte Affinität für Galactose bzw. eine reduzierte enzymatische Aktivität konnte auch bei einer Reihe von Mutationen der Galactokinasen aus Mensch und Hefe beobachtet werden, welche Aminosäuren der Galactose-Bindedomäne betreffen (Sellick und Reece, 2006; Timson und Reece, 2003)

Da gezeigt werden konnte, dass die Toxizität von 2dGal von der Galactokinase-Aktivität abhängt, deutet auch das relativ gute Wachstum von UDS68 (FB1 *gal1(Y67F)*) auf 2dGal-haltigem Medium bei 28°C auf eine deutlich reduzierte enzymatische Aktivität von Gal1(Y67F) bei dieser Temperatur hin. Da das Wachstum von UDS68 auf diesem Medium bei 19°C stärker inhibiert war, kann von einer höheren enzymatischen Aktivität bei der permissiven Temperatur ausgegangen werden, die dem Wachstum entsprechend jedoch noch deutlich unter der von Gal1 im WT liegt (siehe Abb. 2.19). Darauf deutet auch die Komplementation des Hefestamms BY4741 Δ *gal1* mit Gal1(Y67F) hin: Da in Hefe für das

Wachstum auf Galactose-haltigem Medium die Galactokinase-Aktivität benötigt wird, lässt das schlechtere Wachstum der Gal1(Y67F)-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Gal1-exprimierenden Zellen ebenfalls auf eine reduzierte Aktivität von Gal1(Y67F) bei 19°C bzw. einen fast vollständigen Funktionsverlust bei 28°C schließen (Abb. 2.20).

Die reduzierte Aktivität von Gal1(Y67F) in UDS68 ebenso wie die reduzierte Galactose-Aufnahme in FB1 Δ *hxt1* könnten dazu führen, dass sich die entstehenden Gal-1-P-Konzentrationen unterhalb einer Hemmschwelle bewegen und damit durch die nachfolgenden Enzyme des Leloir-Wegs effizient genug verwertet werden. Das durch die Deletion von *gal7* verringerte Wachstum der Galactose-toleranten Stämme FB1 Δ *hxt1*, UDS68 und UDS68 Δ *hxt1* zeigte, dass der Leloir-Weg für den weiteren Galactose-Stoffwechsel in diesen Stämmen eine Rolle spielt (Abb. 2.21). In Hefe konnte durch die mit Hilfe eines regulierbaren Promotors kontrollierte Expression der Galactokinase gezeigt werden, dass die Galactokinase-Aktivität erst ab einem gewissen Schwellenwert zu einem toxischen Effekt in *GAL7*- und *GAL10*-Deletionsstämmen führt (Mumma *et al.*, 2008). Der vollständige Verlust des Wachstums von UDS68 Δ *gal7* auf Galactose/Saccharose-Medium (Abb. 2.21) lässt vermuten, dass in *U. maydis* bei Abwesenheit der Transferase Gal7 die Gal-1-P-Hemmschwelle noch niedriger liegt und auch die reduzierte Aktivität von Gal1(Y67F) zu einer toxischen Akkumulation von Gal-1-P führt. Umgekehrt führte jedoch eine Überexpression von *gal7* unter der Kontrolle des starken und konstitutiv aktiven *hxt1*-Promotors in FB1 nicht zu einem verbesserten Wachstum auf Galactose-haltigem Medium (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass die *gal7*-Expression allein nicht den postulierten Flaschenhals im Galactose-Stoffwechsel von *U. maydis* darstellt.

Um den Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität der Galactokinase und der Galactose-Toxizität weiter zu untersuchen, wäre eine regulierte Expression nach dem Beispiel von Mumma *et al.*, 2008 vorstellbar. Jedoch sind bisher für *U. maydis* keine dosisabhängig regulierbaren Promotoren bekannt. Zur genaueren Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Gal1(Y67F) sollte in Kooperation mit der AG Voll (Erlangen) die Umsetzung von Galactose zu Gal-1-P durch Zellextrakte von UDS68 und FB1 mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) verglichen werden. Leider lagen die Befunde dieser Untersuchung nicht rechtzeitig vor, um noch in diese Arbeit miteinzufließen.

Der dominante Effekt von *gal1(Y67F)* bei der ektopischen Expression im WT-Hintergrund (Abb. 2.18) ist mit einer reduzierten Enzymaktivität nicht zu vereinbaren. Er kann aber durch die beobachteten Expressionsänderungen von *gal1/gal1(Y67F)* erklärt werden. Die relative Expression der *gal1/gal1(Y67F)*-Transkripte liegt in UDS72 (FB1 [*gal1(Y67F)*]^{ipm}) in Glucose-haltigem Medium etwa vierfach höher war als in FB1 und UDS68, die jeweils nur eine Kopie des Gens tragen. Nach dem Wechsel in Galactose-haltiges Medium stieg sie jedoch nicht an

und hatte nach drei bzw. acht Stunden dasselbe Niveau wie im WT. Für das WT-Allel von *gal1* in UDS72 ergibt sich daraus eine um etwa 75% reduzierte Expression im Vergleich zum WT, da ausgehend vom Expressionswert in Glucose-haltigem Medium etwa drei Viertel des detektierten Transkripts *gal1(Y67F)* zuzuschreiben sind. Wenn sich diese Verhältnisse auf Proteinebene widerspiegeln, setzt sich der Galactokinase-Pool in UDS72 aus 25% WT-Protein und 75% Gal1(Y67F) zusammen, woraus sich eine reduzierte globale Galactokinase-Aktivität ergäbe. Dies könnte auch erklären, warum der dominante Effekt erst nach einer längeren Inkubation beobachtet werden konnte. Wie dieser autoregulatorische Effekt zustande kommt ist nicht bekannt, er kann aber unabhängig davon eine Erklärung für den beobachteten dominanten Effekt darstellen.

3.7.1 Die Mutation in *gal1(Y67F)* führt zu einer stärkeren Induktion der *gal*-Gene

Es konnte gezeigt werden, dass als Folge der Mutation in *gal1* die beiden anderen Enzyme des Leloir-Wegs stärker exprimiert werden. Somit dürfte neben der geringeren enzymatischen Aktivität von Gal1(Y67F) auch eine effektivere Umsetzung von Gal-1-P bzw. UDP-Galactose zu dem verbesserten Wachstum von UDS68 auf Galactose-haltigem Medium beitragen. Dies würde einerseits der Akkumulation von Gal-1-P entgegenwirken und andererseits zur Energiegewinnung beitragen.

Über den Zusammenhang zwischen der Mutation und der veränderten Expression kann nur spekuliert werden. Eine beobachtete Co-Lokalisierung von Gal1-GFP mit dem Zellkern (Abb. 6.13) könnte auf eine zusätzliche Aktivator-Funktion von Gal1 hindeuten, wie sie z.B. auch die Galactokinase in *K. lactis* besitzt (Meyer *et al.*, 1991). Aufgrund der im Vergleich zum WT eher moderaten Expressionsänderungen der *gal*-Gene in UDS68 ist es jedoch unwahrscheinlich, dass der Aminosäure-Austausch in Gal1(Y67F) zu einer konstitutiv aktiven regulatorischen Funktion führt. Ein solcher Effekt wurde bereits für den Austausch verschiedener Aminosäuren von Gal1p in *K. lactis* und Gal3p in *S. cerevisiae* beschrieben (Blank *et al.*, 1997; Menezes *et al.*, 2003; Vollenbroich *et al.*, 1999). Bei den betroffenen Aminosäuren handelt es sich jedoch in keinem Fall um das in Gal1(Y67F) mutierte, hochkonservierte Tyrosin. Die Expressionsdaten zeigen aber auch, dass die *gal*-Gene in *U. maydis* nicht der gleichen strengen Regulation wie in Hefe unterliegen, wo die Expression der strukturellen Gene des Leloir-Wegs durch Glucose reprimiert ist und nach einem Wechsel in Galactose-haltiges Medium bis zu 100-fach induziert wird (Flick und Johnston, 1990). In *U. maydis* scheinen die *gal*-Gene kein Ziel der Glucose-Repression zu sein, da bereits in Glucose-haltigem Medium Ct-Werte von unter 25 gemessen werden konnten, was im Bereich des konstitutiv exprimierten Referenzgens *eIF2b* lag und für ein reprimiertes Gen nicht zu erwarten ist. Im Fall eines konstitutiv aktiven Aktivators Gal1(Y67F) wäre zudem

bereits in Glucose-haltigem Medium eine höhere Expression der *gal*-Gene zu erwarten gewesen.

Auch das Fehlen eines zu dem Repressor Gal80p homologen Proteins in *U. maydis* deutet auf einen von Hefe abweichenden Regulationsmechanismus hin. Weiterhin hatte die Deletion von *um03714* weder in FB1 noch in UDS68 einen Einfluss auf die Induktion von *gal7* und *gal10* (nicht gezeigt). *um03714* kodiert in *U. maydis* für das mit Abstand am nächsten zu dem Transkriptionsfaktor Gal4p in Hefe verwandten Protein (22% Identität, $E = 6e^{-19}$), welches jedoch kein funktionelles Homolog zu ScGal4p darzustellen scheint. Eine vom Hefe-System abweichende Regulation der Leloir-Gene wurde jedoch bereits in anderen Pilzen beobachtet. So kann ein Galactose-Signal in *C. albicans* u.a. über den membranständigen Glucose-Sensor Hgt4p wahrgenommen werden (Brown *et al.*, 2009). Eine transkriptionelle Antwort auf Galactose erfolgt in *C. albicans* unabhängig von Gal3p und Gal4p, während für Gal80p kein Homolog existiert (Martchenko *et al.*, 2007). In *Aspergillus nidulans* ist der Regulator GalR notwendig für das Wachstum auf Galactose-haltigen Medien und die Induktion von Genen des Leloir-Wegs sowie von Genen eines alternativen Galactose-Stoffwechselwegs. GalR ist jedoch nicht mit Gal4p aus Hefe verwandt und es konnten auch keine Homologe von GalR in anderen Ascomyceten gefunden werden (Christensen *et al.*, 2011).

Die beobachteten Expressionsänderungen in UDS68 können daher keinen eindeutigen Hinweis auf eine regulatorische Funktion von Gal1 liefern. Der nur langsame Anstieg der Expression könnte auch auf eine Anpassung an eine veränderte Abundanz von Zwischenprodukten des manipulierten Galactose-Stoffwechsels hindeuten. Eine Genregulation durch Stoffwechsel-Zwischenprodukte ist beispielsweise aus Hefe bekannt, wo Orot-Säure und Dihydroorotat, zwei Intermediate der Pyrimidinsynthese, die Ppr1-abhängige Transkription von Pyrimidinsynthese-Genen stimulieren und so die Aktivität des Stoffwechselwegs in die Regulation der beteiligten Enzyme integriert wird (Flynn und Reece, 1999; Ljungdahl und Daignan-Fornier, 2012). Zur näheren Untersuchung einer putativen Aktivator-Funktion von Gal1 in *U. maydis* könnte zum einen die Expression der *gal*-Gene im *gal1*-Deletionsstamm über längere Zeit beobachtet werden. Außerdem könnte durch eine zusätzliche Mutation in der Kinase-Domäne, welche beispielsweise eine ATP-Bindung verhindert, eine putative Aktivator-Funktion von Gal1 getrennt von der Kinase-Funktion untersucht werden. Im Fall einer zusätzlichen regulatorischen Funktion sollte eine sog. „kinase-dead“-Variante von Gal1(Y67F) die Expression von *gal7/gal10* weiterhin induzieren. Durch einen solchen Ansatz könnte auch aufgeklärt werden, ob die verbleibende enzymatische Aktivität von Gal1(Y67F) essentiell für das Wachstum auf Galactose-haltigem Medium ist oder ob eine zusätzliche Funktion eine Rolle spielt. Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass in *S. cerevisiae* und in *K. lactis* die Bindung sowohl von Galactose als auch

von ATP für die Aktivator-Funktion von Gal3p bzw. Gal1p nötig ist (Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996; Zenke *et al.*, 1996). Alternativ könnten Mutationen in UmGal1 eingefügt werden, von denen bekannt ist, dass sie in Hefe zu einer konstitutiven regulatorischen Funktion und gleichzeitig zum Verlust der Kinase-Aktivität von Gal1p führen (Sellick *et al.*, 2009).

3.7.2 Die Galactokinase-unabhängige Galactose-Toxizität in *U. maydis*

In Pflanzen und in *GAL7-* bzw. *GAL10-*defizienten Hefestämmen führt der Verlust der Galactokinase zu einer höheren Galactose-Toleranz (Douglas und Hawthorne, 1964; Egert *et al.*, 2012; Ross *et al.*, 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Galactose in *U. maydis* auch unabhängig von Gal1 einen inhibierenden Effekt ausüben kann, obwohl eine verminderte Galactokinase-Aktivität zu einer niedrigeren Galactose-Sensitivität führt. Es ist dabei unwahrscheinlich, dass Galactose bei Abwesenheit der Galactokinase durch andere Hexokinasen phosphoryliert wird, da die Substrate von Hexo- und Galactokinasen im Allgemeinen nicht austauschbar sind (Alvarado, 1960; Schell und Wilson, 1977; Sols *et al.*, 1958). Zudem würde 2dGal sehr wahrscheinlich ebenfalls ein Ziel alternativer Phosphorylierung darstellen; das Wachstum auf 2dGal-haltigem Medium konnte durch die Deletion von *gal1* jedoch deutlich verbessert werden.

Die Wachstumsinhibition von FB1 Δ *gal1* auf Galactose- jedoch nicht 2dGal-haltigem Medium (Abb. 2.19) ist auf den ersten Blick widersprüchlich und zeigt, dass die inhibierenden Effekte von Galactose und 2dGal in diesem Fall über unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden. Die Toxizität von 2dGal konnte in Leberzellen von Ratten mit einer fehlerhaften Protein-Glykosylierung in Verbindung gebracht werden, wo beim Einbau von UDP-2dGAL aufgrund der fehlenden Hydroxy-Gruppe am C2-Atom keine Quervernetzung mit Fucosyl-Resten erfolgen kann (Buchsel *et al.*, 1980). Für eine Beeinträchtigung der Protein-Glykosylierung muss 2dGal zunächst über den Leloir-Weg zu UDP-2dGal umgewandelt werden, was eine Phosphorylierung durch die Galactokinase voraussetzt.

Für einen toxischen Effekt bei der zusätzlichen Anwesenheit von 0,1% Saccharose genügte im Fall von 2dGal schon eine Konzentration von 0,1% (Abb. 2.19), während sich 0,1% Galactose bei der Anwesenheit von 0,1% Saccharose nicht hemmend auf WT-Stämme auswirkte (nicht gezeigt). Bei Anwesenheit der Galactokinase führt 2dGal daher bereits bei niedrigen Konzentrationen zu einem toxischen Effekt, der möglicherweise ebenfalls Galactokinase-abhängig über eine fehlerhafte Proteinglykosylierung vermittelt wird. Dieser Effekt entsteht bei niedrigen Konzentrationen von Galactose dagegen nicht.

Bei höheren Konzentrationen (1% Galactose und 0,1% Saccharose) zeigte Galactose unabhängig von der Galactokinase einen toxischen Effekt. Obwohl der Einfluss höherer 2dGal-Konzentrationen auf FB1 Δ *gal1* nicht untersucht wurde, kann es als sehr wahrscheinlich erachtet werden, dass 2dGal bei einer äquivalenten Konzentration auch auf

FB1 $\Delta gal1$ toxisch wirkt. Dieser Effekt sollte aufgrund der fehlenden Phosphorylierung durch Gal1 jedoch nicht über die Proteinglykosylierung stattfinden und würde belegen, dass 2dGal sowohl über einen *gal1*-abhängigen als auch einen *gal1*-unabhängigen Weg zu einem toxischen Effekt führen kann, was den widersprüchlichen Phänotyp von FB1 $\Delta gal1$ auf Galactose- bzw. 2dGal-haltigem Medium erklären könnte.

In Hefe führten verschiedene Strategien, die alle eine Senkung des Gal-1-P Spiegels zum Ziel hatten, zur Abschwächung der Galactose-Sensitivität (Kabir *et al.*, 2000; Lai und Elsas, 2000; Masuda *et al.*, 2008; Mehta *et al.*, 1999). Trotz der deutlichen Hinweise auf Gal-1-P als Ursache für den toxischen Effekt deuten weitere Untersuchungen auf eine zusätzliche Rolle von UDP-Gal oder Galactitol bei der Galactose-vermittelten Toxizität hin (de Jongh *et al.*, 2008; Mumma *et al.*, 2008). Eine Galactokinase-Defizienz führt sowohl im Mensch als auch in der Maus zu einer Anreicherung von Galactose und Galactitol in Geweben wie Hirn, Leber oder Nieren (Ai *et al.*, 2000; Gitzelmann *et al.*, 1974).

Ein aus den filamentösen Pilzen *Aspergillus nidulans* und *Trichoderma reesei* bekannter, Phosphorylierungs-unabhängiger Stoffwechselweg für Galactose beinhaltet im ersten Schritt die Reduktion von Galactose durch eine Aldose-Reduktase zu Galactitol, welches daraufhin wahrscheinlich über Enzyme des L-Arabinose-Stoffwechsel in mehreren Schritten zu Fructose umgewandelt wird (Fekete *et al.*, 2004; Seiboth *et al.*, 2007; Seiboth und Metz, 2011). In *U. maydis* gibt es mindestens sechs Gene, die für Aldose-Reduktase-ähnliche Proteine kodieren (*um11741*, *um04922*, *um10104*, *um02778*, *um11944*, *um01753*). Da *U. maydis* nicht auf die Verwertung von Galactose spezialisiert ist, ist es unwahrscheinlich, dass diese Aldose-Reduktasen eine hohe Galactose-Affinität besitzen. Daher wäre es möglich, dass die Umwandlung zu Galactitol erst bei höheren Galactose-Konzentrationen stattfindet. Eine Akkumulation von Galactitol im *gal1*-Deletionsstamm wäre daher denkbar. Es sind jedoch bisher keine Fälle bekannt in denen Galactitol alleine eine vergleichbare toxische Wirkung ausübt. Im Gegenteil führte in Hefe sogar die Überexpression einer Aldose-Reduktase durch die vermehrte Umwandlung von Galactose zu Galactitol und einer gleichzeitigen Verringerung des Gal-1-P-Spiegels zu einer erhöhten Galactose-Toleranz (Masuda *et al.*, 2008). Andere Galactose-Stoffwechselprodukte und auch Galactose selbst müssen daher ebenso als toxische Komponenten in Betracht gezogen werden. Durch HPLC-Analysen von Galactose-inkubierten Zellen könnten akkumulierende Intermediate identifiziert und so die Ursachen der Galactose-vermittelten Toxizität in *U. maydis gal1*-Deletionsstämmen und WT-Stämmen im Detail untersucht werden.

3.7.3 Modell der Galactose-Toxizität in *U. maydis*

Zur besseren Übersicht sind die diskutierten Ergebnisse in einem Modell zusammengefasst (Abb. 3.3). Darin führen sowohl eine voll funktionsfähige Galactokinase als auch die Deletion der Galactokinase durch die Akkumulation von Gal-1-P bzw. Galactose oder Galactitol zu einem toxischen Effekt auf Galactose-haltigen Medien. Die reduzierte enzymatische Aktivität der mutierten Galactokinase Gal1(Y67F) sowie die erhöhte Expression von *gal7* und *gal10* führen in UDS68 dagegen zu der Fähigkeit auf Medium mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die reduzierte Kinase-Aktivität verhindert dabei eine Akkumulation von Galactose oder Galactitol, wie sie im *gal1*-Deletionsstamm auftritt, ohne zu einer Anhäufung von Gal-1-P wie im WT zu führen. Die erhöhte Expression von *gal7/gal10* begünstigt die weitere Umwandlung von Gal-1-P zusätzlich und ermöglicht eine Energiegewinnung aus Galactose.

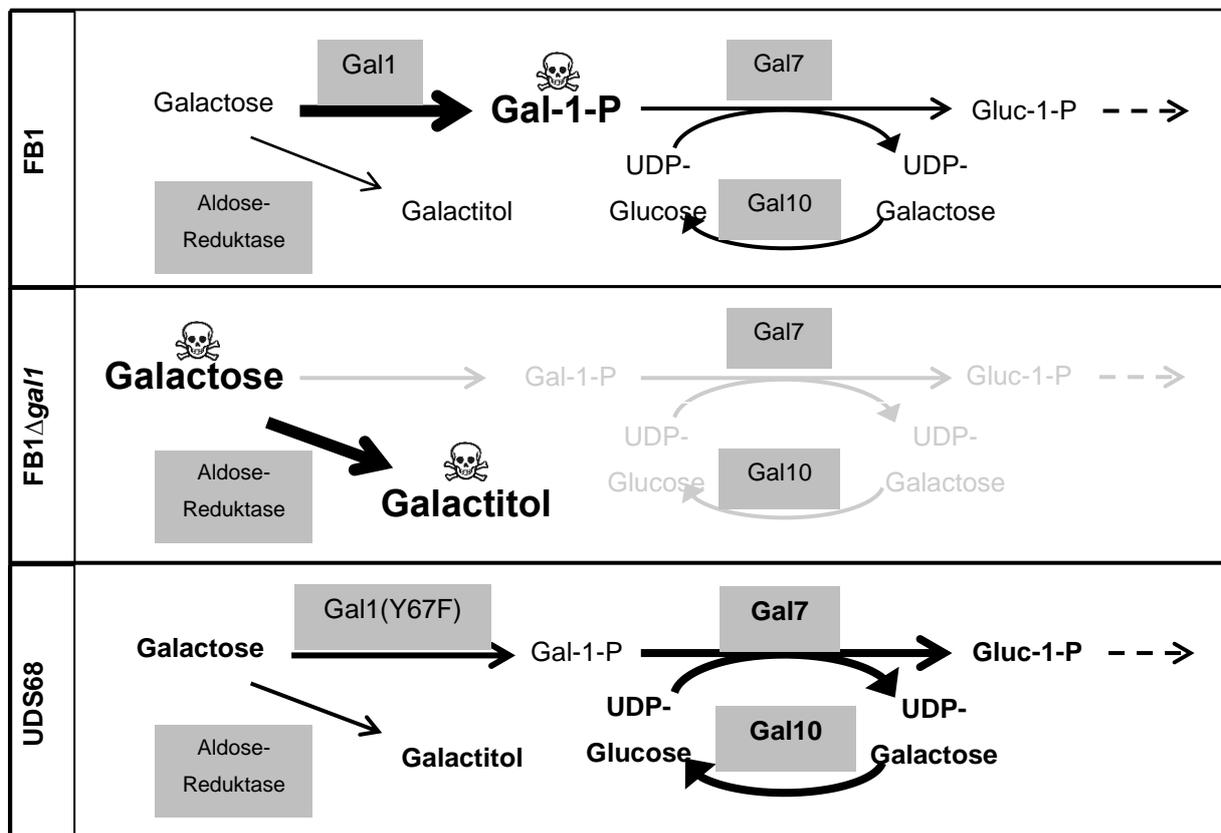


Abb. 3.3 Modell für die Galactokinase-abhängige Toxizität von Galactose in *U. maydis*. Die Dicke der Pfeile und der Schriftgrad sollen die Aktivität der jeweiligen Reaktion bzw. Abundanz der jeweiligen Verbindungen und Enzyme symbolisieren. Totenkopfsymbole markieren potentiell toxische Akkumulationen der jeweiligen Verbindungen.

Ob die hier postulierten Mechanismen tatsächlich in dieser Form zu der Galactose-vermittelten Toxizität führen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Für seine Eigenschaft als Phytopathogen spielt die Galactose-Sensitivität in *U. maydis* sehr wahrscheinlich keine

Rolle. Dass die Galactose-Toxizität von der Galactokinase abhängt und gleichzeitig sowohl ihre Anwesenheit als auch ihre Abwesenheit zu einem toxischen Effekt führen, stellt jedoch ein Novum dar und deutet auf einen möglicherweise bisher nicht bekannten Mechanismus der Galactose-Toxizität hin.

Nahezu alle Modelluntersuchungen zur Galaktosämie wurden in dem nicht von Natur aus Galactose-sensitiven Organismus *S. cerevisiae* durchgeführt (de Jongh *et al.*, 2008; Masuda *et al.*, 2008; Mumma *et al.*, 2008; Riehman *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2004; Wasilenko und Fridovich-Keil, 2006; Wasilenko *et al.*, 2005; Wohlers *et al.*, 1999). Ein Vergleich von Galactose-induzierten Effekten in weiteren Organismen könnte daher beispielsweise durch die Identifizierung bisher nicht bekannter, akkumulierender Verbindungen zur Aufklärung der noch immer nicht vollständig verstandenen, molekularen Ursachen der verschiedenen Formen und Symptome der Galaktosämie beitragen. Da *U. maydis* Genomanalysen zufolge einen höheren Verwandtschaftsgrad zum Menschen als zur Bäckerhefe aufweist (Munsterkötter und Steinberg, 2007) und gleichzeitig viele Vorteile als Modellorganismus bietet, könnte der Maisbrandpilz grundsätzlich als alternatives System für zukünftige Studien in Frage kommen.

4 Material und Methoden

Die Beschreibung der verwendeten Methoden wurde im Fall von standardmäßig verwendeten Verfahren aus der allgemeinen Methodensammlung der AG Kämper wörtlich übernommen.

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme Kits und Medien

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen Carl Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Seakem, Duchefa, Difco, BioRad, Amersham, Pharmacia, und Invitrogen bezogen. Für weitere Einzelheiten siehe (Brachmann *et al.*, 2001).

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel *et al.*, 1987a; Sambrook *et al.*, 1989b; Sambrook *et al.*, 1989a; Sambrook und Russell, 2001 und Ausubel *et al.*, 1987b hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Verwendete Kits

In dieser Arbeit wurden die Kits JETSORB (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor (Invitrogen) zur Klonierung von DNA-Fragmenten, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) sowie RotiPrep Plasmid Mini (Carl Roth) für die Aufreinigung von Plasmiden und PCR Reaktionen, RNeasy Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von Gesamt-RNA Präparationen, Turbo DNasefree (Ambion) zur Entfernung von DNA aus Gesamt-RNA-Präparationen, ProtoScript AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB), SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) oder RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) für die reverse Transkription von mRNA. GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix) zur Synthese von fragmentierter cRNA für die Hybridisierung von Microarray Chips.

Enzyme, Proteine und Antikörper

Restriktionsenzyme, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden, wenn nicht anderweitig erwähnt oder bereits in einem Kit enthalten, von New England Biolabs (NEB) bezogen. BP Clonase™ II Enzyme Mix und LR Clonase™ II Enzyme Mix wurden von Invitrogen bezogen. Taq Polymerase und teilweise PHUSION Polymerase stammte aus einer Laborpräparation.

Tab. 4.1: weitere in dieser Arbeit verwendete Enzyme, Protein und Antikörper

Name	Bezugsquelle
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma, New England Biolabs
Anti-Digoxigenin, konjugiert mit alkaliner Phosphatase	Roche
Lysozym (aus Hühnerei)	Boehringer
Lysing Enzyme aus <i>T. harzianum</i>	Sigma
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes

Medien

Medien für die Kultivierung von *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989a)

Für Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/mL Ampicillin, 40 µg/mL Kanamycin oder 25 µg/mL Chloramphenicol zugegeben. Zur optischen Selektion wurden die Platten im Fall von Klonierungen mit dem TOPO-Kit mit 80 µl X-Gal Lösung (20mg/ml) beschichtet.

YT-Festmedium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
15 g Bacto Agar
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

dYT-Flüssigmedium

6 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

Medien für die Kultivierung von *S. cerevisiae* (Guthrie und Fink, 1991)

YEPD-Medium

10 g Hefeextrakt
20 g Bacto Pepton
für Festmedium 15 g Bacto Agar zugefügt, mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren 2% (v/v) 50% Glukose (1% f.c.) oder 2% (v/v) 25% Galaktose (1% f.c.) zugefügt.

YNB-Minimalmedium

6,7 g Yeast Nitrogen Base
380 mg L-Leucin
76 mg L-Tryptophan
76 mg Histidin
in 100 ml H₂O bid. gelöst und mit 860 ml sterilem H₂O bid. (Flüssigmedium) oder 860 ml autoklaviertem 2% Bacto Agar (Festmedium) und 40 mL 50% (w/v) Maltose bzw. dem jeweils angegebenen Zucker angesetzt.

Medien für die Kultivierung von *U. maydis*

Für Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren 2 µg/mL Carboxin, 25 µg/ml Nurseothricin oder 200 µg/mL Hygromycin zugegeben. Für Festmedien wurde, wenn nicht anders angegeben, vor dem Autoklavieren 2% (w/v) Agar bzw. für Wachstumstest 2% (w/v) Noble Agar (Affymetrix) zugegeben.

YEPS_L Vollmedium (Tsukuda *et al.*, 1988)

10 g Yeast Extract
4 g Pepton
4 g Sucrose
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

CM-Komplexmedium (Holliday, 1974), (Banuett und Herskowitz, 1989)

1.5 g NH₄NO₃
2.5 g Caseinhydrolysat
0.5 g DNA
1 g Yeast Extract
10 mL Vitamin-Lösung (s.u.)
62.5 mL Salz-Lösung (s.u.)
0.5 mL Spurenelement-Lösung
mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt und mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt; nach dem Autoklavieren 20 mL 50% (w/v) Glukose zugefügt.

Glutamin-Minimalmedium (Scherer *et al.*, 2006)

62,5 mL Salz-Lösung (s.u.)
30 mM L-Glutamin
mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt, pH-Wert auf 7,0 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert. Nach dem Sterilfiltrieren:
20 mL 50% (w/v) Glukose-Lösung (f.c.1%) bzw. jeweils angegebenen Zucker hinzugefügt.

Ammonium-Minimalmedium

62,5 mL Salz-Lösung (s.u.)
0,3% (w/v) (NH₄)₂SO₄
mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt, pH-Wert auf 7,0 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert. Nach dem Sterilfiltrieren:
20 mL 50% (w/v) Glukose-Lösung (f.c.1%) bzw. jeweils angegebenen Zucker hinzugefügt.

Nitrat-Minimalmedium

62,5 mL Salz-Lösung (s.u.)
0,3% (w/v) KNO₃
mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt, pH-Wert auf 7,0 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert. Nach dem Sterilfiltrieren:
20 mL 50% (w/v) Glukose-Lösung (f.c.1%) bzw. jeweils angegebenen Zucker hinzugefügt.

NSY-Glycerinmedium (Einfriermedium)

8 g Nutrient Broth
1 g Yeast Extract
5 g Sucrose
800 ml 87% Glycerin
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

PD-Festmedium

24 g Potato Dextrose Broth
20 g Bacto Agar
(für Aktivkohlemedium zusätzlich 10 g Aktivkohle)

mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

Regenerierungsagar
(Schulz *et al.*, 1990)

- 1) Top-Agar:
1.5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in YEPS-Medium (s.o.)
- 2) Bottom-Agar:
wie 1), zusätzlich 4 µg/mL Carboxin, 50 µg/ml Nurseothricin oder 400 µg/mL Hygromycin

Salzlösung (Holliday, 1974)

- 8 g KH₂PO₄
- 2 g Na₂SO₄
- 1 g MgSO₄ x 7 H₂O
- 4 g MgSO₄ x 7 H₂O
- 1,32 g CaCl₂ x 2 H₂O
- Mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)

- 60 mg H₃BO₃
- 191 mg MnCl₂
- 400 mg ZnCl₂
- 47 mg NaMoO₄ x 2 H₂O
- 140 mg FeCl₃ x 6 H₂O
- 557 mg CuSO₄ x 5H₂O
- Mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Vitamin-Lösung
(Holliday, 1974)

- 100 mg Thiamin
- 20 mg Calciumpanthothenat
- 50 mg p-Aminobenzoesäure
- 20 mg Nikotinsäure
- 20 mg Cholinchlorid
- 40 mg myo-Inositol
- 50 mg Folsäure
- Mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

4.1.2 Stämme

E. coli-Stämme

Für die Propagierung von ccdB-Gen tragenden Plasmiden wurde der Stamm DB3.1™ (Invitrogen) verwendet, es handelt sich um folgenden Genotyp: F- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ- leu mtl.

Für alle übrigen Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E.coli*-Stamms DH10B mit folgenden genetischen Markern handelt: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-.

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

S. cerevisiae Stämme

Der Stamm EBY.VW4000 wurde für Hexose-Aufnahmetests heterologer Transporter verwendet. Der Stamm hat den Genotyp MATK leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-v1 MAL2-8c SUC2 hxt17v hxt13v::loxP hxt15v::loxP hxt16v::loxP hxt14v::loxP hxt12v::loxP hxt9v::loxP hxt11v::loxP hxt10v::loxP hxt8v::loxP hxt514v::loxP hxt2v::loxP hxt367v::loxP gal2v stl1v::loxP agt1v::loxP ydl247wv::loxP yjr160cv::loxP (Wieczorke *et al.*, 1999).

Der Stam DBY2617 wurde für Saccharose-Aufnahmetests heterologer Transporter verwendet. Der Stamm hat den Genotyp Mat a, his4-539, lys2-801, ura3-52, suc2-438 (Kaiser und Botstein, 1986).

Die Stämme BY4741 (MATa; his3Δ 1; leu2Δ 0; met15Δ 0; ura3Δ 0) und BY4741ΔGAL1 (BY4741; YBR020W::kanMX4) (MATa deletion library, Open Biosystems) wurden zur heterologen Expression von *Umgal1* bzw. *Umgal1(Y67F)* verwendet

Tab. 4.2 während dieser Arbeit erstelle *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Ausgangsstamm	enthaltene frei replizierendes Plasmid	Selektionsmarker
YDS33	EBY.VW4000	pDS30	Ura
YDS52	EBY.VW4000	pDS58	Ura
YDS53	EBY.VW4000	pDS59	Ura

YDS54	EBY.VW4000	pDS66	Ura
YDS56	EBY.VW4000	pDS64	Ura
YDS81	EBY.VW4000	pDS74	Ura
YDS82	EBY.VW4000	pDS101	Ura
YDS83	DBY2617	pNEV-E	Ura
YDS84	DBY2617	pNEV-E-srt1	Ura
YDS85	DBY2617	pDS58	Ura
YDS86	DBY2617	pDS59	Ura
YDS87	DBY2617	pDS101	Ura
YDS90	BY4741	pNEV-E	Ura
YDS91	BY4741 Δ gal1	pNEV-E	Ura
YDS92	BY4741 Δ gal1	pDS103	Ura
YDS93	BY4741 Δ gal1	pDS105	Ura
YDS94	BY4741 Δ gal1	pDS107	Ura

Ura – Uracil-Auxotrophiemarker, Δ - Deletion

Maisvarietäten (*Zea mays spec.*)

Für Pflanzeninfektionen wurde entweder die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) oder W23 (eigene Zucht des Walbot Labors, Stanford University, Stanford, CA USA) verwendet.

***U. maydis*-Stämme**

Tab. 4.3: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Selektionsmarker	Referenz
FB1	a1 b1	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB2	a2 b2	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
SG200	a1:mfa2 bE1bW2	Phleo	(Kämper <i>et al.</i> , 2006)
BUB8	a2b4	-	(Weinzierl <i>et al.</i> , 2002)
MB215	a2b13	-	(Hewald <i>et al.</i> , 2005)
SG200 Δ plp2 ^{#7}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um04342::Hyg ^R	Phleo, Hyg	(Vranes, nicht publiziert)
SG200 Δ um11171	a1mfa2 bW2bE1 Δ um11171	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 Δ hxt1	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um01156	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01156	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um05411	a1mfa2 bW2bE1 Δ um05411	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um10072	a1mfa2 bW2bE1 Δ um10072	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um10072	a1mfa2 bW2bE1 Δ um10072	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um06076	a1mfa2 bW2bE1 Δ um06076	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um00061	a1mfa2 bW2bE1 Δ um00061	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um01653	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01653	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um05033	a1mfa2 bW2bE1 Δ um05033	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um05958	a1mfa2 bW2bE1 Δ um05958	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um04478	a1mfa2 bW2bE1 Δ um04478	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)

SG200 Δ um01656	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01656	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um01476	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01476	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ srt1	a1mfa2 bW2bE1 Δ srt1	Phleo, Hyg	(Wahl <i>et al.</i> , 2010a)
SG200 Δ um02037	a1mfa2 bW2bE1 Δ um02037	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 Δ um05602	a1mfa2 bW2bE1 Δ um05602	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)
FB1 Δ hxt1	a1 b1 Δ hxt1	Hyg	(Wahl, 2009)
FB2 Δ hxt1	a2 b2 Δ hxt1	Hyg	(Wahl, 2009)
SG200 $\Delta\Delta$ hxt1/srt1	a1mfa2 bW2bE1 $\Delta\Delta$ hxt1/srt	Phleo, Hyg, Nat	(Wahl, 2009)
SG200 hxt1:gfp	a1mfa2 bW2bE1 hxt1:gfp	Phleo, Hyg	(Wahl, 2009)

Tab. 4.4: während dieser Arbeit erstellte *U. maydis*-Stämme

Stamm	Ausgangs- stamm	Genotyp	Selektions- marker
UDS7	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 ip ^r [P _{hxt1} :hxt1:egfp]ip ^s Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg; Phleo; Cbx
UDS8	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(R164K):egfp]ip ^s)*n ?hxt1::Hyg ^R	Hyg; Phleo; Cbx
UDS9	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(R164K):egfp]ip ^s Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg; Phleo; Cbx
UDS10	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(R164K):egfp]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg; Phleo; Cbx
UDS11	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(R164K):egfp]ip ^s)*n	Phleo; Cbx
UDS12	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :glu600]ips)*n	Phleo; Cbx
UDS14	FB1 Δ hxt1	a1b1 ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(R164K):eGFP]ip ^s Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Cbx
UDS15	FB1 Δ hxt1	a1b1 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(R164K):eGFP]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Cbx
UDS16	FB2 Δ hxt1	a2b2 ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(R164K):eGFP]ip ^s Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Cbx
UDS17	FB2 Δ hxt1	a2b2 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(R164K):eGFP]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Cbx
UDS18	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 hxt1:egfp:Nat ^R	Phleo,Nat
UDS19	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 hxt1(R164K):egfp:Nat ^R	Phleo,Nat
UDS20	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 Δ hxt1::Hyg ^R Δ um10072::Nat ^R	Phleo,Nat,Hyg
UDS21	FB1 Δ hxt1	a1b1 hxt1:egfp:Nat ^R	Nat
UDS23	FB2 Δ hxt1	a2b2 hxt1:egfp:Nat ^R	Nat
UDS24	FB2 Δ hxt1	a2b2 hxt1(R164K):egfp:Nat ^R	Nat
UDS25	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :cfp]ip ^s)*n	Phleo; Cbx
UDS26	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :egfp]ip ^s)*n	Phleo; Cbx
UDS27	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :yfp]ip ^s)*n	Phleo; Cbx
UDS28	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :mcherry]ip ^s)*n	Phleo; Cbx
UDS29	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{crg} :hxt1(R164K):egfp]ip ^s)*n	Phleo; Cbx
UDS30	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{crg} :hxt1(R164K):egfp]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo; Cbx, Hyg
UDS31	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{mig2-5} :hxt1(R164K):egfp]ip ^s)*n	Phleo; Cbx

Material und Methoden

UDS32	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{mig2-5} :hxt1(R164K):egfp]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo; Cbx, Hyg
UDS34	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :yfp]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo; Cbx, Hyg
UDS35	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :cfdp]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo; Cbx, Hyg
UDS36	SG200	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01281::Hyg ^R	Phleo, Hyg
UDS37	SG200	a1mfa2 bW2bE1 Δ um02869::Hyg ^R	Phleo, Hyg
UDS38	UDS37-1	a1mfa2 bW2bE1 Δ um02869::Hyg ^R Δ um01281::Hyg ^R	Phleo, Hyg, Nat
UDS38	SG200	a1mfa2 bW2bE1 ip ^r [P _{hxt1} :SPmig2-6:eGFP]ip ^s *n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo, Cbx
UDS39	SG200 Δ hxt	a1mfa2 bW2bE1 ip ^r [P _{hxt1} :Atstp1:eGFP]ip ^s Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo, Hyg, Cbx
UDS39	SG200 Δ hxt	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :Atstp1:eGFP]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo, Hyg, Cbx
UDS40	SG200 Δ hxt	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :Cghxt5:eGFP]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo, Hyg, Cbx
UDS41	SG200 Δ hxt	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :Ckhup1:eGFP]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo, Hyg, Cbx
UDS42	SG200 Δ hxt	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :Cghxt3:eGFP]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo, Hyg, Cbx
UDS43	FB1 Δ hxt	a1b1 (ip ^r [P _{otef} :mel1]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Cbx
UDS44	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{otef} :mel1]ip ^s)*n	Phleo, Cbx
UDS45	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{otef} :mel1]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo, Hyg, Cbx
UDS46	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :mel1]ip ^s)*n	Phleo, Cbx
UDS47	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :mel1]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Phleo, Hyg, Cbx
UDS48	SG200	Δ hxt1, ip ^r [Phxt1:SPmig2-6:glu600]ip ^s *n	Phleo, Cbx
UDS50	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(W407S):egfp]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Phleo, Cbx
UDS50	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(W407S):egfp]ip ^s) Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Phleo, Cbx
UDS51	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(S222L):egfp]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Phleo, Cbx
UDS55	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :suc90 μ]ip ^s)*n	Phleo, Cbx
UDS57	Bub8	a2b4 Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg
UDS58	MB215	a2b13 Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg
UDS59	SG200	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :creA:egfp]ip ^s)*n	Cbx, Phleo
UDS60	SG200 Δ mig1 (um04909)	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :creA:egfp]ip ^s)*n Δ um04909::Hyg ^R	Cbx, Hyg, Phleo
UDS61	FB1	a1b1 Δ gal1::Hyg ^R	Hyg
UDS62	SG200 Δ hxt1	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :hxt1(E412K):egfp]ip ^s)*n Δ hxt1::Hyg ^R	Hyg, Phleo, Cbx
UDS63	FB1	a1b1 Δ gal7::Hyg ^R	Hyg
UDS64	UDS34 (SG200YFP)	a1mfa2 bW2bE1 (ip ^r [P _{hxt1} :yfp]ip ^s)*n Δ um04909::Hyg ^R	Hyg, Phleo, Cbx
UDS65	SG200	a1mfa2 bW2bE1 ip ^r [P _{hxt1} :gal1(Y67F):egfp]ip ^s	Cbx, Phleo
UDS66	FB1 Δ gal1	a1b1 ip ^r [P _{hxt1} :gal1(Y67F):egfp]ip ^s Δ gal1::Hyg ^R	Hyg, Cbx
UDS67	FB1 Δ gal1	a1b1 ip ^r [P _{hxt1} :gal1(Y67F):egfp]ip ^s	Cbx

UDS68	FB1Δgal1	a1b1 gal1::gal1(Y67F):Nat ^R	Nat
UDS69	FB1Δgal1	a1b1 ip ^r [P _{hxt1} :gal1:egfp]ip ^{s*n} Δgal1::Hyg ^R	Cbx
UDS70	SG200Δhxt1	a1b1 ip ^r [P _{hxt1} :um10072:egfp]ip ^{s*n} Δhxt1::Hyg ^R	Cbx, Hyg, Phleo
UDS71	FB1Δhxt1	a1b1 gal1::gal1(Y67F):Nat ^R Δhxt1::Hyg ^R	Hyg, Nat
UDS72	FB1	a1b1 ip ^r [P _{gal1} :gal1(Y67F):egfp]ip ^{s*n}	Cbx
UDS73	FB1Δgal1	a1b1 ip ^r [P _{gal1} :gal1:egfp]ip ^{s*n} Δgal1::Hyg ^R	Cbx, Hyg
UDS74	FB1Δgal1	a1b1 ip ^r [P _{gal1} :gal1(Y67F):egfp]ip ^{s*n} Δgal1::Hyg ^R	Cbx, Hyg
UDS75	FB1Δhxt	a1b1 ip ^r [P _{hxt1} :srt1:egfp]ip ^{s*n} Δhxt1::Hyg ^R	Cbx, Hyg
UDS76	FB1	a1b1 ip ^r [P _{hxt1} :gal7:egfp]ip ^{s*n}	Cbx
UDS77	UDS68	a1b1 gal1::gal1(Y67F):Nat ^R um03714::Hyg ^R	Hyg, Nat
UDS78	UDS68	a1b1 gal1::gal1(Y67F):Nat ^R um01875::Hyg ^R	Hyg, Nat
UDS79	UDS68	a1b1 gal1::gal1(Y67F):Nat ^R um11944::Hyg ^R	Hyg, Nat
UDS80	UDS68	a1b1 gal1::gal1(Y67F):Nat ^R um02150::Hyg ^R	Hyg, Nat
UDS88	UDS71	a1b1 gal1::gal1(Y67F):Nat ^R Δhxt1::Hyg ^R um01875::Cbx ^R	Hyg, Nat, Cbx
UDS89	FB1Δhxt1	a1b1 Δhxt1::Hyg ^R um01875::Cbx ^R	Hyg, Cbx

a, b - Paarungstyp-Loci, *mfa2* - Pheromon-Gen, *E1, W2* - Gene des *b*-Paarungstyp-Locus, Δ - Deletion; P – Promotor, *Phxt1* – konstitutiv aktiver Promotor, *Pcrg1* – konditionaler Arabinose-induzierbarer Promotor (Bottin *et al.*, 1996), :: - homologer Austausch, : - Fusion, Phleo^R – Phleomycin-Resistenz, Cbx^R – Carboxin-Resistenz, Hyg^R – Hygromycin-Resistenz, Nat^R – Nourseothricin-Resistenz, (*ip*^r[...]*ip*^s) – ektopisch im *ip*-Locus integriert, **n* – mehrfache Integration

Die homologen Rekombinationsereignisse wurden in allen in dieser Arbeit generierten Stämmen, wenn nicht anders angegeben, per Southern-Analyse und/oder analytischer PCR verifiziert. Von jedem Stamm wurden in der Regel drei unabhängige Transformanten aufbewahrt.

4.1.3 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide

Für die Herstellung von CM-Medium wurde Heringssperma-DNA (Sigma) verwendet. Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurde Lachssperma-DNA als Träger-DNA (Invitrogen) verwendet. Für PCR-Reaktionen wurden dATP, dTTP, dCTP und dGTP (Jena Bioscience) eingesetzt. Für die Markierung Digoxigenin-markierter Sonden für Southern-Analysen wurden Digoxigenin-markierte dUTPs (Jena Bioscience) verwendet. Als DNA-Größenstandard wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix® (Fermentas) verwendet.

Tab. 4.5 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid / Funktion	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
<i>hxt1</i> Deletion		
(Hxt1)W120um170_LB1	GTGAACAACCTGGGTCTGCTCACC	(1)
(Hxt1)W120um170_LB2	GATGGCCGCGTTGGCCGCCATCTTGAAAGAGAGA GAGAGC	(1)
(Hxt1)W120um170_RB1	CACGGCCTGAGTGGCCTGCCGTATGGCAATGCTT TCTACC	(1)
(Hxt1)W120um170_RB2	TTTGCTCAGCGTCGATTATTCACG	(1)

(Hxt1)W120um170_LB2_SfiNat	GTTGGCCATCTAGGCCGCCATCTTGAAAGAGAGA GAGAGC	(1)
----------------------------	--	-----

Klonierung von *hxt1*

UmHxt1_GW_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGGCTGGAGGTGCTGTTGCC	(1)
---------------	---	-----

UmHxt1_GW_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGTAC TTTTTCTCGTCGTGGGTGGC	(1)
---------------	---	-----

UmHxt_GW_stop_r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAG TACTTTTTCTCGTCGTGGGTGGC	
-----------------	---	--

P_{gal1}-Expression

pGal1_Ncol_r	GTTCCATGGATTGGCGAACTATCGAAAACAAGAAG AGCA	
--------------	---	--

pgal1_NdeI_f	GTTTCATATGGATCGTACAACCGCTATCTTCTGCTA C	
--------------	---	--

Klonierung von *gal1/gal1(Y67F)*

Umgal1_nco_fw	GATCCATGGCTTCGACCCAAGGGAGC	
---------------	----------------------------	--

Umgal1_not_cfus_rev	GATGCGGCCGCTGCCTGCACCTTGTACACGCAAG	
---------------------	------------------------------------	--

Umgal1_not_stop_rev	GATGCGGCCGCTCATGCCTGCACCTTGTACACGC AAG	
---------------------	---	--

Klonierung von *ScGAL1*

Scgal1_Nco_for	TACCATGGCGATGACTAAATCTCATTGAGAAGAAG TGATTG	
----------------	---	--

Scgal1Notrevstop	TAGCGGCCGCTTATAATTCATATAGACAGCTGCC AATG	
------------------	--	--

gal1-Deletion

Gal1/lb.fw*	GCCAGGTACACCAACCATGTCC	(3)
-------------	------------------------	-----

Gal1/lb.rv*	GTTGGCCATCTAGGCCCGGAAGGAAAGCAAGCGA TGTC	(3)
-------------	--	-----

Gal1/rb.fw*	GTTGGCCTGAGTGGCCGGTCTGTAGGTGCTCGGC TG	(3)
-------------	--	-----

Gal1/rb.rv*	GTGACAGTCGCTAAACCCTGGC	(3)
-------------	------------------------	-----

Gal1_lb.fw	CGACTGGATCTCCGACTTCTCTG	(3)
------------	-------------------------	-----

Gal1_rb.rv	GATTGCGTCTTGGGTTCGGATTGG	(3)
------------	--------------------------	-----

Gal1Orf_fw	TTCGACCCAAGGGAGCGATCCT	(3)
------------	------------------------	-----

Gal1Orf_rv	CGATCAGGTTCACTCGGCCTG	(3)
------------	-----------------------	-----

gal7-Deletion

Gal7/lb.fw*	CGAGAGCTTGAGGCATGAAGCTC	(3)
-------------	-------------------------	-----

Gal7/lb.rv_new	GTTGGCCATCTAGGCCCGACGTGTGAGCAACTTG TCAGC	(3)
----------------	---	-----

Gal7/rb.fw*	GTTGGCCTGAGTGGCCGCCATCTCAAGTACCGCC TGC	(3)
-------------	---	-----

Gal7/rb.rv_new	GCAACTTGTAGACGAACGAGCCG	(3)
----------------	-------------------------	-----

Gal7_lb.fw	CCTTCGACCCGACGTGTTGG	(3)
------------	----------------------	-----

Gal7_rb.rv	GATGGTCTCGACCAGCTTGACTC	(3)
------------	-------------------------	-----

Gal7Orf_fw	GCTACAATCATGCCAACGGCGA	(3)
------------	------------------------	-----

gal10-Deletion

Gal10_LB1	TGCTGCGTGACTAAGATCCTTGA
Gal10_LB2	GTTGGCCATCTAGGCCGCTATGGCGAGCAGTAGT CTCAG
Gal10_RB1	CACGGCCTGAGTGGCCTGGTCGAAAACAGTGGGT GAAAGGT
Gal10_RB2	CTGTAACGCACAATCATGCAGATG
Gal10_LB1_nested	AGTCTGCCTCGGCTCAAGCAAT
Gal10_RB2_nested	CAACGGTACTCGTCGCACTTTAG

um10072-gfp Fusion

10072_GW_f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGGCACAAACACCGTCCACATCAT
10072_GW_Cfus_r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGACA GACGCTTTCTCGCGCAAC

srt1-gfp Fusion

srt1_nco_f	GATCCATGGCGTCGTCTTCTCCCATTCC
srt1_cfus_not_r	GATGCGGCCGCTTGTGGACTCGGCTGCAGAGT

um03714 (put. gal4) Deletion

um03714_LB1	TTCTCGCCATGTTCTGTGCTG
um03714_LB2	GTTGGCCATCTAGGCCGATCTACGAGGAAAGGTA GCCAGA
um03714_LB1_nes	TCTTGTGCCCGAGTGTTCGCT
um03714_RB1	CACGGCCTGAGTGGCCAGCACCTGCCTTTCT TTCTC
um03714_RB2	GAGCAACGAAGCGAAAGCCAG
um03714_RB2_nes	TGAGTTCTGCTACACGCTACGTG

P_{crq}-Expression

Pcrq_Hind_f	CAAAGCTTGC GGCCGCTACCTGGCTTAT
Pcrq_Nco_r	CACCATGGGGCCACTCAGGCCTATTATGGTA

Klonierung heterologer Transporter

AtStp1opt_GW_f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGCCCGCCGGTGGCTTTG
AtSTP1_GW_r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAACA TGCTTCGTTCCAGCTTGGT
CgHXT3_Nco_f	CACCATGGAGAAAGAGACCGGCGTTA
CgHXT3_Not_r	CAGCGGCCGCAACATTGGAAGCGCGGCGC
CgHXT5_GW_f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGCGGTTCCCCAAGCCC
CgHxt5_GW_r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGACG GTGTTTTACGCTTCTC
Swt4a_ecohind_rev	CAGAATTCAAGCTTTTCAGTATTGGCCCGCGCCG
Swt4a_eco_fw	CAGAATTCAAAAATGATCTCCCCGGACACCATCC
Swt4b_eco_fw	CAGAATTCAAAAATGGTCTCCTCGGACACCATCC

Swt4b_ecohind_rev	CAGAATTCAAGCTTTTCAGTAGGTGCCGCTGCCG
ZmSweet11_attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGGCAGGAGGCTTCTTCTCCA
ZmSweet11_attB2_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAC ACCGCGGCGGCCG
ZmSweet4a_attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGA TCTCCCCGGACACCATC
ZmSweet4a_attB2_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAG TATTGGCCCGCGCCG
ZmSweet4b_attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGT CCCGGTACTCGTCAACGC
ZmSweet4b_attB2_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAG TAGGTGCCGCTGCCG

Sequenzierungen

pHxt_seq_f	GCCTATCCTTCCCTCTTCAAG
GFP_r_Sfi	GTTGGCCATCTAGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGT CCATGCCG
gal1RB_seq_r	GGCTGATGTATTCAACTGTGGCT
gal1_seq_fw	ACGAACGATGGGCCAACTAC
frame_B_seq2	ATCTCGACGGATCCTAAC
frame_A_seq1	GCGATTAACCTGATGTTT
m13 rev (Invitrogen)	CAGGAAACAGCTATGAC
m13 for (-20) (Invitrogen)	GTAAAACGACGGCCAG

qRT-PCR-Analysen

gal1_rt_fw	TCGGCGATGCGGACGCAAT	
gal1_rt_rev	CAAGCACCACCAGCAGGCT	
gal7_rt_fw	CTTGGTCGGCTTCGAGATGAT	
gal7_rt_rev	CTCCAACGTCGCAAGGTAGT	
gal10_rt_fw	CGAGGACAAGATAGAGACTAAGG	
gal10_rt_rev	CGTAGCCAGAAACCTTCTTCATAG	
(Hxt1)W120um170_cDNAfor	ACTGACGTTGACGACCCCATTGTC	(1)
(Hxt1)W120um170_cDNArev	AGCTCAATGTGCGAGGTTGGTCTGG	(1)
TC311152 (Sweet11) _RT_F	TCATCGTCAAGGTGGTCAAG	
TC311152 (Sweet11) _RT_R	GGACGCAGCTGAAGAAGAAG	
TC310493 (Sweet4a) _RT_F	ACTGGCTTCCCTGGTGAAC	
TC310493 (Sweet4a) _RT_R	CTCCACGATCTTCTGGGTGT	
TC310491 (Sweet4b) _RT_F	CTCATCCGCTTCGACCTCTA	
TC310491 (Sweet4b) _RT_R	GGTCATGGCGATCTGGTC	
um01156_cDNA_for	ACGATCGATAACGAGATTGACCGC	(1)
um01156_cDNA_rev	TGCTGTGTAGCGCCTTGACACTG	(1)

um01653_cDNA_for	GAGGTGCAGAGTTGGAAAGAGGGC	(1)
um01653_cDNA_rev	CGTCATCATTGCTACCGGTGCTTC	(1)
um04478_cDNA_for	ATGTCAGAGTCCCCGCGCTATCTC	(1)
um04478_cDNA_rev	GCTTCGTCCTCTCTTCGTTGCTTG	(1)
um01656_cDNA_for	ACATCTTTACCAACGGTCCCCGAGC	(1)
um01656_cDNA_rev	TCTGTGAGACGAAACCGAGGATGG	(1)
um01476_cDNA_for	AAATCACTTATGCACGGCGTCGAG	(1)
um01476_cDNA_rev	ATACCCAGAACGCAGGCAAACCTTG	(1)
(Srt1)C75um026_cDNAfor	ACGTAGAACCCTGGCCAAGGACAC	(1)
(Srt1)C75um026_cDNArev	AGCTACAACGGTGC GCAAGAGATG	(1)
RT_eIF2b_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC	(2)
RT_eIF2b_r	ATCGTCAACCGCAACCAC	(2)
RT_actin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG	(2)
RT_actin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC	(2)

weitere verwendete Oligonukleotide (vgl. Plasmidliste)

Klonierung fluoreszenter Proteine/Nanosensoren

Glu600my attB1 for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGACGCACAATCCCCTATCCTTCG
Suc90myc_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATC
NanoS_attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACT TGTACAGCTCGTCCATGCCG
FP_NcoI_GW_f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGGTGAAGCAAGGGCGAGGA
FP_NotI_GW_r (neu)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCG GCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC

Klonierung ccdB-Kassette (verB)

ccdB_verB_f	CTCTCTTTCACGATATCAACAAGTTTGTACAAAAA G
ccdB_verB_r	CTTGCTCACGATATCAACCACTTTGTACAAG

sonstige Klonierung

SPmi26_NcoI_for	CACCATGGCGTTTTGGCGCAAACAGGTA CTG
SPmig26_NotI_rev	CAGCGCCGCACCGCCCATCGGACCGGC
SPmig26_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGTTTTGGCG
SPmig26_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCACCG CCCATCGGACC
NSglu_seq_f	AGACGGTCAGATTAGTTCGT
NSglu_seq_r	GTCCACATTGCGGTATCTA
NSsuc_seq_f	TCCATCAATAACGAGAAGGCGC
NSsuc_seq_r	TGAAGACGGAATTGCCGGTC
prf1_ORF_NcoI_f	CACCATGGGAGATCCAGGCTGCG
prf1_ORF_NotI_r	CAGCGCCGCTCAGATGCAGTGCTGAGGAGAT

prf1_cfus_Notl_r	CAGCGGCCGCGATGCAGTGCTGAGGAGATGAAT
prf1_seq_f	AGACGCTGAGACCTTAGGAAC
prf1_seq_r	TTGCCGATGCGAAGGTGTCA
um01281_LB_nested2	ATGAAGCAATCTACCTGCCTTCCGA
um01281_RB_nested2	CGATTTGCACTTGACATCCGCT
um02869_LB_nested2	TATTGGCGAGACGCTCGTCATCG
um02869_LB_nested2	GCTCCTGGAGAACGCTCGTTCA
AtSTP2_Ncol_f	CACCATGGCTGTTGGTTCGATGAATGTC
AtSTP2_Ncot_r	CAGCGGCCGCGTCTTTGAAATATTTCTTCCAACGCG
CkHUP1_GW_f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGC CGGCGGTGGTGT
CkHUP1_GW_r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTTCATCGC CTTTGACAGCTC
mig1_GW_fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGGCCCAGCCTACTGCCG
mig1_GW_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCC GAAGACATGTGCGACTTCG
pmig1_hind_fw	TGCATGGTAAGCTTTTCCAAGCGAG
pmig1_xba_nco_r	GCTCCATGGTCTAGATGTGTGAGATCGAGCGCAA TTGAG
mig_seq_f	CGGATCGTTACAACCTCGCATG
mig_seq_r	CTACACCGCCATCCAGAATG
02356_fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACC ATGAGGCCAGCTGCTGCAGC
02356_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAC ACTTTAACCCTCAGCTTGTCCCA
02356_seq_f	CGCGACAACAACCTTTGTCGA
02356_seq_r	CGTTGAGCCACGCACTGAA
4909_LB_nested	GAAGACAAGGCTGGCTCTAATCG
4909_RB_nested	GCTAACCTTCTTGGTACTGCCAAGC
ns_suc_seqr2	CATAGGCATAGGGCCAGTTG
ns_suc_seqr3	CTGTCGGCACCATTTCOAAG

(1) - (Wahl, 2009), (2) – Laborbestand AG-Kämper, (3) - (Dillner, 2012)

Tab. 4.6: in dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz	Selektions- marker
pCRII-Topo	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Amplifikate können mit EcoRI wieder ausgeschnitten werden; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.	(Invitrogen)	Amp, Kan
pCR2.1	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Amplifikate können mit EcoRI wieder ausgeschnitten werden; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.	(Invitrogen)	Amp, Kan

pBS-hhn	Enthält eine 1.884 bp Hygromycin-Resistenzkassette als <i>SfiI</i> -Fragment. Das <i>hph</i> -Gen wird dabei von dem <i>hsp70</i> -Promotor und dem <i>nos</i> -Terminator flankiert. Die Kassette wird flankiert von der 5'- <i>SfiI</i> -Schnittstelle 5'-GGCCTAGATGGCC-3' und von der 3'- <i>SfiI</i> -Schnittstelle 5'-GGCCTGAGTGGCC-3'.	(J. Kämper, pers. Mitteilung)	Amp, Hyg
p123	Enthält das <i>egfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>otef</i> -Promotors und des <i>nos</i> -Terminators sowie eine Carboxin Resistenzkassette für die homologe Integration in den <i>ip</i> -Lokus.	(Aichinger, unveröffentlicht)	Amp, Cbx
p123GW	p123-Derivat, das die zwischen den <i>otef</i> -Promotor und <i>egfp</i> inserierte GATEWAY®-Leserahmen-Kassette A enthält.	(M. Vranes, pers. Mitteilung)	Amp, Cbx
pDONR221	Donorvektor mit M13 Forward und M13 Reverse Primer-Bindestellen, ermöglicht eine GATEWAY® <i>in vitro</i> Klonierung von PCR Fragmenten mittels BP Klonase. Trägt eine Kanamycin-Resistenzkassette sowie eine GATEWAY®-Klonierungskassette mit Chloramphenicol-Resistenz-kassette und <i>ccdB</i> -Selbstmordgen.	(Invitrogen)	Kann
pJF1_GW1	Entstanden durch die Inserterung der GATEWAY®-Leserahmen-Kassette A in pJF (Farsing, 2004). Enthält ein 860 bp umfassendes <i>XhoI</i> und <i>NcoI</i> flankiertes <i>mig2.5</i> -Promotorfragment, gefolgt von der GATEWAY®-Kassette und dem 717 bp großen <i>gfp</i> ORF. Ermöglicht die GATEWAY®-vermittelte Insertion eines PCR Fragments für die generierung einer C-terminalen GFP-Fusion unter der Kontrolle des <i>Pmig2.5</i> - Promotors.	(M. Vranes, pers. Mitteilung)	Amp, Cbx
pUMa262	Enthält eine 1437 bp Nurseothricin Resistenzkassette mit <i>hsp70</i> -Promotor und <i>hsp70</i> -Terminator flankiert durch <i>SfiI</i> Schnittstellen.	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)	Amp, Nat
pUThsp	Enthält eine Phleomycin Resistenzkassette mit <i>hsp70</i> -Promotor und <i>TrpC</i> Terminator.	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)	Amp, Phleo
pNEV-E	Enthält eine <i>EcoRI</i> Schnittstelle zwischen dem <i>PMA1</i> Promotor und dem <i>PMA1</i> Terminator sowie den <i>ura3</i> Selektionsmarker für die Expression in <i>S. cerevisiae</i> .	(Sauer und Stolz, 1994)	Amp, Ura
pFLIPglu-170nDelta13	Enthält den FRET-basierten Glucose-Nanosensor FLIPglu F16F Delta13 flankiert von <i>HindIII</i> Schnittstellen.	(Deuschle <i>et al.</i> , 2006)	Amp, Spec
pFLIPglu-2uDelta13	Enthält den FRET-basierten Glucose-Nanosensor FLIPglu F16F D152A Delta13 flankiert von <i>HindIII</i> Schnittstellen.	(Deuschle <i>et al.</i> , 2006)	Amp, Spec
pFLIPglu-600uDelta13	Enthält den FRET-basierten Glucose-Nanosensor FLIPglu F16A Delta13 flankiert von <i>HindIII</i> Schnittstellen.	(Deuschle <i>et al.</i> , 2006)	Amp, Spec
pFLIP-glu3,2m	Enthält den FRET-basierten Glucose-Nanosensor FLIPglu F16A S112A Delta13 flankiert von <i>HindIII</i> Schnittstellen.	(Deuschle <i>et al.</i> , 2006)	Amp, Spec
pRSET FlipSuc-90u	Enthält den FRET-basierten Saccharose-Nanosensor FlipThuE W283A flankiert von einer <i>BamHI</i> und einer <i>HindIII</i> Schnittstelle.	(Lager <i>et al.</i> , 2006)	Amp, Spec

Material und Methoden

pHxt1:eGFP	p123-Derivat, das das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle eines 2,5kb <i>hxt1</i> -Promotorfragments und des <i>nos</i> -Terminators enthält.	(R. Wahl, pers. Mitteilung)	Amp, Cbx
pDESTpHxt1:eGFP	pHxt1:eGFP-Derivat, das die zwischen <i>hxt1</i> -Promotor und <i>egfp</i> inserierte GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B enthält.	(R. Wahl, pers. Mitteilung)	Amp, Cm, Cbx
pDESTpHxt1	pHxt1:eGFP-Derivat, in dem der <i>gfp</i> -ORF entfernt und stromabwärts des <i>hxt1</i> -Promotors eine GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B inseriert wurde.	(R. Wahl, pers. Mitteilung)	Amp, Cm, Cbx
pZM_BFc0091L21	Enthält die Mais Vollängen cDNA mit der Zugangsnummer ZM_BFc0091L21 in der EcoRV Schnittstelle des Vektors pCMV.SPORT-6.1	(Soderlund <i>et al.</i> , 2009)	Amp
pZM_BFc0019P07	Enthält die Mais Vollängen cDNA mit der Zugangsnummer ZM_BFc0019P07 in der EcoRV Schnittstelle des Vektors pCMV.SPORT-6.1	(Soderlund <i>et al.</i> , 2009)	Amp
pZM_BFb0166M11	Enthält die Mais Vollängen cDNA mit der Zugangsnummer ZM_BFb0166M11 in der EcoRV Schnittstelle des Vektors pCMV.SPORT-6.1	(Soderlund <i>et al.</i> , 2009)	Amp
pZM_BFb0186D09	Enthält die Mais Vollängen cDNA mit der Zugangsnummer ZM_BFb0186D09 in der EcoRV Schnittstelle des Vektors pCMV.SPORT-6.1	(Soderlund <i>et al.</i> , 2009)	Amp
pZM_BFb0131L17	Enthält die Mais Vollängen cDNA mit der Zugangsnummer ZM_BFb0131L17 in der EcoRV Schnittstelle des Vektors pCMV.SPORT-6.1	(Soderlund <i>et al.</i> , 2009)	Amp
pENTRYScRgt2 (GW-Entryvektor)	"Entry-Vektor", enthält den ORF von <i>ScRGT2</i> ohne Stop-Codon flnakiert von AttL-Rekombinationsstellen	(R. Wahl, pers. Mitteilung)	Kan
pENTRYUmHxt1 (GW-Entryvektor)	"Entry-Vektor", enthält den ORF von <i>Umhxt1</i> ohne Stop-Codon flnakiert von AttL-Rekombinationsstellen	(R. Wahl, pers. Mitteilung)	Kan
pENTRYUmHxt1mut(RL)	"Entry-Vektor", enthält den ORF von <i>Umhxt1(R164K)</i> ohne Stop-Codon flnakiert von AttL-Rekombinationsstellen	(R. Wahl, pers. Mitteilung)	Kan
pENTRYUfHxt1 (GW-Entryvektor)	"Entry-Vektor", enthält den ORF von <i>UfHXT1</i> ohne Stop-Codon flnakiert von AttL-Rekombinationsstellen	(R. Wahl, pers. Mitteilung)	Kan
pTF405a	Enthält die cDNA des Hexose Transporters Stp1 aus <i>A. thaliana</i> in der EcoRI Schnittstelle von pUC19.	(Sauer <i>et al.</i> , 1990)	Amp
pSTP2	Enthält die cDNA des Hexose Transporters Stp2 aus <i>A. thaliana</i> in der EcoRI Schnittstelle von pUC19.	(Truernit <i>et al.</i> , 1999)	Amp
pTF205	Enthält die cDNA des Hexose Transporters Hup1 aus <i>Chlorella kessleri</i> in der EcoRI Schnittstelle von pUC19.	(Sauer und Tanner, 1989)	Amp
NEV-CgHXT3	Enthält die cDNA des Hexose Transporters HXT3 aus <i>Colletotrichum graminicola</i> in der EcoRI Schnittstelle von pNEV-E.	(Lingner <i>et al.</i> , 2011)	Amp, Ura
NEV-CgHXT5	Enthält die cDNA des Hexose Transporters HXT5 aus <i>Colletotrichum graminicola</i> in der EcoRI Schnittstelle von pNEV-E.	(Lingner <i>et al.</i> , 2011)	Amp, Ura

pBD1 (gal7 KO (Nat) in Topo)	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligations-produkts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>um01875</i> , eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>um01875</i> und der durch Sfil aus dem Vektor pUMA262 gewonnenen Nurseothricin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1-TOPO. Ermöglicht die Amplifikation des <i>um01875</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	(B.Dillner, pers. Mitteilung)	Amp,Nat
pBD2 (XylDH KO (Nat) in Topo)	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligations-produkts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>um02150</i> , eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>um02150</i> und der durch Sfil aus dem Vektor pUMA262 gewonnenen Nurseothricin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1-TOPO. Ermöglicht die Amplifikation des <i>um02150</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	(B.Dillner, pers. Mitteilung)	Amp,Nat
pBD3 (XylRed KO (Nat) in Topo)	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligations-produkts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>um02150</i> , eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>um02150</i> und der durch Sfil aus dem Vektor pBS-hhn gewonnenen Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1-TOPO. Ermöglicht die Amplifikation des <i>um02150</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	(B.Dillner, pers. Mitteilung)	Amp,Nat
pNEV-E-srt1	Enthält der ORF von <i>srt1</i> zur Expression unter der Kontrolle des konstitutiven <i>pma1</i> -Promotors in <i>S.cerevisiae</i> .	(Wahl <i>et al.</i> , 2010a)	Amp, Ura

Tab. 4.7 während dieser Arbeit erstellte Plasmide

Bez.	alt. Bezeichnung	Beschreibung	Sel.-marker
pDS7	pCR2.1-HxtORF:GFP:Nat	Entstanden aus einer Topo-Reaktion mit pCR2.1 und einem Konstrukt das den ORF von <i>hxt1</i> mit C-terminal fusioniertem <i>egfg</i> , eine Nurseothricin-Resistenzkassette und die rechte Flanke des <i>hxt1</i> Gens zur homologen Integration enthält.	Amp, Nat
pDS8	pCR2.1-HxtRL:GFP:Nat	Entstanden aus einer Topo-Reaktion mit pCR2.1 und einem Konstrukt das den ORF von <i>hxt1(R164K)</i> (enthält eine Mutation, die zum Austausch von Arg164 zu Lys führt) mit C-terminal fusioniertem <i>egfg</i> , eine Nurseothricin-Resistenzkassette und die rechte Flanke des <i>hxt1</i> Gens zur homologen Integration enthält.	Amp, Nat
pDS9	pENTRY-glu170n	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern Glu600μ_attB1_for und NanoS_attB2_rev von pFLIPglu-170nDelta13 amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Glucose-Nanosensors glu-170nDelta13 flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan

pDS10	pENTRY-glu2 μ	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern Glu600 μ _attB1_for und NanoS_attB2_rev von pFLIPglu-2uDelta133 amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Glucose-Nanosensors glu-2uDelta133 flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS11	pENTRY-um10072	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern 10072_GW_f und 10072_GW_Cfus_r von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521 amplifiziert wurde. Enthält den ORF von um10072 ohne Stop-Codon flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS12	pENTRY-glu600 μ	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und eines PCR-Produkts das mit den Primern Glu600 μ _attB1_for und NanoS_attB2_rev von pFLIPglu-600uDelta13 amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Glucose-Nanosensors glu-600uDelta13 flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS13	pEXPR-glu600 μ	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR <i>in vitro</i> Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt1 und pENTRY-glu600 μ , ermöglicht die Integration des ORF für den Glucose-Nanosensor glu-600uDelta13 unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, bx
pDS14	pEXPR-glu600 μ +SPmig2.6	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR <i>in vitro</i> Klonierung mit den Plasmiden pDS35 und pDS12, ermöglicht die Integration des ORF für den Glucose-Nanosensor glu-600uDelta13 und dem am N-terminal fusionierten Signalpeptid SP _{miq2-6} unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, bx
pDS15	pENTRY-glu3,2m	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung eines PCR-Produkts das mit den Primern Glu600 μ _attB1_for und NanoS_attB2_rev von pFLIP-glu3,2m amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Glucose-Nanosensors glu3,2m flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS16	pEXPR-um10072	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR <i>in vitro</i> Klonierung mit den Plasmiden p123-GW1 und pDS11, ermöglicht die Integration des ORF von <i>um10072</i> mit C-terminal fusioniertem <i>egfp</i> unter Kontrolle des P_{otef} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, bx
pDS17	pENTRY-suc90 μ	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und eines PCR-Produkts das mit den Primern Suc90myc_for und NanoS_attB2_rev von pRSET FlipSuc-90u amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Saccharose-Nanosensors FlipThuE W283A (Suc-90u) flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS65	pExprSuc90 μ	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR <i>in vitro</i> Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt1 und pDS17, ermöglicht die Integration des ORF für den Saccharose-Nanosensor FlipThuE W283A (Suc-90u) unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, bx
pDS18	pENTRY-CFP	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und eines PCR-Produkts das mit den Primern FP_Ncol_GW_f und FP_NotI_GW_r von p123-CFP amplifiziert wurde.	Kan
pDS19	pEXPR-CFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR <i>in vitro</i> Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt1 und pDS18, ermöglicht die Integration des ORF für CFP unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, bx

pDS20	pENTRY-GFP	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und eines PCR-Produkts das mit den Primern FP_Ncol_GW_f und FP_NotI_GW_r von p123 amplifiziert wurde.	Kan
pDS21	pEXPR-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR <i>in vitro</i> Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt1 und pDS20, ermöglicht die Integration des ORF für eGFP unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, bx
pDS22	pENTRY-YFP	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und eines PCR-Produkts das mit den Primern FP_Ncol_GW_f und FP_NotI_GW_r von p123-YFP amplifiziert wurde.	Kan
pDS23	pEXPR-YFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR <i>in vitro</i> Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt1 und pDS22, ermöglicht die Integration des ORF für YFP unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, bx
pDS24	pENTRY-mCherry	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und eines PCR-Produkts das mit den Primern FP_Ncol_GW_f und FP_NotI_GW_r von p123-mcherry:HA amplifiziert wurde.	Kan
pDS25	pEXPR-mCherry	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR <i>in vitro</i> Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt1 und pDS24, ermöglicht die Integration des ORF für mCherry unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, bx
pDS26	pDEST-pHxt(phleo)	Entstanden aus der Ligation des mit SspI linearisierten Plasmids pUTHsp und einem 4638 bp NdeI/ClaI Fragment aus pDEST-pHxt dessen Schnittstellenüberhänge mit Klenow aufgefüllt wurden. Enthält die stromabwärts des P_{hxt1} -Promotor inserierte GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B im Vektorrückgrat von pUTHsp zur ungerichteten ektopischen Integration eines beliebigen über GATEWAY®-LR in vitro klonierbaren ORFs mit Phleomycin als Selektionsmarker.	Amp, Cm, Phleo
pDS27	pDEST-pHxt(Nat)	Entstanden aus der Ligation des mit XhoI linearisierten Plasmids pUMa262 und einem 4638 bp NdeI/ClaI Fragment aus pDEST-pHxt dessen Schnittstellenüberhänge mit Klenow aufgefüllt wurden. Enthält die stromabwärts des P_{hxt1} -Promotor inserierte GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B im Vektorrückgrat von pUTHsp zur ungerichteten ektopischen Integration eines beliebigen über GATEWAY®-LR in vitro klonierbaren ORFs mit Nurseothricin als Selektionsmarker.	Amp, Cm, Nat
pDS28	pDEST-pHxt(Nat) invers	Entstanden aus der Ligation des mit XhoI linearisierten Plasmids pUMa262 und einem 4638 bp NdeI/ClaI Fragment aus pDEST-pHxt dessen Schnittstellenüberhänge mit Klenow aufgefüllt wurden. Enthält die stromabwärts des Phxt1-Promotor inserierte GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B im Vektorrückgrat von pUTHsp zur ungerichteten ektopischen Integration eines beliebigen über GATEWAY®-LR in vitro klonierbaren ORFs mit Nurseothricin als Selektionsmarker.	Amp, Cm
pDS29	PENTRY-prf1	„Entry-Vektor“ der aus der Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und einem mit NcoI und NotI verdauten PCR-Produkt, das mit den Primern prf1_ORF_NcoI_f und prf1_ORF_NotI_r von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521 amplifiziert wurde, entstanden ist. Enthält den ORF von prf1 flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS28	pEXPR-prf1	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDS27 und pDS29, ermöglicht die ungerichtete ektopische Integration des ORF von <i>prf1</i> unter Kontrolle des P_{hxt1} -Promotors.	Amp, Cbx

pDS29	pCrg:HxtRK:GFP	Entstanden aus der Ligation eines 6987 bp HindIII/NcoI Fragments aus pEXPRUmHxt1mut und einem mit HindIII und NcoI verdauten 1496 bp PCR-Produkt, das mit den Primern Pcrg_Hind_f und Pcrg_Nco_r auf das Plasmid pUMa320 Pcrg_Hind_f und Pcrg_Nco_r erzeugt wurde. Ermöglicht die Integration des ORF von <i>hxt1(R164K)</i> mit C-terminal fusioniertem <i>egfp</i> unter der Kontrolle des P_{crg1} -Promotors in den <i>ip</i> -Lokus.	Amp, Cbx
pDS30	pNEV-E-HxtRK	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit EcoRI linearisierten Plasmid pNEV-E und einem mit EcoRI verdauten PCR Produkt das mit den Primern W120um170_Eco5 und W120um170_Eco3 von dem Plasmid pENTRYUmHxt1mut(RL) amplifiziert wurde. Enthält den ORF von <i>hxt1</i> mit einer Mutation, die zum Austausch von Arg164 zu Lys führt, zur Expression in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura
pDS31	pEXPR-Pmig25-HxtRK-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pJF1GW1 und pENTRYUmHxt1mut(RL), ermöglicht die Integration des ORF für Hxt1(R164K) unter Kontrolle des P_{mig2-5} Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, Cbx
pDS32	pEXPR-SchHxt2(stp)	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP/LR in vitro Klonierung mit dem Vektor pDONR221, einem PCR Produkt, das mit den Primern SchHxt2_GW_for und SchHxt2_rev von gDNA aus <i>S. cerevisiae</i> amplifiziert wurde und dem "Ziel-Vektor" pDESTpHxt1. Ermöglicht die Integration des ORF für SchHxt2 unter Kontrolle des Phxt1-Promotors in den <i>ip</i> Locus	Amp, Cbx
pDS33	pCR2.1-ccdB_rfB	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit EcoRV linearisierten Plamid pCR2.1 und einem mit EcoRV verdauten PCR-Produkt, das mit den Primern ccdB_verB_f und ccdB_verB_r von pDESTphxt amplifiziert wurde. Enthält die GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B flankiert von EcoRV Schnittstellen.	Amp
pDS34	pEntry-CFP (NcoI/NotI)	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR Produkt das mit den Primern FP_NcoI_GW_f und FP_NotI_GW_r (neu) von p123-CFP amplifiziert wurde. Enthält das <i>cfp</i> -Gen flankiert von NcoI (5') und NotI (3') Schnittstellen. Ermöglicht die gerichtete Klonierung von DNA-Fragmenten über NcoI und NotI Schnittstellen in das Rückgrat von pDONR221 unter Umgehung einer GATEWAY®-BP Reaktion. Für C-terminale Fusionen nach einer anschließenden GATEWAY®-LR Klonierung muss and den zu klonierenden ORF ohne Stopp-Codon am 5' eine NotI Schnittstelle direkt angehängt werden um den korrekten Leserahmen zu wahren.	Kan
pDS35	pDest-pHxt-SPmig2.6	"Destination"-Vektor, im ersten Schritt entstanden aus der Ligation eines 7,2kb NcoI/NotI Fragments aus p123-pHxt:GFP und einem mit NcoI un NotI verdautem PCR-Produkt, das mit den Primern SPmi26_NcoI_for und SPmig26_NotI_rev von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521 amplifiziert wurde. Das resultierende Plasmid wurde mit NotI linearisiert, die Schnittstellen-Überhänge mit Mung Bean Nuclease entfernt und mit der GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B ligiert. Ermöglicht die LR-Klonase-vermittelte Integration von attB-flankierten PCR Amplifikaten zur N-terminaler Fusion des Signalpeptids SPmig2-5 unter der Kontrolle des Phxt1-Promotors; trägt Amp- und Chloramphenicolresistenz sowie das ccdB-Selbstmordgen sowie die Carboxin Resistenzkassette für die homologe Integration in den <i>ip</i> -Lokus.	Amp, Cm, Cbx

pDS36	pDest-pHxt-CFP (c-terminal)	"Destination"-Vektor, im ersten Schritt entstanden aus der Ligation eines 7,2kb NcoI/NotI Fragments aus p123-pHxt:GFP und einem 724 bp NcoI/NotI Fragment p123-CFP. Das resultierende Plasmid wurde mit NcoI linearisiert, die Schnittstellen-Überhänge mit Mung Bean Nuclease entfernt und mit der GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B ligiert. Ermöglicht die LR-Klonase-vermittelte Integration von attB-flankierten PCR Amplifikaten zur C-terminalen Fusion des cfp-Gens unter der Kontrolle des Phxt1-Promotors; trägt Amp- und Chloramphenicolresistenz sowie das ccdB-Selbstmordgen sowie die Carboxin Resistenzkassette für die homologe Integration in den ip-Lokus.	Amp, Cm, Cbx
pDS37	pDest-pHxt-mCherry (c-terminal)	Im ersten Schritt entstanden aus der Ligation eines 7,2kb NcoI/NotI Fragments aus p123-pHxt:GFP und einem 724 bp NcoI/NotI Fragment pDS24. Das resultierende Plasmid wurde mit NcoI linearisiert, die Schnittstellen-Überhänge mit Mung Bean Nuclease entfernt und mit der GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B ligiert. Ermöglicht die LR-Klonase-vermittelte Integration von attB-flankierten PCR Amplifikaten zur C-terminalen Fusion des mCherry-Gens unter der Kontrolle des Phxt1-Promotors; trägt Amp- und Chloramphenicolresistenz sowie das ccdB-Selbstmordgen sowie die Carboxin Resistenzkassette für die homologe Integration in den ip-Lokus.	Amp, Cm, Cbx
pDS38	pExpr-Phxt-SPmig2.6-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDS35 und pDS20, ermöglicht die Integration des ORF für GFP mit N-terminal fusioniertem Signalpeptid <i>SP_{mig2.6}</i> unter Kontrolle des <i>P_{hxt1}</i> Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, Cbx
pDS39	pEntry-AtStp1	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung eines PCR-Produkts das mit den Primern AtSTP1_GW_f und AtSTP1_GW_r von pTF405a amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Monosaccharid-Transporters AtStp1 ohne Stopp-Codon flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS40	pExpr-pHxt-AtStp1-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS39, ermöglicht die Integration des ORF von AtStp1 mit C-terminal fusioniertem egfp unter Kontrolle des <i>P_{hxt1}</i> Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS41	pEntry-AtStp2	„Entry-Vektor“ aus einer Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und eines NcoI/NotI verdauten PCR-Produkts das mit den Primern AtSTP2_NcoI_f und AtSTP1_GW_r von pStp2 amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Monosaccharid-Transporters AtStp2 ohne Stopp-Codon flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS42	pExpr-pHxt-AtStp2-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS41, ermöglicht die Integration des ORF von AtStp2 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des <i>P_{hxt1}</i> Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS43	pEntry-CgHxt3	„Entry-Vektor“ aus einer Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und eines NcoI/NotI verdauten PCR-Produkts das mit den Primern CgHXT3_NcoI_f und CgHXT3_NotI_r von NEV-CgHXT3 amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Monosaccharid-Transporters CgHXT3 ohne Stopp-Codon flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan

pDS44	pExpr-pHxt-CgHxt3-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS43, ermöglicht die Integration des ORF von CgHXT3 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS45	pEntry-CgHxt5	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung eines PCR-Produkts das mit den Primern CgHXT5_GW_f und CgHxt5_GW_r von NEV-CgHXT5 amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Monosaccharid-Transporters CgHXT5 ohne Stopp-Codon flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS46	pExpr-pHxt-CgHxt5-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS45, ermöglicht die Integration des ORF von CgHXT5 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS47	pEntry-CkHup1	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung eines PCR-Produkts das mit den Primern CkHUP1_GW_f und CkHUP1_GW_r von NEV-CkHUP1 amplifiziert wurde. Enthält den ORF des Monosaccharid-Transporters CkHUP1 ohne Stopp-Codon flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS48	pExpr-pHxt-CkHup1-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS47, ermöglicht die Integration des ORF von CkHUP1 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des Phxt1 Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS49	pEntry Mel1	NcoI/NotI FRAGMENTS LIGATED	Kan
pDS50	pExpr-Phxt-Mel1	LR Reaktion	Amp, Cbx
pDS51	AtSTP1 optimiert	Enthält den für die Expression in <i>U. maydis</i> bi-codon optimierten ORF von AtStp1 in unbekanntem Vektor von Invitrogen mit Kanamycin Resistenz.	Amp
pDS52	pEntry AtStp1 opt	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung eines PCR-Produkts das mit den Primern AtStp1opt_GW_f und AtStp2opt_GW_r von pDS51 amplifiziert wurde. Enthält den bi-codon optimierten ORF des Monosaccharid-Transporters AtSTP1 ohne Stopp-Codon flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS53	pExpr AtStp1 opt	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS52, ermöglicht die Integration des bi-codon optimierten ORF von AtStp1 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des Phxt1 Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS54	pEntry-Hxt UVmut 11	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern UmHxt1_GW_for und UmHxt1_GW_rev von gDNA der Mutante#11 eines Mutagenese Screens amplifiziert wurde (Dillner, 2012). Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von hxt1 ohne Stop-Codon sowie einer Mutation, welche zum Aminosäureaustausch von Trpyptophan407 zu Serin führt.	Kan
pDS55	pExpr-Phxt-Hxt UVmut11	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS54, ermöglicht die Integration des ORF von Hxt1(W407S) mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des Phxt1 Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS56	pEntry-Hxt UVmut 17	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern UmHxt1_GW_for und UmHxt1_GW_rev von gDNA der Mutante#17 eines Mutagenese Screens amplifiziert wurde (Dillner, 2012). Enthält den von attL-	Kan

Rekombinationsstellen flankierten ORF von *hxt1* ohne Stop-Codon sowie einer Mutation, welche zum Aminosäureaustausch von Serin222 zu Leucin führt.

pDS57	pExpr-Phxt-Hxt UVmut17	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS56, ermöglicht die Integration des ORF von <i>Hxt1</i> (S222L) mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des Phxt1 Promotors in den <i>ip</i> Locus.	Amp, Cbx
pDS58	pNEVE-ZmSwt4a	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit EcoRI linearisierten Plasmid pNEV-E und einem mit EcoRI verdauten PCR Produkt das mit den Primern <i>ZmSwt4a_Eco5</i> und <i>ZmSwt4a_Eco3</i> von pZM_BFc0091L21 amplifiziert wurde. Enthält den ORF von <i>Zm000812</i> (<i>ZmSwt4a</i>) zur Expression in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura
pDS59	pNEVE-ZmSwt4b	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit EcoRI linearisierten Plasmid pNEV-E und einem mit EcoRI verdauten PCR Produkt das mit den Primern <i>ZmSwt4b_Eco5</i> und <i>ZmSwt4b_Eco3</i> von pZM_BFc0019P07 amplifiziert wurde. Enthält den ORF von <i>Zm144581</i> (<i>ZmSwt4b</i>) zur Expression in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura
pDS60	Topo-Gal10KO	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>um11600</i> , eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>um11600</i> und der durch SfiI aus dem Vektor pBSHhn gewonnenen Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor pCRII-TOPO. Ermöglicht die Amplifikation des <i>um11600</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	Amp, Kan, Hyg
pDS61	Topo-Gal10KO (RC)	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>um11600</i> , eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>um11600</i> und der durch SfiI aus dem Vektor pBSHhn gewonnenen Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor pCRII-TOPO. Ermöglicht die Amplifikation des <i>um11600</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	Amp, Kan, Hyg
pDS62	pNEVGW	"Destination"-Vektor, entstanden aus der Ligation des mit EcoRI linearisierten Vektors pNEV-E NcoI/NotI Fragments, dessen Schnittstellenüberhänge mit Mung Bean Nuclease entfernt wurden, mit der als 1771 bp EcoRV Fragment aus pDS33 gewonnenen GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B. Ermöglicht die LR-Klonase-vermittelte Integration von attB-flankierten PCR Amplifikaten in den Vektorhintergrund von pNEV-E zur Expression in <i>S. cerevisiae</i> ; trägt Amp- und Chloramphenicolresistenz sowie das <i>ccdB</i> -Selbstmordgen sowie den <i>ura3</i> -Marker zur Selektion in Hefe.	Amp, Cm, Ura
pDS63	pEntry Hxtmut11-stop	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung eines PCR-Produkts das mit den Primern <i>UmHxt1_GW_for</i> und <i>UmHxt_GW_stop_r</i> von pDS54 amplifiziert wurde. Enthält den ORF von <i>Hxt1</i> (W407S) flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS64	pNEVGW-Hxtmut11	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDS62 und pDS63, ermöglicht die Expression von <i>Hxt1</i> (W407S) in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura

pDS66	pNEVE-Hxtmut17	Entstanden aus der Ligation des EcoRI linearisierten pNEV-E und eines EcoRI verdauten PCR Produkts, das mit den Primern (Hxt1)W120um170_Eco5 und Hxt1_Eco3 von pDS56 amplifiziert wurde. Enthält den ORF von Hxt1(S222L) flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Amp, Ura
pDS67	Topo-Hxt1KO (Hyg)	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligations-produkts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>hxt1</i> , eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>hxt1</i> und der durch Sfil aus dem Vektor pBShhn gewonnenen Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor pCRII-TOPO. Ermöglicht die Amplifikation des <i>hxt1</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	Amp, Kan, Hyg
pDS69	pEntry-hxt1mut2	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern UmHxt1_GW_for und UmHxt1_GW_rev von gDNA der Mutante#2 eines Mutagenese Screens amplifiziert wurde (Dillner, 2012). Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>hxt1</i> ohne Stop-Codon sowie einer Mutation, welche zum Aminosäureaustausch von Glutamat412 zu Lysin führt.	Kan
pDS70	pExpr-hxt1mut2	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS69, ermöglicht die Integration des ORF von Hxt1(E412K) mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des Phxt1 Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS71	pEntry-bga1(stop)	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern 02356_fw und 02356_rev von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521 amplifiziert wurde. Enthält den ORF von um02356 flankiert von attL-Rekombinationsstellen.	Kan
pDS72	pExpr-phxt-bga1	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt und pDS72, ermöglicht die Integration des ORF von <i>um02356</i> unter Kontrolle des Phxt1 Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS73	pEntry-hxt1mut2(stop)	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern UmHxt1_GW_for und UmHxt_GW_stop_r von gDNA der Mutante#2 eines Mutagenese Screens amplifiziert wurde (Dillner, 2012). Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>hxt1</i> mit einer Mutation, welche zum Aminosäureaustausch von Glutamat412 zu Lysin führt.	Kan
pDS74	pNEV-GW-hxtmut2	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDS62 und pDS73, ermöglicht die Expression von Hxt1(E412K) in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura
pDS75	pEntry-Gal1(Y67F)	„Entry-Vektor“ aus einer Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und eines NcoI/NotI verdauten PCR-Produkts das mit den Primern Umgal1_nco_fw und Umgal1_not_cfus_rev von gDNA der Mutante#1 eines Mutagenese Screens amplifiziert wurde (Höll, 2012). Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>gal1</i> ohne Stopp-Codon sowie mit einer Mutation, welche zum Aminosäureaustausch von Tryptophan67 zu Phenylalanin führt.	Kan
pDS76	pExpr-phxt-Gal1(Y67F)-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS75, ermöglicht die Integration des ORF von Gal1(Y67F) mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des P_{hxt1} Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx

pDS77	pEntry-creA	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern mig1_GW_fw und mig1_GW_rev von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521 amplifiziert wurde. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>um04909</i> ohne Stop-Codon.	Kan
pDS78	pExpr-phxt-creA-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS77, ermöglicht die Integration des ORF von <i>um04909</i> mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des Phxt1 Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS79	creA-KO Konstrukt (Topo+)	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>um04909</i> , eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>um04909</i> und der durch Sfil aus dem Vektor pBShhn gewonnenen Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des <i>um04909</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	Amp, Kan, Hyg
pDS80	creA-KO Konstrukt (Topo-)	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>um04909</i> , eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>um04909</i> und der durch Sfil aus dem Vektor pBShhn gewonnenen Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des <i>um04909</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	Amp, Kan, Hyg
pDS81	pDest-pcreA-GFP (Hind/Xba)	"Destination"-Vektor, im ersten Schritt entstanden aus der Ligation eines 5358 bp NcoI/NotI Fragments aus p123:GFP und einem NcoI/NotI verdauten 2950 bp PCR-Produkt, das mit den Primern pmig1_hind_fw und pmig1_xba_nco_r von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521 amplifiziert wurde. Das resultierende Plasmid wurde mit NcoI linearisiert, die Schnittstellen-Überhänge mit Mung Bean Nuclease entfernt und mit der GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B ligiert. Ermöglicht die LR-Klonase-vermittelte Integration von attB-flankierten PCR Amplifikaten zur C-terminalen Fusion des gfp-Gens unter der Kontrolle des Pum04094-Promotors, welcher über HindIII (5') XbaI (3') Schnittstellen ausgeschnitten werden kann; trägt Amp- und Chloramphenicolresistenz sowie das ccdB-Selbstmordgen sowie die Carboxin Resistenzkassette für die homologe Integration in den ip-Lokus.	Amp, Cm, Cbx
pDS82	pgal1 in Topo	Topoisomerase-vermittelte Integration eines PCR-Produktes, das mit den Primern pgal1_NdeI_f und pGal1_NcoI_r von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521. Enthält ein 2,5 kb Promotor-Fragment von <i>gal1</i> (<i>um01962</i>) flankiert von NdeI und NotI Schnittstellen.	Amp
pDS83	gal1(Y67F) KI Konstrukt in Topo	Topoisomerase-vermittelte Integration eines PCR-Produktes, dass mit den Primern gal1_LB.f und gal1_sfi_rev auf gDNA aus Mutante#1 eines Mutagenese-Screens amplifiziert wurde (Höll, 2012), eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>gal1</i> und der durch Sfil aus dem Vektor pUM262 gewonnenen Nurseothricin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Enthält ein von BamHI/XhoII Schnittstellen flankiertes Konstrukt zur Integration des ORF von <i>gal1</i> (Y67F), welcher eine Mutation enthält, die zum Austausch von Tryptophan67 zu Phenylalanin führt	Amp, Kan, Nat

pDS84	pEntry-gal1(Y67H)	„Entry-Vektor“ aus einer Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und eines NcoI/NotI verdauten PCR-Produkts das mit den Primern Umgal1_nco_fw und Umgal1_not_cfus_rev von gDNA der Mutante#7 eines Mutagenese Screens amplifiziert wurde (Höll, 2012). Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>gal1</i> ohne Stopp-Codon sowie mit einer Mutation, welche zum Aminosäureaustausch von Tryptophan67 zu Histidin führt.	Kan
pDS85	pEntry-gal1	„Entry-Vektor“ aus einer Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und eines NcoI/NotI verdauten PCR-Produkts das mit den Primern Umgal1_nco_fw und Umgal1_not_cfus_rev von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>gal1</i> ohne Stopp-Codon.	Kan
pDS86	pExpr-phxt-Gal1-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS85, ermöglicht die Integration des ORF von Gal1 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des P_{hxt1} -Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS87	pExpr-pgal1-gal1-GFP	"Expressions"-Vektor, entstanden aus der Ligation 7kb NdeI/NcoI Fragments aus pDS86 mit einem 2,5kb NdeI/NcoI Fragment aus pDS82. Ermöglicht die Integration des ORF von Gal1 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle eines 2,5kb Promotor Fragments von <i>gal1</i> in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS88	pExpr-pgal1-gal1(Y67F)-GFP	"Expressions"-Vektor, entstanden aus der Ligation 7kb NdeI/NcoI Fragments aus pDS76 mit einem 2,5kb NdeI/NcoI Fragment aus pDS82. Ermöglicht die Integration des ORF von Gal1 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle eines 2,5kb Promotor Fragments von <i>gal1</i> in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS89	pExpr-phxt-10072-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS11, ermöglicht die Integration des ORF von Gal1 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des Phxt1 -Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS90	pEntry-gal7_cfus	„Entry-Vektor“ aus einer Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und eines NcoI/NotI verdauten PCR-Produkts das mit den Primern gal7_nco_f und gal7_not_cfus_r von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>gal7</i> (<i>um01875</i>) ohne Stopp-Codon.	Kan
pDS91	pExpr-phxt-gal7-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt:eGFP und pDS90, ermöglicht die Integration des ORF von Gal7 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des P_{hxt1} -Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS92	pEntry-gal7_stop	„Entry-Vektor“ aus einer Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und eines NcoI/NotI verdauten PCR-Produkts das mit den Primern gal7_nco_f und gal7_not_stop_r von gDNA aus <i>Ustilago maydis</i> 521. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>gal7</i> (<i>um01875</i>).	Kan
pDS93	pExpr-phxt-gal7	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt und pDS92, ermöglicht die Integration des ORF von Gal7 unter Kontrolle des P_{hxt1} -Promotors in den ip Locus. LR Reaktion mit pDS92 und pDest-phxt	Amp, Cbx
pDS94	pEntry-srt1_cfus	„Entry-Vektor“ aus einer Ligation eines 2556 bp NcoI/NotI Fragments aus pDS34 und eines NcoI/NotI verdauten PCR-Produkts das mit den Primern srt1_nco_f und	Kan

srt1_not_cfus_r von gDNA aus *Ustilago maydis* 521. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von *srt1*.

pDS95	pExpr-srt1-GFP	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDestphxt und pDS94, ermöglicht die Integration des ORF von Srt1 mit C-terminal fusioniertem eGFP unter Kontrolle des Phxt1 -Promotors in den ip Locus.	Amp, Cbx
pDS96	gal4 KO (Hyg) in Topo	Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von <i>um03714</i> , eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von <i>um03714</i> und der durch Sfil aus dem Vektor pBShhn gewonnenen Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1-TOPO. Ermöglicht die Amplifikation des <i>um03714</i> Deletionskonstrukts für <i>U. maydis</i> Transformationen.	Amp, Hyg
pDS97	gal7 KO (cbx) in Topo	Ligation eines 5,8kb Sfil-Fragments aus pBD1 mit einem 1,9kb Fragment aus pUMA260	Amp, Cbx
pDS98	XylDH KO (Hyg) in Topo	Ligation eines 5,8kb Fragments aus pBD2 mit einem 1,9kb Fragment aus pBS-hhn	Amp, Hyg
pDS99	XylRed KO (Hyg) in Topo	Ligation eines 5,8kb Fragments aus pBD3 mit einem 1,9kb Fragment aus pBS-hhn	Amp, Hyg
pDS100	pEntry-ZmSwt11(stop)	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP in vitro-Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR-Produkt, das mit den Primern ZmSwt11_GW_for und ZmSwt11_GW_rev vom Plasmid pZM_BFb0166M11. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von ZmSWT11.	Kan
pDS101	pNEVGW-ZmSwt11	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDS62 und pDS100, ermöglicht die Expression von ZmSWT11 in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura
pDS102	pEntry-ScGAL1(stop)	„Entry-Vektor“ aus der Ligation eines mit NcoI/NotI verdauten PCR Produkts von Hefe AH109 gDNA das mit Primern: Scgal1_Nco_for und Scgal1Notrevstop amplifiziert wurde mit einem 2,5kb NcoI/NotI-Fragment von pDS34. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>ScGAL1</i> .	Kan
pDS103	pNEV-ScGAL1	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDS62 und pDS102, ermöglicht die Expression von <i>ScGAL1</i> in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura
pDS104	pEntry-Umgal1(stop)	PCR Produkt von pDS85 mit Primern: Umgal1_Nco_fw und Umgal1_not_stop_rev mit NcoI/NotI verdaut und mit 2,5kb NcoI/NotI-Fragment von pDS34 ligiert. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>Umgal1</i> .	Kan
pDS105	pNEV-Umgal1	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDS62 und pDS104, ermöglicht die Expression von <i>Umgal1</i> in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura
pDS106	pEntry-Umgal1(Y67F)(stop)	PCR Produkt von pDS84 mit Primern: Umgal1_Nco_fw und Umgal1_not_stop_rev mit NcoI/NotI verdaut und mit 2,5kb NcoI/NotI-Fragment von pDS34 ligiert. Enthält den von attL-Rekombinationsstellen flankierten ORF von <i>Umgal1(Y67F)</i> .	Kan
pDS107	pNEV-Umgal1(Y67F)	„Expressions-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden pDS62 und pDS106, ermöglicht die Expression von <i>Umgal1(Y67F)</i> in <i>S. cerevisiae</i> .	Amp, Ura

Amp – Ampicillin-Resistenzgen, Kan – Kanamycin-Resistenzgen, Spec – Spectinomycin-Resistenzgen, Cm – Chloramphenicol-Resistenzgen, Hyg – Hygromycin-Resistenzgen, Cbx – Carboxin-Resistenzgen, Phleo – Phleomycin-Resistenzgen, Nat – Nurseothricin-Resistenzgen, Ura – Uracil-Auxotrophiemarkergen

4.1.4 Sonstige Materialien

Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 microns (Sigma), Roti®-Nylon plus Membran (Carl Roth) für den Transfer von DNA (Southern Blot), Roti®-PVDF-Membran (Carl Roth) für den Transfer von Proteinen (Western Blot), Nitrozellulose-Membran (Millipore), Papierfilter (S&S 595), 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt) und 2 ml-Reaktionsgefäße (Greiner), 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Biozym), 96-well PCR-Platten (Biozym) für qRT-PCR, Standard Universal Pipettenspitzen (0,5-10 µl, 2-200 µl und 100-1000µl) (Sarstedt, Carl Roth), Kapillarspitzen (Biozym), Petrischalen (Sarstedt), 15 ml und 50 ml PIPN-Röhrchen (Greiner), 1,5 ml Polystyrol-Küvetten (Sarstedt), 0,20 µm Sterilfilter (Carl Roth), 1 ml Einmalspritzen (Dispomed), Einmal-Injektionskanülen (B. Braun), Thermalpapier (Hitachi).

Falls nicht gesondert erwähnt wurden alle weiteren verwendeten Labormaterialien bei den Firmen Carl-Roth, Hartenstein, MAGV und NeoLab bezogen.

4.2 Mikrobiologische und genetische Methoden

4.2.1 *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen YT/Antibiotikum-Platten, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert waren, angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde fotometrisch in einem Pharmacia LKB Ultraspec III Fotometer bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet, eine OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

RbCl-Transformation von *E. coli*

modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972)

Zur Herstellung transformativkompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt wurde, mit 1 ml einer frischen TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 5-30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60 sec bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikum-Resistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁶ Transformanden pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung:

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

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
 10 mM RbCl
 75mM CaCl₂x2H₂O
 15% (v/v) Glycerin
 in H₂O bid. mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt und
 sterilfiltriert.

4.2.2 *S. cerevisiae***Kultivierung von *S. cerevisiae***

S. cerevisiae-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C oder 30°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von frisch ausgestrichenen YEPD-Platten bzw. SD(-ura)-Selektionsplatten oder von YEPD-Platten bzw. SD(-ura)-Selektionsplatten angeimpft, die weniger als eine Woche bei 4 °C gelagert waren.

Transformation von *S. cerevisiae*

Modifiziert nach (Ito *et al.*, 1983)

Für die Transformation von *S. cerevisiae* Zellen wurden 50 mL vorgewärmtes YEPD-Medium mit OD₆₀₀ = 0,1 einer frischen Übernachtskultur des Stamms YHUM0924 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 30 °C und 180 Upm inkubiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge stratos für 3 min bei 2000 Upm und Raumtemperatur) geerntet und in 15 mL sterilem H₂O resuspendiert, abzentrifugiert und in 10 mL SORB-Lösung gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 360 µL SORB aufgenommen. Es wurden 40 µL Lachssperma-DNA (Invitrogen) zugegeben, welche zuvor für 10 min bei 100°C in einem Eppendorf-Wärmeblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt wurde. An diesem Schritt können die Zellen in 50 µL Aliquots bei -80°C eingefroren werden.

Für die Transformation wurden 50 µL der kompetenten Zellen falls nötig auf Eis aufgetaut, mit 1 µL Plasmid-DNA versetzt und gemischt. Anschließend wurde das 6-fache Volumen steriler Lit-PEG-Lösung zugefügt, gemischt und der Ansatz für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 min bei 42 °C wurden die Zellen 3 min bei 2.000 Upm in einer Heraeus Biofuge pico abzentrifugiert, einmal mit YEPD-Medium gewaschen und in 100 µL TE-Puffer resuspendiert. Dieser Ansatz wurde auf einer SD(-ura)-Selektionsplatte ausplattiert.

SORB:

100 mM LiAc
 10 mM Tris-Cl, pH 8,0
 1 mM Na₂-EDTA, pH 8,0
 1 M Sorbitol
 in H₂O bid.

Lit/PEG:

50 g PEG-3500
 10 mL Lithium-Acetat-Lösung (100 mM)
 in 100 mL H₂O bid., sterilfiltriert

4.2.3 *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert. Für Wachstumstests auf Minimalmedien wurden die Petrischalen mit Parafilm luftdicht verschlossen. Übernachtskulturen wurden von bewachsenen CM-Platten, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert waren, angeimpft. Zur langfristigen Lagerung von Stämmen wurden Glycerinkulturen aus 50% NSY-Glycerin, 50% Yeps light-Übernachtskultur bei -80°C gelagert.

Transformation von *U. maydis*

(Gillissen *et al.*, 1992); (Schulz *et al.*, 1990)

Herstellung von Protoplasten von *U. maydis*:

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 20 ml YEPS light -Flüssigkultur angesetzt und über Nacht bei 28°C und 200 Upm geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:100, 1:300 oder 1:1.000 in 50 ml frischem YEPS light -Medium verdünnt und bei 28°C und 200 Upm bis zu einer Zelldichte von ca. 5×10^7 Zellen pro ml ($OD_{600} = 0,6 - 1$) weiter inkubiert. Nach Erreichen des optimalen Zelldichtes wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.500 Upm, 5 min, 4°C, Heraeus Biofuge stratos) in 50 ml Greiner-Röhrchen geerntet, einmal mit 25 ml SCS-Puffer gewaschen und in 4 ml SCS resuspendiert. anschließend wurden 5 ml SCS-Puffer mit 12 mg/ml Novozym 234 (sterilfiltriert) zugegeben. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung konnte mikroskopisch beobachtet werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (3-8 min) wurden die Ansätze auf 30 ml mit SCS-Puffer aufgefüllt und die Protoplasten durch 8-minütiges Zentrifugieren bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Biofuge stratos) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde das Pellet dreimal mit 10 ml SCS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde noch einmal mit 10 ml eiskaltem STC-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde danach in einem Volumen von 2,5 ml eiskaltem STC-Puffer aufgenommen und zu je 110 µl aliquotiert. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder bei -80°C mehrere Monate (bzw. Jahre) aufbewahrt werden.

Transformation von *U. maydis* Protoplasten

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-10 µl linearisierter Plasmid DNA bzw. Amplifikationsprodukt (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz vorher mit Top-Agar überschichteten Bottom-Agarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf CM-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker vereinzelt.

Wachstumstests auf Medien mit definierten Kohlenstoffquellen

Um das Wachstum von *U. maydis*-Stämmen in Abhängigkeit von definierten Kohlenstoffquellen zu testen, wurden die Stämme in YEPS light Flüssigmedium bis zu einer OD_{600} von 0,1-1,0 angezogen. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (3500 Upm, 4 min, RT, Heraeus Biofuge stratos), zwei mal mit sterilem H₂O bid. gewaschen und so in H₂O bid aufgenommen, dass die Zelldichte auf eine OD_{600} von 1,0 eingestellt wurde. Dann wurden 10^{-1} bis 10^{-5} Verdünnungen der Zellsuspensionen erstellt, von denen jeweils 3,5 µl auf die angegebenen Festmedien-Platten getropft wurden. Nachdem die Tropfen vom Medium absorbiert waren, wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und bei den jeweils angegebenen Temperaturen inkubiert.

Test auf filamentöses Wachstum

Um das Kreuzungsverhalten von *U. maydis*-Stämmen zu testen, wurden die Stämme in CM-Glukose Flüssigmedium bei 28°C bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,8 angezogen. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (3500 Upm, 4 min, RT) und so in H₂O bid aufgenommen, dass die Zelldichte auf eine OD_{600} von 1,0 eingestellt wurde. Bei Ko-Inokulationen von kompatiblen Kreuzungspartnern wurden gleiche

Volumina der Zellsuspensionen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3 bis 5 µl auf eine CM-Glukose Platte mit Aktivkohle getropft. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und für 24-48 Stunden bei 22°C inkubiert.

Pheromonkonfrontations-Test

nach (Snetselaar *et al.*, 1996)

Um die Pheromonekretion und perzeption von *U. maydis*-Stämmen zu testen, wurden die Stämme in YEPS light Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 angezogen. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (3500 Upm, 1 min, RT) und so in H₂O bid aufgenommen, dass die Zelldichte auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt wurde. Anschließend wurden ca. 0,5µl Tropfen der Zellsuspension eines Paarungstyps auf einem mit 2% Wasser Agar beschichteten Objektträger in einer Reihe aufgebracht. Nachdem die Flüssigkeit der Tropfen absorbiert war wurden in gleicher Weise 0,5µl Tropfen der Zellsuspension des zweiten Paarungstyps so aufgebracht, dass sie jeweils einen möglichst geringen Abstand zu den gegenüberliegenden, bereits eingezogenen Tropfen aufwiesen. Nachdem das Wasser der zweiten Tropfenreihe vollständig absorbiert war wurden Tropfenpaare, die einen sehr geringen Abstand hatten ohne sich jedoch zu berühren mit 3µl Paraffinöl bedeckt. Die so präparierten Objektträger wurden bis zur mikroskopischen Untersuchung abgedeckt bei 28°C inkubiert.

Aufnahmemessungen mit radioaktiv markierten Zuckern

Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀=0,6-1,0 in YEPS light Medium angezogen, 2 mal mit 50mM Na-P-Puffer pH 5,0 gewaschen und zu einer rechnerischen OD₆₀₀=10 in 50mM Na-P-Puffer pH 5,0 aufgenommen. Die Aufnahmemessungen wurden in Na-P-Puffer pH 5,0 mit einer initialen Substratkonzentration von 10 mM radioaktiv markierter Galactose bzw. Glucose durchgeführt. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 29°C inkubiert und die Aufnahmemessung durch Zugabe des radioaktiv markierten Substrats gestartet. Die Proben wurden zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten entnommen, über Nitrozellulose-Filter (Porengröße 0,8µm) gefiltert und mit reichlich destilliertem Wasser gewaschen. Die aufgenommene Radioaktivität wurde anschließend in einem Szintillationszähler bestimmt und unter Berücksichtigung des Gesamt-Szintillationswerts des jeweiligen Ansatzes die aufgenommene Menge des Zuckers berechnet. Diese wurde dann in Relation zum zuvor bestimmten „packed cell“-Volumens der verwendeten Kulturen für die jeweiligen Zeitpunkte dargestellt.

Pflanzeninfektionen

Für Pathogenitätstests wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 300 µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels sieben Tage alter Maispflanzen injiziert wurden. Zur Injektion adulter Pflanzen wurde bei ca. 6 Wochen alten Pflanzen der Quastenansatz im Inneren des Blattwirtels erfüllt und 1 cm oberhalb des Ansatzes 1 ml einer Pilzsuspension injiziert. Die entsprechenden Stämme wurden in YEPS_L Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,8 angezogen, durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in H₂O bid. aufgenommen (OD₆₀₀ ≈ 3,0). Die kompatiblen Stämme wurden vor der Injektion 1:1 gemischt. Die Bonitur erfolgte sieben (Keimlinge) bzw. 14 Tage (adulte Pflanzen) nach Injektion.

4.2.4 Mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie von *U. maydis*

Die zellbiologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (AxioImager Z1, Zeiss). Hierfür wurde ein 40x, 0,75 numerische Apertur EC Plan-Neofluar Objektiv (Zeiss) oder ein 63-faches Plan-Apochromat Ölimmersions-Objektiv (Carl Zeiss) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. Für die Betrachtung und photographische Dokumentation sind Zelldichten von 2,5 x 10⁶ Zellen/ml ideal. 5µl der zu untersuchenden Kultur wurden auf einen mit 2%iger Agarose beschichteten Objektträger gegeben.

Pflanzliche Proben wurden in 0,2% Triton X-100 bzw. in 60% Glycerin (nach WGA-AF488/Propidiumiodid-Färbung) eingebettet. Für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: eGFP – 450-490 nm und 515-565 nm, DAPI – 365 nm und 420-470 nm, CFP – 426-436 nm und 460-500 nm, YFP – 490-510 nm und 520- 550 nm, mCherry - 550-580 nm und 590-650 nm. Digitale Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (AxioCam MRm) gemacht.

Konfokale Aufnahmen erfolgten am Leica TCS-SP5. Hierfür wurden ein 40x, 1,25 numerische Apertur HCX Plan-Apochromat CS Ölimmersions-Objektiv, ein 63x, 1,4 numerische Apertur HCX Plan-Apochromat BI Ölimmersions-Objektiv sowie ein 63x 1,3 numerische Apertur HCX Plan-Apochromat CS Wasserimmersions-Objektiv. Für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurden zur Anregung folgende Lichtquellen benutzt: DAPI – 50 mW Diode 405 nm, CFP – 100 mW Argon Laser 458 nm, eGFP 100 mW Argon Laser 488 nm, YFP – 496 nm, mCherry und Propidiumiodid 10 mW DPSS (Festkörperlaser) 561 nm.

Die digitale Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit Zeiss AxioVision Rel. 4.6 und Gimp 2.6 (Kontrastverstärkung, Skalierung).

Färbemethoden

DAPI-Färbung

Um Zellkerne anzufärben wurden den zu untersuchenden Zellen etwa 20 µl einer 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Färbelösung (Vectashield H-1200 (Vector Laboratories)) gegeben. Dieser Farbstoff lagert sich an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an und ist somit geeignet, die DNA enthaltenden Zellkerne anzufärben (Tanius *et al.*, 1992). Bei Bedarf wurden die Zellen vor der Färbung fixiert. Dies erfolgte durch Zugabe von 37% Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 10%. Die Präparate wurden 15 min. bei RT inkubiert und anschließend zwei mal mit PBS gewaschen.

CellTracker Blue® (CMAC)-Färbung

Zur Visualisierung von Vakuolen wurde der CellTracker blue® (7-Amino-4-Chloromethyl-Coumarin)-Farbstoff (Life Technologies) verwendet. Die Färbung erfolgte bei *U.maydis* Zellen direkt im Medium. 1ml exponentiell wachsende Zellen wurden abzentrifugiert (3.500 Upm, 2 min, Raumtemperatur in einer Heraeus Biofuge pico) und in frischem CM-Medium, dem 10 µM (f.c.) des CMAC-Farbstoffs (Stammlösung: 20 mg/ml) zugesetzt wurden, resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 30 min langsam auf einem Schüttler geschwenkt, zweimal mit frischem CM-Medium gewaschen und direkt im Anschluss für die Fluoreszenzmikroskopie im CFP-Kanal verwendet.

Calcofluor-Färbung

Calcofluor bindet Chitin in pilzlichen Zellwänden und kann daher verwendet werden, um pilzliche Zellwände, Septen und Appressorien zu visualisieren (Monheit *et al.*, 1984). Ein bis zwei Tage nach der Pflanzeninfektion wurden die Blätter ca. 1 cm unter der Injektionsstelle abgetrennt und mit einer 1:10-Verdünnung einer Calcofluorfärbelösung (Stocklösung: 1 mg/ml, Fluka Analytical) überschichtet. Die Präparate wurden zwei Minuten bei RT inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen.

WGA-AF488/Propidiumiodid-Färbung

nach (Doehlemann *et al.*, 2009)

Weizenkeim-Agglutinin, ein Lektin, bindet selektiv an N-Acetylglucosamin- und N-Acetylneuraminsäure-Reste (Wright, 1984) und kann als Fluorescein-Konjugat verwendet werden, um pilzliche Zellwände und Septen fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren. Propidiumiodid wurde verwendet um pflanzliche Zellwände zu visualisieren. Ein bis fünf Tage nach der Pflanzeninfektion wurden die Blätter ca. 1 cm unter der Injektionsstelle abgetrennt. Es folgte eine Entfärbung der Blattschnitte für drei bis vier Tage in 100%igem Ethanol. Nachdem die Schnitte in H₂O bid. gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation in 10%-iger KOH bei 90°C (max. sechs Stunden). Danach wurde die KOH Lösung vorsichtig abpipettiert und die WGA-AF488/PI-Lösung aufpipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min. bei RT und danach die Entnahme der Färbelösung. Die Präparate können in 50%igem Glycerin aufbewahrt werden.

WGA-AF488/PI-Lösung:
1 µg/ml Propidium Iodide

10 µg/ml WGA-AF 488
0.02% Tween20

Diaminobenzidinfärbung

Für Diaminobenzidin (DAB)-Färbungen wurden Blattspreiten infizierter Pflanzen (3. Blatt) in voller Länge geerntet und mit der Schnittfläche für 12 h in einer 1 mg/ml DAB Lösung inkubiert (RT/dunkel). Danach wurden die Blätter in einem Ethanol-Chloroform-Gemisch (4:1) bei 4 °C entfärbt (ein bis zwei Tage; dunkel) und mikroskopisch analysiert. Konserviert wurden die Präparate in 10% Glycerol bei dunkler Lagerung (RT).

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

(Sambrook *et al.*, 1989a)

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach. 1,5 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur wurden 30 sec bei 14.000 Upm (RT, HeraeusBiofuge 15) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 45 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 - 100 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5% (v/v) TritonX-100
in H₂Obid.

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym in 1x TE-Puffer

Minilysat(III)-Lösung

3 M NaAc, pH 4,8 in H₂Obid.

DNA-Isolierung aus *U.maydis*

(Hoffman und Winston, 1987)

Für die Isolierung genomischer DNA wurden zunächst 2 ml einer *U. maydis* Übernachtskultur, die in 3 ml YEPSlight-Medium angezogen wurde, abzentrifugiert (zwei Minuten, 13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand wurde abgenommen. Zum Zellpellet wurden 400 µl Lysis-Puffer, 500 µl TE-Phenol/Chloroform sowie ca. 300 µg Glasperlen (150-200 µm Ø) gegeben. Das Gemisch wurde für 6-10 Minuten bei 1.400 Upm auf einem Vibrax-Schüttler kräftig geschüttelt, um die Zellen aufzuschließen. Zur Phasentrennen erfolgte anschließend ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico). Von der wässrigen Phase im Überstand wurden 400 µl in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA wurde durch Zugabe von einem ml 100% Ethanol und 15-minütiger Zentrifugation (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico) gefällt. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen bei RT in 50 µl TE-Puffer mit 50µg/ml RNaseA aufgenommen. Die DNA wurde anschließend bei 50°C und 850 Upm in einem Eppendorf-Thermomixer gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der genomischen DNA auf ein 0,8%-iges Agarose-Gel aufgetragen und analysiert.

U. maydis Lysis-Puffer

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

TE-Phenol/Chloroform

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

RNA-Isolierung aus Flüssigkulturen nach der Trizol-Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen verwendet. 50 mL Flüssigkultur ($OD_{600} \approx 0,5$) wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 2 mL Trizol resuspendiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen für fünf min in einer Kugelmühle (Retsch) bei 30 Hz aufgeschlossen. Nach einer Inkubation bei RT für fünf Minuten wurden pro mL Trizol 200 µl Chloroform zugegeben. Alle folgenden Angaben sind ebenso pro mL eingesetztem Trizol zu verstehen. Die Ansätze wurden anschließend kurz gevortext und zwei bis drei min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 15 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 10 min) wurde die pelletierte RNA mit 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für fünf min bei RT getrocknet, anschliessend in 50 µl Nuklease-freiem H₂O (Ambion) aufgenommen und für 10 min bei 55 °C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch fotometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyser (siehe Angaben des Herstellers).

RNA-Aufreinigung nach RNeasy-Protokoll

100 µl gelöste RNA wurde mit 350 µl Puffer RLT und 250 µl 100% EtOH gemischt. Dieser Ansatz wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 sec bei 10.000 Upm und RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE wurde die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm und RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die Säule zur Trocknung der Matrix erneut für zwei min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix pipettiert und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Das Eluat wurde für eine Wiederholung dieses Schrittes eingesetzt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

RNA-Isolierung aus pilzlichem Material von der Blattoberfläche (Latex-Methode)

modifiziert nach (Vranes, 2006)

Diese Methode dient der RNA-Isolierung aus pilzlichem Material von der Blattoberfläche. Infizierte Blätter (i. d. R. das innerste dritte Blatt) wurden ca. 2-3 cm unterhalb der Injektionsstelle abgeschnitten und mittels doppelseitigem Klebeband (Scotch-Pressure Sensitive Tape) auf einem Objektträger fixiert. Anschließend wurde ein dünner Film aus flüssigem Latex (R.A.H. Limited, Fantasy Liquid Latex, Orion-Fachgeschäft Marburg) mittels einer 10 µl Pipettenspitze aufgebracht und mit einem Haartrockner (Kaltstufe) 1-2 min lang getrocknet. Die Latexschicht wurde mit einer Pinzette vorsichtig abgezogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für einen Ansatz wurde Material von 6-8 Pflanzen zusammengegeben. Das Latexmaterial wurde zusammen mit 500 µl RLT- Puffer + β-Mercaptoethanol (RNeasy Mini-Kit, Qiagen) in einen mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten metallenen Mahlbecher (25 ml MM200, Retsch) mit zwei Mahlkugeln (Ø 10 mm rostfrei, Retsch) überführt. Die Proben wurden mit Hilfe einer Schwingmühle (MM200, Retsch) homogenisiert (5 min, 30 Hz). Das entstandene feine Pulver wurde mit ca. 0,3 g Glasperlen und 500µl RLT- Puffer + β-Mercaptoethanol in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Hilfe der Schwingmühle homogenisiert (5 min, 30 Hz). Der Überstand wurde nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm und RT (Biofuge; Heraeus) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das 0,5 fache Volumen an 100% Ethanol zugesetzt. Die weitere Aufreinigung der RNA folgte dem RNeasy Mini Kit-Protokoll (Qiagen) zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen und filamentösen Pilzen. Alle weiteren Einzelheiten gehen aus dem Herstellerprotokoll hervor. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte im

Anschluss durch fotometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyser (siehe Angaben des Herstellers).

4.3.2 Handhabung und *in vitro*-Modifikationen von Nukleinsäuren

Sämtliche *in vitro* Methoden zur Handhabung von Nukleinsäuren wurden, wenn nicht gesondert beschrieben, nach (Sambrook *et al.*, 1989a) durchgeführt.

Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und dem 2,5-fachen Volumen an kaltem 100% Ethanol versetzt, gemischt und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen H₂O_{bid.} oder TE-Puffer gelöst.

Alternativ erfolgte eine Fällung durch Zugabe eines halben Volumen einer 30% PEG 8000/30 mM MgCl₂ Lösung. Die Mischung wurde gründlich gemischt, 15 min bei RT inkubiert und das Präzipitat durch Zentrifugation pelletiert (13000 Upm, 15 min, Heraeus Biofuge pico). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in TE-Puffer gelöst.

Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen DNA-Lösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit gleichem Volumen TE-Phenol kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, Heraeus Biofuge pico) und die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In einem zweiten Schritt wurde die Probe mit dem gleichen Volumen PC ausgeschüttelt (Sambrook *et al.*, 1989b). Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert (s.o.).

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde fotometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an. Die Messungen erfolgten an einem Nanodrop-ND1000-Spektralfotometer.

Restriktion von DNA

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

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

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

Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

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

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

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C, anschließend weitere 15 min bei 55 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Extraktion mit 100 µL PC durchgeführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µL Na-Acetat, pH 5,3 und 250 µL Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmentenden

Das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I ist in der Lage, 5'-überhängende DNA-Fragmentenden in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und Magnesiumionen aufzufüllen und so glatte Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern durchgeführt werden. Dieses Vorgehen ist die Methode der Wahl, um nichtkompatible Fragmentenden ligierbar zu machen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg DNA-Fragmente in beliebigem Restriktionspuffer
50 µM dNTPs
1 U Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms folgte eine Inkubation bei 75 °C für 10 min. Derartig behandelte DNA-Fragmente können direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

Entfernen von 5'- und 3'-überhängenden DNA-Fragmentenden

Die Mungbohnen Nuklease (Mung Bean Nuclease, New England Biolabs) ist in der Lage, 5'- und 3'-überhängende DNA-Fragmentenden zu degradieren und so glatte Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in den meisten Restriktionspuffern vorzugsweise jedoch im mitgelieferten Mung Bean Nuclease Puffer durchgeführt werden. Dieses Vorgehen ist die Methode der Wahl, um nichtkompatible Fragmentenden mit 3'-Überhang ligierbar zu machen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

500 ng DNA-Fragmente in Mung Bean Nukleasepuffer
1 U Mung Bean Nuklease

Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz mit Hilfe eines DNA Aufreinigungskits (QIAquick PCR Purification, Qiagen) aufgereinigt. Derartig behandelte DNA-Fragmente können direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

Ligation von DNA-Fragmenten

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

100 ng linearisierter, dephosphorylierter Vektor

fünffach molarer Überschuss an linearem Fragment
1 U T4 DNA-Ligase
in 10 µL Ligase-Puffer

Der Ansatz wurde entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14 °C inkubiert.

GATEWAY® BP Clonase Reaktion

Die Klonierung von PCR-generierten, attB1 und attB2 flankierten PCR-Produkten wurde mittels Gateway® BP Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

1-7 µL attB-PCR-Produkt
1 µL pDONR221 (150 ng/µl)
ad 8 µL TE Puffer, pH 8.0
2 µL Clonase II Enzym Mix

Inkubation für 1 – 12 h bei RT.

Für eine Standard-Reaktion erfolgte die Zugabe von 1 µL Proteinase K Lösung und 10 min Inkubation bei 37 °C, anschließend erfolgte die Transformation von 1 µL der Klonasereaktion in *E. coli*.

Für eine „OneTube“-Reaktion erfolgte keine Addition von Proteinase K, stattdessen wurde der Ansatz direkt in eine LR-Reaktion eingesetzt.

GATEWAY® LR Clonase Reaktion

Die Klonierung Fragmenten aus pDONR221 in einen Zielvektor wurde mittels Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

1 µL Donorvektor (100 ng/µl) oder
7 µL BP-Reaktion)
1 µL Zielvektor (150 ng/µl)
ad 8 µL TE Puffer, pH 8.0
2 µL Clonase II Enzym Mix

Inkubation für 1 – 12 h bei RT, anschließend Zugabe von 1 µL Proteinase K Lösung und 10 min Inkubation bei 37 °C, anschließend erfolgte die Transformation von 1 µL der Klonasereaktion in *E. coli*.

Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989a). In der Regel wurden Gele mit 0,8% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE- oder 0,5xTBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit TAE- bzw. 0,5xTBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 10:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer „eagle eye“-Apparatur (Stratagene) bzw. einem E-BOX Video-Dokumentationssystem (Peqlab) detektiert und auf Thermalpapier fotografisch dokumentiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das JETSORB®- Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen freizuwaschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen die DNA

von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80 - 90 % isoliert werden.

4.3.3 Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen

Transfer von DNA (Southern-Analyse, Southern, 1975)

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT und 15 min in RENAT inkubiert.

Aufbau des Blots von unten nach oben:

Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir

Agarosegel

Nylonmembran (Hybond N+ bzw. Hybond XL)

3 Lagen Whatman 3MM

Stapel Papierhandtücher

Glasplatte

Gewicht (ca. 500 g)

Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran kurz getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung mit einem UV-Stratalinker 1800 (Stratagene) fixiert.

20x SSC-Puffer

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat * 2 H₂O in
H₂O_{bid.}, pH-Wert mit HCl auf
7,0 eingestellt

DENAT-Lösung

1,5 M NaCl
0,4 M NaOH
in H₂O_{bid.}

RENAT-Lösung

1,5 M NaCl
282 mM Tris-HCl 218 mM Tris-
Base

Spezifischer Nachweis von Nukleinsäuren (DIG-Protokoll)

Gen-spezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in die Sonden-DNA hergestellt. Ein typischer Ansatz für die Markierungsreaktion enthielt:

6,6 µl DNA (0,5-1 µg in H₂O_{bid.})

1 µl 10x DIG-Mix (Jena Bioscience, siehe Herstellerangaben)

1 µl 10x Octadeoxyribonukleotide in Markierungspuffer (New England Biolabs)

1 µl Albumin (10 µg/µl)

0,4 µl DNA Polymerase I large (Klenow)-Fragment (New England Biolabs)

Vor der Markierungsreaktion wurde die Sonden-DNA zunächst für 10 Minuten bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock denaturiert. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht, mindestens jedoch eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 µl 0,5 M Na₂-EDTA und/oder Inkubation für 10 Minuten bei 65°C gestoppt. Zur Fällung der Sonden-DNA wurde das Gemisch mit 1,4 µl 4 M LiCl und 37,5 µl 100% Ethanol versetzt und 20 Minuten zentrifugiert (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico). Das Pellet wurde in 1 ml Southern-Hybridisierungspuffer gelöst und 10 Minuten bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock oder einem Wasserbad denaturiert. Zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen der Nylon-Membran wurde diese mit Southern-Hybridisierungspuffer für 15-30 Minuten bei 65°C in einer Hybridisierungs-Röhre prä-inkubiert. Der Puffer wurde anschließend

verworfen, die denaturierte Sonde (in 10 ml Southern-Hybridisierungspuffer) hinzugegeben und über Nacht im Hybridisierungsöfen bei 65°C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran für je 15 Minuten bei 65°C mit 2xSSPE + 0,1% (v/v) SDS, 1xSSPE + 0,1% (v/v) SDS und 0,1xSSPE + 0,1% (v/v) SDS gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran bei RT in der Hybridisierungs-Röhre in den folgenden Lösungen inkubiert: fünf Minuten DIG-Waschpuffer, 30 Minuten DIG2-Lösung, 60 Minuten Antikörper-Lösung (1:7.500 Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung), und zwei Mal 15 Minuten in DIG-Waschpuffer. Anschließend wurde die Membran für fünf Minuten in DIG3-Lösung äquilibriert und für fünf Minuten in Chemilumineszenz-Lösung (1:500 CDP-Star Lösung (New England Biolabs) in DIG3) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und das Signal mit Hilfe der Chemilumineszenz-Anlage CHEMI-SMART-5100 (PeqLab) über eine CCD-Kamera mit einer durchschnittlichen Belichtungsdauer von 1-20 min. detektiert. Mit der Software Chemi-Capt (PeqLab) konnten digitale Aufnahmen bearbeitet oder für eine weitere Bearbeitung exportiert werden.

Southern-Hybridisierungspuffer

500 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,0
7% (w/v) SDS
in H₂Obid.

DIG-Waschpuffer

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

DIG1

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
in H₂Obid., pH-Wert auf 7,5 eingestellt

DIG2

5% Milchpulver (w/v)
in DIG1

DIG3

0,1 M Maleinsäure
0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂
in H₂Obid., pH-Wert auf 9,5 eingestellt

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Isolierung von Gesamtprotein aus *U. maydis*

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde aus etwa 50 ml Flüssigkultur bei OD₆₀₀ 0,6-0,1 durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (3.500 rpm, 4 min, Heraeus Varifuge), dreimal mit TBS gewaschen und schließlich in 1,5 ml PBS-Puffer mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten metallene Mahlbecher (25 ml, MM200, Retsch) überführt, in denen sich zwei Mahlkugeln (Ø 10 mm rostfrei, Retsch) befanden. Die Zellen wurden in der Schwingmühle (MM200, Retsch) für 5 min bei einer Frequenz von 25 Hz geöffnet. Anschließend wurde der pulverige Zellextrakt direkt in Eppendorf-Gefäße mit kochendem 6x Probenpuffer gegeben und 5 min bei 95°C inkubiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (13.000 rpm, 10 min, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand für die Auftrennung in SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen weiterverwendet. Als Proteinase-Inhibitor wurden in der Regel 2 mM PMSF, 5 mM Benzamidin und 1x Complete EDTA-free (Roche) verwendet.

4.4.2 Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Als Laufkammer diente eine Mini Protean II Apparatur (BioRad). Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA (pro Gel) für 25-30 Minuten bis die Auftragspufferbande die Trenngel-Schicht erreicht hatte. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte standardmäßig bei 40 mA für 45 Minuten oder bei 30 mA (pro Gel) für 60 Minuten. Standardmäßig wurden Gele mit 10% Acrylamid hergestellt:

Sammelgel (5%)

0,333 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
0,25 ml Sammelgel-Puffer, pH 6,8
1,385 ml H₂O_{bid.} 20 µl
10% SDS
10 µl 10% APS (w/v in H₂O_{bid.})
2 µl TEMED

Sammelgel-Puffer (4x)

55 mM Tris-Base
445 mM Tris-HCl
Mit H₂O_{bid.} angesetzt und pH-Wert auf 6,8 eingestellt.

Trenngel (10%)

1,667 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
1,875 ml Trenngel-Puffer, pH 8,8
1,364 ml H₂O_{bid.} 50 µl 10% SDS
40 µl 10% APS (w/v in H₂O_{bid.})
4 µl TEMED

Trenngel-Puffer (4x)

1,27 M Tris-Base
0,23 M Tris-HCl
Mit H₂O_{bid.} angesetzt und pH-Wert auf 8,8 eingestellt.

Laufpuffer für Protein-Gele

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

Laemmli-Puffer

60 mM Tris-HCl, pH 6,8
2% (v/v) SDS
10% (v/v) Glycerin
5% (v/v) β-Mercaptoethanol
0,01% (w/v) Bromphenolblau

Als Größenstandard für die Proteingele wurde der peqGOLD Prestained Protein-Marker IV und der PeqGOLD Protein Marker IV (beide Peqlab) verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Coomassie Färbelösung

20% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
0,25% (w/v) Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung

20% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

4.4.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)

(nach Towbin *et al.*, 1979)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran (Roti®-PVDF (Carl Roth)) mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry Blotting Apparatur für eine Stunde mit 100 mA pro Gel (oder 1 mA pro cm² Gel). Der Aufbau des Blots von der Kathode in Richtung Anode geschah folgendermaßen:

3 Lagen Whatman (3mm)-Papier, in Kathodenpuffer getränkt
SDS-Polyacrylamid-Gel (für 10 Minuten in Kathodenpuffer äquilibriert)
PVDF-Membran (1 Minute in Methanol aktiviert, mit H₂O_{bid.} gespült und für 10 Minuten in Anodenpuffer 2 äquilibriert)
1 Lage Whatman (3mm)-Papier (in Anodenpuffer 2 getränkt)
2 Lagen Whatman (3mm)-Papier (in Anodenpuffer 1 getränkt)

Der spezifische, immunologische Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte mit Hilfe der an einen sekundären Antikörper konjugierten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach dem Elektro-Blot wurde die PVDF-Membran zunächst für 30 Minuten in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bis über Nacht mit 3 ml des primären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5% Milchpulver), in eine Plastikfolie eingeschweißt, auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde danach für drei mal 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit 3 ml des sekundären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5% Milchpulver) inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe für jeweils 10 Minuten in TBST-Puffer und ein Waschschriff in TBS-Puffer.

Tab. 4.8 Bei Western-Analysen verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-GFP-Antikörper	Kaninchen	1:5000	Sigma-Aldrich, H3663
anti-Kaninchen-Antikörper	Ziege	1:2500	Promega W402B

Für die Detektion wurden je 1 ml ECL 1- und ECL 2-Lösung gemischt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und das Signal mit Hilfe der Chemilumineszenz-Anlage CHEMI-SMART-5100 (PeqLab) über eine CCD-Kamera mit einer durchschnittlichen Belichtungsdauer von 1-20 min. detektiert. Mit der Software Chemi-Capt (PeqLab) konnten digitale Aufnahmen bearbeitet oder für eine weitere Bearbeitung exportiert werden. Zur semi-quantitativen Bestimmung der Proteinmenge wurde die Membran nach der Detektion für 1 min. mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend über Nacht in H₂O bid. entfärbt.

Anodenpuffer 1

300 mM Tris-HCl, pH 10,4
15% (v/v) Methanol
in H₂O bid.

TBST-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,9
136 mM NaCl
0,05% (v/v) Tween-20

Anodenpuffer 2

30 mM Tris-HCl, pH 10,4
15% (v/v) Methanol
in H₂O bid.

ECL 1-Lösung

10 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5
44 µl 90 mM Coumarinsäure
100 µl 250 mM Luminol

Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 9,4
40 mM γ-Aminocapronsäure
15% (v/v) Methanol in H₂O bid.

ECL 2-Lösung

10 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5
6 µl 30% H₂O₂

4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierte Methoden

4.5.1 Standard PCR-Ansätze

Die PCR bietet die Möglichkeit, definierte DNA-Bereiche selektiv zu amplifizieren. Hierfür sind zwei Primer nötig, von denen einer zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz, der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research) durchgeführt.

Standard-PCR-Protokoll

nach (Innis *et al.*, 1990)

Es wurden folgende Ansätze verwendet:

100 ng Matritzen-DNA
2 U Taq-DNA-Polymerase
0,4 µl 25 mM dNTPs
0,5 µl je Primer (100 pmol/µl)
in 50 µl PCR-Puffer

Initiale Denaturierung: 94 °C / 5 min

Amplifikation: 94 °C / 1 min
(30 Zyklen) x °C / 1 min

72 °C / y min

Finale Elongation: 72 °C / 10 min

Bei Auftreten von unspezifischen PCR-Produkten wurde die PCR nach der Hot Start-Methode ausgeführt. Dabei wurde die Polymerase erst zugegeben, nachdem der restliche Reaktionsansatz eine Temperatur von 95°C für mindestens 30 sec erreicht hatte.

PHUSION®-Polymerase -Protokoll

Für die Amplifikation genomischer Fragmente von *U. maydis* oder die Amplifikation von Fragmenten, welche für Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde die PHUSION Polymerase (Finnzymes) verwendet, welche sich durch eine hohe Prozessivität und niedrige Fehleranfälligkeit auszeichnet.

100ng Matrizen-DNA (genomisch) bzw. 5ng Matrizen-DNA (Plasmid)
2 U PHUSION® DNA Polymerase
1 µl 10 mM dNTPs
0,5 µl je Primer (50 pmol/µl)
in 50 µl PHUSION®-Puffer

Initiale Denaturierung: 98 °C / 30 sec

Amplifikation: 98 °C / 5 sec
(30-33 Zyklen) x °C / 15 sec
72 °C / y sec

Finale Elongation: 72 °C / 7 min

4.5.2 Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für *U. maydis*

nach (Kämper, 2004)

Mit dieser Methode können gezielt offene Leserahmen von Genen in *U. maydis* deletiert werden. Man bedient sich hierbei des Mechanismus der homologen Rekombination über die angrenzenden genomischen Flanken. Eine Klonierung der Fragmente ist dabei nicht notwendig. Prinzipiell erfolgt zunächst eine PCR-Amplifikation des 5'- und 3'- gelegenen Bereichs des zu deletierenden Gens. Die Fragmente sollten dabei etwa eine Länge von etwa 1 kb haben. Über geeignete PCR-Oligonukleotide wurden an den dem offenen Leseraster zugewandten Enden der Amplifikate *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Nach Restriktion der PCR-Produkte wird über die *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eine *Sfi*I-geschnittene Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn direkt zwischen die amplifizierten Flanken ligiert. Mit einer weiteren PCR mit den jeweiligen Außenprimern für die Flanken wird das komplette Deletionskonstrukt amplifiziert, aufgereinigt und für die Transformation in *U. maydis* verwendet. Für alle PCR-Amplifikationen wurde Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Alle Änderungen im Bezug auf den in (Kämper, 2004) publizierten Ablauf sind im folgenden dargestellt: PCR-Amplifikation der Flanken: Ein Außenprimer und ein Innenprimer mit *Sfi*I-Restriktionsschnittstelle wurden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d. h. die linke (5'-) bzw. rechte (3'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens wurde über je eine QiaQuick PCR Purification Säule (Qiagen) aufgereinigt. Die eluierten Flanken wurden anschließend mit *Sfi*I nachgeschnitten (20 U *Sfi*I; 2 h, 50°C, Gesamtvolumen: 20-50 µl). Es folgte eine Aufreinigung der restringierten Flanken über eine weitere QiaQuick PCR Purification Säule (Qiagen). Im Anschluss erfolgte die Ligation der Flanken mit der mit *Sfi*I-restringierten Resistenzkassette. Als Resistenzkassetten zur Selektion der Deletionskonstrukte wurden verwendet: eine Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn, eine Carboxin-Resistenzkassette aus pUMa260 oder eine Nourseothricin-Resistenzkassette aus pUMa262. Nach zweistündiger Ligation bei RT wurde der Ligationsansatz über ein 0,8%iges TBE-Agarosegel

aufgetrennt, die 4 kb-Bande (bestehend aus linker Flanke, Resistenzkassette und rechter Flanke) aufgereinigt und als Matrize in die abschließende PCR eingesetzt. Hierbei wurden „nested“-Oligonukleotide verwendet um eine effiziente und spezifische Amplifikation des Deletionskonstruktes zu gewährleisten. Nach der PEG-Fällung des PCR- Reaktionsgemisches wurde die DNA in 10-20 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend für die Transformation von *U. maydis* Protoplasten eingesetzt.

4.5.3 DNase I Behandlung und Reverse Transkription für die Real-Time-PCR

Für die reverse Transkription wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA mit Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen (siehe Herstellerprotokoll TURBO DNA-free™ Kit). Für die reverse Transkription wurden das ProtoScript AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB), das SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) oder das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) jeweils nach Herstellerprotokoll verwendet. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus Pilzkulturen und Tumormaterial extrahiert wurde, wurden 0,5-3 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo d(T)20-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (Details, siehe Herstellerprotokoll) für die Erststrang-cDNA-Synthese unter den angegebenen Bedingungen inkubiert.

4.5.4 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Für Real-time PCR Analysen wurde das MESA GREEN qPCR Master Mix plus for SYBR Assay +Fluorescein Kit (Eurogentech) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden 2-5 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt (s.o.). Die Reaktionen erfolgten auf einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des folgenden Programms:

Initiale Denaturierung:	95 °C	/ 7 min
Amplifikation:	95 °C	/ 30 sec
(45 Zyklen)	60 °C	/ 20 sec
	72 °C	/ 40 sec

Im Anschluß hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am BioRad-iCycler-System überprüft. Zur Kalkulation des CT-Wertes (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Program Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma Biorad. Die Analyse der Proben aus (Skibbe *et al.*, 2010) wurde mit dem IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) auf einem Bio-Rad CFX96 System unter Verwendung o.g. Programms durchgeführt. Die Kalkulation der CT-Werte erfolgte in diesem Fall aus den unbearbeiteten Fluoreszenzwerten mit Hilfe der PCR Miner Software (Zhao und Fernald, 2005). Die Berechnung der relative Expressionswerte erfolgte mit Microsoft Excel unter Verwendung einer Vorlage der PCR Miner Software.

4.6 Transkriptomanalysen

Die Synthese von fragmentierter cRNA zur Array-Hybridisierung erfolgte mit dem GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix). Die dabei eingesetzte RNA wurde mit der „Latex-Methode“ aus Stämmen isoliert, die auf der Pflanzenoberfläche inkubiert wurden. Die einzelnen Reaktionen wurden mit 100 ng Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial den Herstellerangaben entsprechend in einem Thermocycler durchgeführt. Die Aufreinigung der cRNA vor der Fragmentierung erfolgte über RNeasy-Säulen (Qiagen). Für die Hybridisierung, das Waschen und Färben der Arrays wurde das GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix) sowie einzelne Reagenzien des GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die Hybridisierung erfolgte in einem GeneChip® Hybridization Oven 645, die Wach-Schritte in der Affymetrix® GeneChip®

Fluidics Station 450 und die Detektion des Signals in einem Affymetrix GeneChip Scanner. Das resultierende Bild wurde zunächst durch Verwendung des Programms AFFYMETRIX MICROARRAY SUITE 5.1 (Affymetrix) ausgewertet, normalisiert und die Expressionswerte kalkuliert. Die anschließende Datenanalyse wurde mit dem Program dChip durchgeführt. Dabei wurde ein Expressionsunterschied >100 eine mehr als zweifache Änderung der Genexpression und ein adjusted P-value <0.01 als signifikant eingestuft.

4.7 Sequenzanalysen und *in silico* Methoden

Sequenzierung von DNA

Sämtliche Sequenzierungen von DNA wurden vom Sequencing Service Department der Ludwig-Maximilian-Universität München nach dem Cycle, Clean & Run Protokoll durchgeführt. Für Sequenzierungen wurde Plasmid DNA verwendet, die mit dem Roti®-Prep Plasmid MINI Kit (Carl Roth) isoliert wurde.

Es wurden folgende Ansätze verwendet:

150-300 ng	Matritzen-DNA
1 µl	Sequenzieroligo (5 pmol/µl)
ad 7 µL	10 mM Tris/HCl, pH 8,5

Die erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in Sequencher 4.9 (Gene Codes Corporation) importiert werden.

Sequenz- und Strukturanalyse

Folgende Programme wurden für die Sequenz- und Strukturanalyse von DNA- und Proteinsequenzen oder zur weiteren Verarbeitung von Rohdaten verwendet:

ApE – „A Plasmid Editor“ zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und zeichnen von Plasmidkarten.

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

BOXshade 3.2 zur graphischen Darstellung von mit CLUSTAL W oder CLUSTAL X erstellten multiplen Sequenzalignments.

CloneManager (Version 9.0, Sci Ed Central Software) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und zeichnen von Plasmidkarten.

CLUSTALW und CLUSTALX Version 2.0 (Goujon *et al.*, 2010; Larkin *et al.*, 2007) zum automatisierten Sequenzabgleich mehrerer Proteinsequenzen.

Dicodon-Optimierungs-Tool (F. Finkernagel, pers. Mitteilung) zur Erstellung von Dicodon-optimierten DNA-Sequenzen (<http://dicodon-optimization.appspot.com/>)

FigTree 1.3.1 zur graphischen Darstellung von phylogenetischen Analysen.

FunCat zur Klassifizierung von Proteinen in funktionelle Kategorien (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>)

MAFFT 6.0 (Kato und Toh, 2008) zum automatisierten Sequenzabgleich mehrerer Proteinsequenzen und phylogenetischen Analysen. (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)

MFOLD (Zuker, 2003) (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) zur Bestimmung von Sekundärstrukturen in qPCR-Amplifikaten und mRNAs.

PCR Miner (Zhao und Fernald, 2005) zur Berechnung von CT-Werten aus Fluoreszenzrohdaten von Realtime PCR Experimenten (<http://www.miner.ewindup.info/Version2>)

PFAM (Sonnhammer *et al.*, 1997) zur Vorhersage konservierter Proteindomänen bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

SEQUENCHER 4.9 (GENECODES) zur Bearbeitung von Sequenzrohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

VektorNTI 11.0 (Invitrogen) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Primern und zeichnen von genetischen Karten.

Die folgenden Datenbanken wurden zur Identifizierung von orthologen Proteinsequenzen anhand annotierter Funktionen und zur Analyse von DNA- und Protein-Sequenzdaten verwendet.

MIPS *Ustilago maydis* Database (MUMDB): <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>

Saccharomyces Genome Database (SGD): <http://www.yeastgenome.org>

Aramemnon plant membrane protein database: <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>

Maize Genetic and Genomic Database (MaizeGDB): <http://www.maizegdb.org/>

KEGG Pathway Database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

5 Literaturverzeichnis

ABRAMOVITCH, R. B., und MARTIN, G. B. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 356-364.

AI, Y., ZHENG, Z., O'BRIEN-JENKINS, A., BERNARD, D. J., WYNshaw-BORIS, T., NING, C., REYNOLDS, R., SEGAL, S., HUANG, K., und STAMBOLIAN, D. (2000). A mouse model of galactose-induced cataracts. *Hum Mol Genet* **9**, 1821-1827.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., und LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., und LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

ALVARADO, F. (1960). Substrate specificity of *Saccharomyces fragilis* galactokinase. *Biochim Biophys Acta* **41**, 233-238.

AUSUBEL, F. M., BRENZ, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., und STRUKL, K. (1987a). *Current Protocols in Molecular Biology* (USA, John Wiley & Sons, Inc.).

AUSUBEL, M. A., AUSUBEL, M. A., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMANN, J. G., und SMITH, J. A., eds. (1987b). *Current protocols in molecular biology* (John Wiley & Sons, Inc.).

BAKER, R. F., und BRAUN, D. M. (2008). Tie-dyed2 functions with tie-dyed1 to promote carbohydrate export from maize leaves. *Plant Physiol* **146**, 1085-1097.

BAKKEREN, G., KAMPER, J., und SCHIRAWSKI, J. (2008). Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genetics and Biology* **45**, S15-S21.

BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I. (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.

BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I. (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycology* **18**, 247-266.

BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.

BECHINGER, C., GIEBEL, K. F., SCHNELL, M., LEIDERER, P., DEISING, H. B., und BASTMEYER, M. (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**, 1896-1899.

BERGER, S., PAPADOPOULOS, M., SCHREIBER, U., KAISER, W., und ROITSCH, T. (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* **122**, 419-428.

BERGER, S., SINHA, A. K., und ROITSCH, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* **58**, 4019-4026.

- BETINA, S., GOFFRINI, P., FERRERO, I., und WESOLOWSKI-LOUVEL, M.** (2001). RAG4 gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **158**, 541-548.
- BHAT, P. J., und HOPPER, J. E.** (1992). Overproduction of the Gal1 or Gal3 Protein Causes Galactose-Independent Activation of the Gal4 Protein - Evidence for a New Model of Induction for the Yeast Gal Met Regulon. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 2701-2707.
- BIEMELT, S., und SONNEWALD, U.** (2006). Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* **163**, 307-318.
- BISWAS, S., VAN DIJCK, P., und DATTA, A.** (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **71**, 348-376.
- BLANK, T. E., WOODS, M. P., LEBO, C. M., XIN, P., und HOPPER, J. E.** (1997). Novel Gal3 proteins showing altered Gal80p binding cause constitutive transcription of Gal4p-activated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 2566-2575.
- BÖLKER, M., GENIN, S., LEHMLER, C., und KAHMANN, R.** (1995). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- BÖLKER, M., URBAN, M., und KAHMANN, R.** (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- BOORER, K. J., LOO, D. D. F., und WRIGHT, E. M.** (1994). Steady-State and Presteady-State Kinetics of the H⁺/Hexose Cotransporter (Stp1) from *Arabidopsis thaliana*-Thaliana Expressed in *Xenopus*-Oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 20417-20424.
- BORTFELD, M., AUFFARTH, K., KAHMANN, R., und BASSE, C. W.** (2004). The *Ustilago maydis* a2 mating-type locus genes *lga2* and *rga2* compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein *Mrb1*. *Plant Cell* **16**, 2233-2248.
- BOSCH, A. M.** (2006). Classical galactosaemia revisited. *J Inherit Metab Dis* **29**, 516-525.
- BOTTIN, A., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- BRACHMANN, A.** (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- BRACHMANN, A., KONIG, J., JULIUS, C., und FELDBRÜGGE, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- BRACHMANN, A., WEINZIERL, G., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- BRAUN, D. M., MA, Y., INADA, N., MUSZYNSKI, M. G., und BAKER, R. F.** (2006). tie-dyed1 Regulates carbohydrate accumulation in maize leaves. *Plant Physiol* **142**, 1511-1522.
- BREFORT, T., DOEHLEMANN, G., MENDOZA-MENDOZA, A., REISSMANN, S., DJAMEI, A., und KAHMANN, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-445.
- BROWN, V., SABINA, J., und JOHNSTON, M.** (2009). Specialized sugar sensing in diverse fungi. *Curr Biol* **19**, 436-441.

- BROWN, V., SEXTON, J. A., und JOHNSTON, M.** (2006). A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **5**, 1726-1737.
- BUCHSEL, R., HASSELS-VISCHER, B., TAUBER, R., und REUTTER, W.** (1980). 2-Deoxy-D-galactose impairs the fucosylation of glycoproteins of rat liver and Morris hepatoma. *European journal of biochemistry / FEBS* **111**, 445-453.
- BURKLE, L., HIBBERD, J. M., QUICK, W. P., KUHN, C., HIRNER, B., und FROMMER, W. B.** (1998). The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* **118**, 59-68.
- CARLSON, M.** (1999). Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**, 202-207.
- CHEN, L. Q., HOU, B. H., LALONDE, S., TAKANAGA, H., HARTUNG, M. L., QU, X. Q., GUO, W. J., KIM, J. G., UNDERWOOD, W., CHAUDHURI, B., et al.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527-532.
- CHEN, L. Q., QU, X. Q., HOU, B. H., SOSSO, D., OSORIO, S., FERNIE, A. R., und FROMMER, W. B.** (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207-211.
- CHOU, H. M., BUNDOCK, N., ROLFE, S. A., und SCHOLES, J. D.** (2000). Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology* **1**, 99-113.
- CHRISTENSEN, J. J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- CHRISTENSEN, U., GRUBEN, B. S., MADRID, S., MULDER, H., NIKOLAEV, I., und DE VRIES, R. P.** (2011). Unique regulatory mechanism for D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 7084-7087.
- CHU, Z., FU, B., YANG, H., XU, C., LI, Z., SANCHEZ, A., PARK, Y. J., BENNETZEN, J. L., ZHANG, Q., und WANG, S.** (2006a). Targeting xa13, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *Theor Appl Genet* **112**, 455-461.
- CHU, Z. H., YUAN, M., YAO, L. L., GE, X. J., YUAN, B., XU, C. G., LI, X. H., FU, B. Y., LI, Z. K., BENNETZEN, J. L., et al.** (2006b). Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes & Development* **20**, 1250-1255.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C., und HSU, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 2110-2114.
- COOPER, C. S., und MACDONALD, P. W.** (1970). Energetics of Early Seedling Growth in Corn (*Zea-Mays* L). *Crop Science* **10**, 136-&.
- COSTES, S., LONGUET, C., BROCA, C., FARUQUE, O., HANI, E. H., BATAILLE, D., und DALLE, S.** (2004). Cooperative effects between protein kinase A and p44/p42 mitogen-activated protein kinase to promote cAMP-responsive element binding protein activation after beta cell stimulation by glucose and its alteration due to glucotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* **1030**, 230-242.
- DE JONGE, R., BOLTON, M. D., und THOMMA, B. P.** (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 400-406.

- DE JONGH, W. A., BRO, C., OSTERGAARD, S., REGENBERG, B., OLSSON, L., und NIELSEN, J. (2008). The roles of galactitol, galactose-1-phosphate, and phosphoglucomutase in galactose-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **101**, 317-326.
- DE VIT, M. J., WADDLE, J. A., und JOHNSTON, M. (1997). Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol-Biol-Cell* **8**, 1603-1618.
- DECHANT, R., BINDA, M., LEE, S. S., PELET, S., WINDERICKX, J., und PETER, M. (2010). Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J* **29**, 2515-2526.
- DELROT, S., und BONNEMAIN, J. L. (1981). Involvement of Protons as a Substrate for the Sucrose Carrier during Phloem Loading in *Vicia faba* Leaves. *Plant Physiol* **67**, 560-564.
- DEMEREK, M., ADELBERG, E. A., CLARK, A. J., und HARTMAN, P. E. (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* **54**, 61-76.
- DEUSCHLE, K., CHAUDHURI, B., OKUMOTO, S., LAGER, I., LALONDE, S., und FROMMER, W. B. (2006). Rapid metabolism of glucose detected with FRET glucose nanosensors in epidermal cells and intact roots of *Arabidopsis thaliana* RNA-silencing mutants. *Plant Cell* **18**, 2314-2325.
- DEUSCHLE, K., OKUMOTO, S., FEHR, M., LOOGER, L. L., KOZHUKH, L., und FROMMER, W. B. (2005). Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Sci* **14**, 2304-2314.
- DILLNER, B. (2012) Untersuchung der Hxt1 Signalkaskade und des Galactosestoffwechsels in *Ustilago maydis*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- DJAMEI, A., SCHIPPER, K., RABE, F., GHOSH, A., VINCON, V., KAHNT, J., OSORIO, S., TOHGE, T., FERNIE, A. R., FEUSSNER, I., *et al.* (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-398.
- DOEBLEY, J. (1992). Mapping the Genes That Made Maize. *Trends in Genetics* **8**, 302-307.
- DOEHLEMANN, G., VAN DER LINDE, K., ASSMANN, D., SCHWAMMBACH, D., HOF, A., MOHANTY, A., JACKSON, D., und KAHMANN, R. (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- DOEHLEMANN, G., WAHL, R., HORST, R. J., VOLL, L. M., USADEL, B., POREE, F., STITT, M., PONS-KUHNEMANN, J., SONNEWALD, U., KAHMANN, R., und KAMPER, J. (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**, 181-195.
- DOIDY, J., GRACE, E., KUHN, C., SIMON-PLAS, F., CASIERI, L., und WIPF, D. (2012). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* **17**, 413-422.
- DONATON, M. C., HOLSBEEKS, I., LAGATIE, O., VAN ZEEBROECK, G., CRAUWELS, M., WINDERICKX, J., und THEVELEIN, J. M. (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **50**, 911-929.
- DORMANN, P., und BENNING, C. (1998). The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **13**, 641-652.

- DOUGLAS, H. C., und HAWTHORNE, D. C.** (1964). Enzymatic Expression + Genetic Linkage of Genes Controlling Galactose Utilization in *Saccharomyces*. *Genetics* **49**, 837-&.
- DURRANT, W. E., und DONG, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185-209.
- EDGEcombe, A. E.** (1938). The Effect of Galactose on the Growth of Certain Fungi. *Mycologia* **30**, 601-624.
- EGERT, A., PETERS, S., GUYOT, C., STIEGER, B., und KELLER, F.** (2012). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion mutant for galactokinase (AtGALK, At3g06580) hyperaccumulates free galactose and is insensitive to exogenous galactose. *Plant Cell Physiol* **53**, 921-929.
- EMANUELSSON, O., NIELSEN, H., BRUNAK, S., und VON HEIJNE, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016.
- EVERT, R. F., ESCHRICH, W., und HEYSER, W.** (1978). Leaf Structure in Relation to Solute Transport and Phloem Loading in *Zea-Mays*-L. *Planta* **138**, 279-294.
- FARFSING, J. W.** (2004) Regulation des Mais-induzierten mig2-Genclusters in *Ustilago maydis*, Philipps-Universität, Marburg.
- FEDLER, M., LUH, K. S., STELTER, K., NIETO-JACOBO, F., und BASSE, C. W.** (2009). The a2 Mating-Type Locus Genes *Iga2* and *rga2* Direct Uniparental Mitochondrial DNA (mtDNA) Inheritance and Constrain mtDNA Recombination During Sexual Development of *Ustilago maydis*. *Genetics* **181**, 847-860.
- FEKETE, E., KARAFFA, L., SANDOR, E., BANYAI, I., SEIBOTH, B., GYEMANT, G., SEPSI, A., SZENTIRMAI, A., und KUBICEK, C. P.** (2004). The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Arch Microbiol* **181**, 35-44.
- FERRARI, S., GALLETTI, R., DENOUX, C., DE LORENZO, G., AUSUBEL, F. M., und DEWDNEY, J.** (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis thaliana* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiol* **144**, 367-379.
- FISCHER, W., und WEIDEMANN, G.** (1964). Die Umsetzung Von 2-Desoxy-D-Galaktose Im Stoffwechsel .I. Eine Einfache Methode Zum Nachweis Des Leloir-Weges. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* **336**, 195-&.
- FLICK, J. S., und JOHNSTON, M.** (1990). Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 4757-4769.
- FLOR-PARRA, I., VRANES, M., KÄMPER, J., und PEREZ-MARTIN, J.** (2006). Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**, 2369-2387.
- FLYNN, P. J., und REECE, R. J.** (1999). Activation of transcription by metabolic intermediates of the pyrimidine biosynthetic pathway. *Mol Cell Biol* **19**, 882-888.
- FOTOPOULOS, V., GILBERT, M. J., PITTMAN, J. K., MARVIER, A. C., BUCHANAN, A. J., SAUER, N., HALL, J. L., und WILLIAMS, L. E.** (2003). The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, At beta fruct1, are induced in *Arabidopsis thaliana* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* **132**, 821-829.

- FROMMER, W. B., DAVIDSON, M. W., und CAMPBELL, R. E.** (2009). Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews* **38**, 2833-2841.
- GANCEDO, J. M.** (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *Fems Microbiology Reviews* **32**, 673-704.
- GARCIA-MUSE, T., STEINBERG, G., und PEREZ-MARTIN, J.** (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.
- GARCIA-PEDRAJAS, M. D., NADAL, M., BOLKER, M., GOLD, S. E., und PERLIN, M. H.** (2008). Sending mixed signals: redundancy vs. uniqueness of signaling components in the plant pathogen, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S22-30.
- GILLISSEN, B., BERGEMANN, J., SANDMANN, C., SCHRÖER, B., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- GITZELMANN, R.** (1995). Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. *European journal of pediatrics* **154**, S45-49.
- GITZELMANN, R., WELLS, H. J., und SEGAL, S.** (1974). Galactose metabolism in a patient with hereditary galactokinase deficiency. *Eur J Clin Invest* **4**, 79-84.
- GOBERDHAN, D. C., MEREDITH, D., BOYD, C. A., und WILSON, C.** (2005). PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development* **132**, 2365-2375.
- GOETZ, M., GODT, D. E., GUIVARC'H, A., KAHMANN, U., CHRQUI, D., und ROITSCH, T.** (2001). Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6522-6527.
- GOHRE, V., und ROBATZEK, S.** (2008). Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 189-215.
- GOLD, S., DUNCAN, G., BARRETT, K., und KRONSTAD, J.** (1994a). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes-Dev* **8**, 2805-2816.
- GOLD, S. E., BAKKEREN, G., DAVIES, J. E., und KRONSTAD, J. W.** (1994b). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**, 225-230.
- GOLD, S. E., BROGDON, S. M., MAYORGA, M. E., und KRONSTAD, J. W.** (1997). The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant-Cell* **9**, 1585-1594.
- GOUJON, M., MCWILLIAM, H., LI, W., VALENTIN, F., SQUIZZATO, S., PAERN, J., und LOPEZ, R.** (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* **38**, W695-699.
- GOVRIN, E. M., und LEVINE, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**, 751-757.
- GRIGGS, D. W., und JOHNSTON, M.** (1991). Regulated expression of the GAL4 activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8597-8601.

- GUILLEMAIN, G., LOIZEAU, M., PINCON-RAYMOND, M., GIRARD, J., und LETURQUE, A.** (2000). The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. *J Cell Sci* **113** (Pt 5), 841-847.
- GUILLEMAIN, G., MUNOZ-ALONSO, M. J., CASSANY, A., LOIZEAU, M., FAUSSAT, A. M., BURNOL, A. F., und LETURQUE, A.** (2002). Karyopherin alpha2: a control step of glucose-sensitive gene expression in hepatic cells. *Biochem J* **364**, 201-209.
- GUTHRIE, C., und FINK, G. R.** (1991). *Guide to yeast genetics and molecular biology* (San Diego, Academic Press).
- HARTMANN, H. A., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.
- HARTMANN, H. A., KRUGER, J., LOTSPEICH, F., und KAHMANN, R.** (1999). Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator prf1. *Plant Cell* **11**, 1293-1306.
- HATAKEYAMA, H., KISHIMOTO, T., NEMOTO, T., KASAI, H., und TAKAHASHI, N.** (2006). Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in mouse pancreatic islets. *J Physiol* **570**, 271-282.
- HE, P., SHAN, L., LIN, N. C., MARTIN, G. B., KEMMERLING, B., NURNBERGER, T., und SHEEN, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis thaliana* innate immunity. *Cell* **125**, 563-575.
- HEIMEL, K.** (2010) Regulationsmechanismen der biotrophen Entwicklung von *Ustilago maydis*, Philipps-Universität, Marburg.
- HEIMEL, K., SCHERER, M., SCHULER, D., und KAMPER, J.** (2010a). The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and b-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *Plant Cell* **22**, 2908-2922.
- HEIMEL, K., SCHERER, M., VRANES, M., WAHL, R., POTHIRATANA, C., SCHULER, D., VINCON, V., FINKERNAGEL, F., FLOR-PARRA, I., und KAMPER, J.** (2010b). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **6**, e1001035.
- HEISTERUBER, D., SCHULTE, P., und MOERSCHBACHER, B. M.** (1994). Soluble Carbohydrates and Invertase Activity in Stem Rust-Infected, Resistant and Susceptible near-Isogenic Wheat Leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **45**, 111-123.
- HELBER, N., WIPPEL, K., SAUER, N., SCHAARSCHMIDT, S., HAUSE, B., und REQUENA, N.** (2011). A Versatile Monosaccharide Transporter That Operates in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus* sp Is Crucial for the Symbiotic Relationship with Plants. *Plant Cell* **23**, 3812-3823.
- HEMETSBERGER, C., HERRBERGER, C., ZECHMANN, B., HILLMER, M., und DOEHLEMANN, G.** (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS pathogens* **8**, e1002684.
- HERBERS, K., MEUWLY, P., FROMMER, W. B., METRAUX, J. P., und SONNEWALD, U.** (1996). Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *Plant Cell* **8**, 793-803.

- HERBERS, K., TAKAHATA, Y., MELZER, M., MOCK, H. P., HAJIREZAEI, M., und SONNEWALD, U.** (2000). Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology* **1**, 51-59.
- HEWALD, S., JOSEPHS, K., und BOLKER, M.** (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3033-3040.
- HIGUCHI, Y., NAKAHAMA, T., SHOJI, J., ARIOKA, M., und KITAMOTO, K.** (2006). Visualization of the endocytic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using an EGFP-fused plasma membrane protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**, 784-791.
- HOFFMAN, C. S., und WINSTON, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- HOFMANN, K. P.** (2012) Die Rolle sekretierter Proteine zu Beginn der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- HÖLL, C.** (2012) Identifizierung von Komponenten der Galactose-vermittelten Wachstumsdefizienz in *Ustilago maydis*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- HOLLIDAY, R.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**, 204-230.
- HOLLIDAY, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R. C. King, ed. (New York, USA, Plenum Press), pp. 575-595.
- HOLLOMAN, W. K., SCHIRAWSKI, J., und HOLLIDAY, R.** (2008). The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **45**, S31-S39.
- HORBACH, R., NAVARRO-QUESADA, A. R., KNOGGE, W., und DEISING, H. B.** (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* **168**, 51-62.
- HORR, W. H.** (1936). Utilization of Galactose by *Aspergillus Niger* and *Penicillium Glaucum*. *Plant Physiol* **11**, 81-99.
- HORST, R. J., DOEHLEMANN, G., WAHL, R., HOFMANN, J., SCHMIEDL, A., KAHMANN, R., KAMPER, J., SONNEWALD, U., und VOLL, L. M.** (2010a). *Ustilago maydis* infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. *Plant physiology* **152**, 293-308.
- HORST, R. J., DOEHLEMANN, G., WAHL, R., HOFMANN, J., SCHMIEDL, A., KAHMANN, R., KAMPER, J., und VOLL, L. M.** (2010b). A model of *Ustilago maydis* leaf tumor metabolism. *Plant signaling & behavior* **5**, 1446-1449.
- HORST, R. J., ENGELSDORF, T., SONNEWALD, U., und VOLL, L. M.** (2008). Infection of maize leaves with *Ustilago maydis* prevents establishment of C(4) photosynthesis. *J Plant Physiol* **165**, 19-28.
- HOU, B. H., TAKANAGA, H., GROSSMANN, G., CHEN, L. Q., QU, X. Q., JONES, A. M., LALONDE, S., SCHWEISSGUT, O., WIECHERT, W., und FROMMER, W. B.** (2011). Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells. *Nature protocols* **6**, 1818-1833.
- HUCKELHOVEN, R.** (2005). Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *Fems Microbiology Letters* **245**, 9-17.

- HUNDAL, H. S., und TAYLOR, P. M.** (2009). Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E603-613.
- HUNTER, M., HEYER, E., AUSTERLITZ, F., ANGELICHEVA, D., NEDKOVA, V., BRIONES, P., GATA, A., DE PABLO, R., LASZLO, A., BOSSHARD, N., et al.** (2002). The P28T mutation in the GALK1 gene accounts for galactokinase deficiency in Roma (Gypsy) patients across Europe. *Pediatr Res* **51**, 602-606.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., und WHITE, T. J., eds.** (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (San Diego, USA, Academic Press).
- ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K., und KIMURA, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology* **153**, 163-168.
- JOBIC, C., BOISSON, A. M., GOUT, E., RASCLE, C., FEVRE, M., COTTON, P., und BLIGNY, R.** (2007). Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta* **226**, 251-265.
- JOERSBO, M., JØRGENSEN, K., und BRUNSTEDT, J.** (2003). A selection system for transgenic plants based on galactose as selective agent and a UDP-glucose:galactose-1-phosphate uridyltransferase gene as selective gene. *Molecular Breeding* **11**, 315-323.
- JOHNSTON, M., und KIM, J. H.** (2005). Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society transactions* **33**, 247-252.
- JONES, J. D., und DANGL, J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- KABIR, M. A., KHANDAY, F. A., MEHTA, D. V., und BHAT, P. J.** (2000). Multiple copies of MRG19 suppress transcription of the GAL1 promoter in a GAL80-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **262**, 1113-1122.
- KAFFARNIK, F., MÜLLER, P., LEIBUNDGUT, M., KAHMANN, R., und FELDBRÜGGE, M.** (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *Embo J* **22**, 5817-5826.
- KAHMANN, R., und KÄMPER, J.** (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* **164**, 31-42.
- KAHMANN, R., STEINBERG, G., BASSE, C., und KÄMPER, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In Fungal Pathology, J. W. Kronstad, ed. (Dodrecht, Kluwer Academic Publishers), pp. 347-371.
- KAISER, C. A., und BOTSTEIN, D.** (1986). Secretion-Defective Mutations in the Signal Sequence for *Saccharomyces-Cerevisiae* Invertase. *Molecular and Cellular Biology* **6**, 2382-2391.
- KÄMPER, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- KÄMPER, J., KAHMANN, R., BÖLKER, M., MA, L. J., BREFORT, T., SAVILLE, B. J., BANUETT, F., KRONSTAD, J. W., GOLD, S. E., MÜLLER, O., et al.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.

- KÄMPER, J., REICHMANN, M., ROMEIS, T., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- KATO, K., und TOH, H.** (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform* **9**, 286-298.
- KEON, J. P., WHITE, G. A., und HARGREAVES, J. A.** (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **19**, 475-481.
- KIM, J. H., BRACHET, V., MORIYA, H., und JOHNSTON, M.** (2006). Integration of transcriptional and posttranslational regulation in a glucose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5**, 167-173.
- KIM, J. H., und JOHNSTON, M.** (2006). Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**, 26144-26149.
- KLEIN, C. J., OLSSON, L., und NIELSEN, J.** (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology* **144 (Pt 1)**, 13-24.
- KNOP, C., STADLER, R., SAUER, N., und LOHAUS, G.** (2004). AmSUT1, a sucrose transporter in collection and transport phloem of the putative symplastic phloem loader *Alonsoa meridionalis*. *Plant Physiology* **134**, 204-214.
- KNUDSON, L.** (1915). Toxicity of Galactose for Certain of the Higher Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **2**, 659-666.
- KNUDSON, L.** (1917). The Toxicity of Galactose and Mannose for Green Plants and the Antagonistic Action of other Sugars Toward These. *American Journal of Botany* **4**, 430-437.
- KRAAKMAN, L., LEMAIRE, K., MA, P., TEUNISSEN, A. W., DONATON, M. C., VAN DIJCK, P., WINDERICKX, J., DE WINDE, J. H., und THEVELEIN, J. M.** (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular microbiology* **32**, 1002-1012.
- KRAMPE, S., und BOLES, E.** (2002). Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *Febs Letters* **513**, 193-196.
- KRIEL, J., HAESSENDONCKX, S., RUBIO-TEXEIRA, M., VAN ZEEBROECK, G., und THEVELEIN, J. M.** (2011). From transporter to transceptor: signaling from transporters provokes re-evaluation of complex trafficking and regulatory controls: endocytic internalization and intracellular trafficking of nutrient transceptors may, at least in part, be governed by their signaling function. *Bioessays* **33**, 870-879.
- KRUCKEBERG, A. L., und BISSON, L. F.** (1990). The HXT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol Cell Biol* **10**, 5903-5913.
- KRUGER, J., LOUBRADOU, G., REGENFELDER, E., HARTMANN, A., und KAHMANN, R.** (1998). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**, 193-198.
- KRUGER, J., LOUBRADOU, G., WANNER, G., REGENFELDER, E., FELDBRUGGE, M., und KAHMANN, R.** (2000). Activation of the cAMP pathway in *Ustilago maydis* reduces fungal

proliferation and teliospore formation in plant tumors. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1034-1040.

LAGER, I., LOOGER, L. L., HILPERT, M., LALONDE, S., und FROMMER, W. B. (2006). Conversion of a putative Agrobacterium sugar-binding protein into a FRET sensor with high selectivity for sucrose. *J Biol Chem* **281**, 30875-30883.

LAGUNAS, R. (1979). Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Molecular and cellular biochemistry* **27**, 139-146.

LAGUNAS, R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2**, 221-228.

LAI, K., und ELSAS, L. J. (2000). Overexpression of human UDP-glucose pyrophosphorylase rescues galactose-1-phosphate uridylyltransferase-deficient yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 392-400.

LAI, K., ELSAS, L. J., und WIERENGA, K. J. (2009). Galactose toxicity in animals. *IUBMB Life* **61**, 1063-1074.

LAI, K., LANGLEY, S. D., KHWAJA, F. W., SCHMITT, E. W., und ELSAS, L. J. (2003). GALT deficiency causes UDP-hexose deficit in human galactosemic cells. *Glycobiology* **13**, 285-294.

LAKSHMANAN, J., MOSLEY, A. L., und OZCAN, S. (2003). Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. *Current genetics* **44**, 19-25.

LALONDE, S., TEGEDER, M., THRONE-HOLST, M., FROMMER, W. B., und PATRICK, J. W. (2003). Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell and Environment* **26**, 37-56.

LANGNER, T. (2010) Funktionelle Charakterisierung der Pst1- und Pst2-Effektoren aus *Ustilago maydis*, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.

LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.

LENGELER, K. B., DAVIDSON, R. C., D'SOUZA, C., HARASHIMA, T., SHEN, W. C., WANG, P., PAN, X., WAUGH, M., und HEITMAN, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**, 746-785.

LEONARDI, M. G., CASARTELLI, M., PARENTI, P., und GIORDANA, B. (1998). Evidence for a low-affinity, high-capacity uniport for amino acids in *Bombyx mori* larval midgut. *Am J Physiol* **274**, R1372-1375.

LINGNER, U., MUNCH, S., DEISING, H. B., und SAUER, N. (2011). Hexose transporters of a hemibiotrophic plant pathogen: functional variations and regulatory differences at different stages of infection. *J Biol Chem* **286**, 20913-20922.

LIU, T. B., WANG, Y., BAKER, G. M., FAHMY, H., JIANG, L., und XUE, C. (2013). The Glucose Sensor-Like Protein Hxs1 Is a High-Affinity Glucose Transporter and Required for Virulence in. *PLoS One* **8**, e64239.

- LIVINGSTON, D. P., und HENSON, C. A.** (1998). Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: Responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* **116**, 403-408.
- LJUNGAHL, P. O., und DAIGNAN-FORNIER, B.** (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 885-929.
- LOHAUS, G., HUSSMANN, M., PENNEWISS, K., SCHNEIDER, H., ZHU, J. J., und SATTELMACHER, B.** (2000). Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1721-1732.
- MA, Y., BAKER, R. F., MAGALLANES-LUNDBACK, M., DELLAPENNA, D., und BRAUN, D. M.** (2008). Tie-dyed1 and sucrose export defective1 act independently to promote carbohydrate export from maize leaves. *Planta* **227**, 527-538.
- MA, Y., SLEWINSKI, T. L., BAKER, R. F., und BRAUN, D. M.** (2009). Tie-dyed1 Encodes a Novel, Phloem-Expressed Transmembrane Protein That Functions in Carbohydrate Partitioning. *Plant physiology* **149**, 181-194.
- MAHLERT, M., VOGLER, C., STELTER, K., HAUSE, G., und BASSE, C. W.** (2009). The $\alpha 2$ mating-type-locus gene *Iga2* of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *Journal of Cell Science* **122**, 2402-2412.
- MAIDAN, M. M., DE ROP, L., SERNEELS, J., EXLER, S., RUPP, S., TOURNU, H., THEVELEIN, J. M., und VAN DIJCK, P.** (2005). The G protein-coupled receptor *Gpr1* and the Galpha protein *Gpa2* act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **16**, 1971-1986.
- MARSHALL-CARLSON, L., NEIGEBORN, L., COONS, D., BISSON, L., und CARLSON, M.** (1991). Dominant and Recessive Suppressors That Restore Glucose-Transport in a Yeast *Snf3* Mutant. *Genetics* **128**, 505-512.
- MARTCHENKO, M., LEVITIN, A., HOGUES, H., NANTEL, A., und WHITEWAY, M.** (2007). Transcriptional rewiring of fungal galactose-metabolism circuitry. *Curr Biol* **17**, 1007-1013.
- MARTINEZ-ESPINOZA, A. D., GARCIA-PEDRAJAS, M. D., und GOLD, S. E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- MASUDA, C. A., PREVIATO, J. O., MIRANDA, M. N., ASSIS, L. J., PENHA, L. L., MENDONCA-PREVIATO, L., und MONTERO-LOMELI, M.** (2008). Overexpression of the aldose reductase *GRE3* suppresses lithium-induced galactose toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **8**, 1245-1253.
- MEHTA, D. V., KABIR, A., und BHAT, P. J.** (1999). Expression of human inositol monophosphatase suppresses galactose toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*: possible implications in galactosemia. *Biochim Biophys Acta* **1454**, 217-226.
- MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., KOCZAN, J., NOMURA, K., und HE, S. Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-980.
- MENEZES, R. A., AMUEL, C., ENGELS, R., GENGENBACHER, U., LABAHN, J., und HOLLENBERG, C. P.** (2003). Sites for interaction between Gal80p and Gal1p in *Kluyveromyces lactis*: structural model of galactokinase based on homology to the GHMP protein family. *J Mol Biol* **333**, 479-492.

- MEYER, J., WALKERJONAH, A., und HOLLENBERG, C. P.** (1991). Galactokinase Encoded by Gal1 Is a Bifunctional Protein Required for Induction of the Gal Genes in *Kluyveromyces-Lactis* and Is Able to Suppress the Gal3 Phenotype in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 5454-5461.
- MONHEIT, J. E., COWAN, D. F., und MOORE, D. G.** (1984). Rapid Detection of Fungi in Tissues Using Calcofluor White and Fluorescence Microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **108**, 616-618.
- MORIYA, H., und JOHNSTON, M.** (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1572-1577.
- MORROW, C. A., und FRASER, J. A.** (2009). Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS Yeast Res* **9**, 161-177.
- MUMMA, J. O., CHHAY, J. S., ROSS, K. L., EATON, J. S., NEWELL-LITWA, K. A., und FRIDOVICH-KEIL, J. L.** (2008). Distinct roles of galactose-1P in galactose-mediated growth arrest of yeast deficient in galactose-1P uridylyltransferase (GALT) and UDP-galactose 4'-epimerase (GALE). *Mol Genet Metab* **93**, 160-171.
- MUNSTERKOTTER, M., und STEINBERG, G.** (2007). The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* **8**, 473.
- NADAL, M., GARCIA-PEDRAJAS, M. D., und GOLD, S. E.** (2010). The *snf1* gene of *Ustilago maydis* acts as a dual regulator of cell wall degrading enzymes. *Phytopathology* **100**, 1364-1372.
- NAJJAR, V. A., und PULLMAN, M. E.** (1954). The occurrence of a group transfer involving enzyme (phosphoglucomutase) and substrate. *Science* **119**, 631-634.
- NAKAMURA, Y., GOJOBORI, T., und IKEMURA, T.** (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research* **28**, 292-292.
- NURNBERGER, T., und LIPKA, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* **6**, 335-345.
- OPEKAROVA, M., und TANNER, W.** (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 11-22.
- OZCAN, S., DOVER, J., und JOHNSTON, M.** (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **17**, 2566-2573.
- OZCAN, S., DOVER, J., ROSENWALD, A. G., WOLFL, S., und JOHNSTON, M.** (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 12428-12432.
- OZCAN, S., und JOHNSTON, M.** (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 554-569.
- PANSTRUGA, R.** (2003). Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 320-326.

- PARNISKE, M.** (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 763-775.
- PLATT, A., und REECE, R. J.** (1998). The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *Embo Journal* **17**, 4086-4091.
- PLATT, T.** (1984). Toxicity of 2-Deoxygalactose to *Saccharomyces-Cerevisiae* Cells Constitutively Synthesizing Galactose-Metabolizing Enzymes. *Molecular and Cellular Biology* **4**, 994-996.
- POLIDORI, E., CECCAROLI, P., SALTARELLI, R., GUESCINI, M., MENOTTA, M., AGOSTINI, D., PALMA, F., und STOCCHI, V.** (2007). Hexose uptake in the plant symbiotic ascomycete *Tuber borchii* Vittadini: biochemical features and expression pattern of the transporter TBHXT1. *Fungal genetics and biology : FG & B* **44**, 187-198.
- PROVENCHER, L. M., MIAO, L., SINHA, N., und LUCAS, W. J.** (2001). Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *Plant Cell* **13**, 1127-1141.
- RAFIQI, M., ELLIS, J. G., LUDOWICI, V. A., HARDHAM, A. R., und DODDS, P. N.** (2012). Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 477-482.
- REGENFELDER, E., SPELLIG, T., HARTMANN, A., LAUENSTEIN, S., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *Embo Journal* **16**, 1934-1942.
- RIEHMAN, K., CREWS, C., und FRIDOVICH-KEIL, J. L.** (2001). Relationship between genotype, activity, and galactose sensitivity in yeast expressing patient alleles of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Biol Chem* **276**, 10634-10640.
- ROITSCH, T.** (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 198-206.
- ROITSCH, T., BALIBREA, M. E., HOFMANN, M., PROELS, R., und SINHA, A. K.** (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* **54**, 513-524.
- ROITSCH, T., BITTNER, M., und GODT, D. E.** (1995). Induction of Apoplastic Invertase of *Chenopodium-Rubrum* by D-Glucose and a Glucose Analog and Tissue-Specific Expression Suggest a Role in Sink-Source Regulation. *Plant Physiology* **108**, 285-294.
- ROITSCH, T., und GONZALEZ, M. C.** (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**, 606-613.
- ROLLAND, F., BAENA-GONZALEZ, E., und SHEEN, J.** (2006a). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 675-709.
- ROLLAND, F., DE WINDE, J. H., LEMAIRE, K., BOLES, E., THEVELEIN, J. M., und WINDERICKX, J.** (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* **38**, 348-358.
- ROLLAND, F., WANKE, V., CAUWENBERG, L., MA, P., BOLES, E., VANONI, M., DE WINDE, J. H., THEVELEIN, J. M., und WINDERICKX, J.** (2001). The role of hexose transport and

phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **1**, 33-45.

ROLLAND, S., HNATOVA, M., LEMAIRE, M., LEAL-SANCHEZ, J., und WESOLOWSKI-LOUVEL, M. (2006b). Connection between the Rag4 glucose sensor and the KIRgt1 repressor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **174**, 617-626.

ROMEIS, T., BRACHMANN, A., KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (2000). Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.

ROONEY, H. C. E., VAN 'T KLOOSTER, J. W., VAN DER HOORN, R. A. L., JOOSTEN, M. H. A. J., JONES, J. D. G., und DE WIT, P. J. G. M. (2005). Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**, 1783-1786.

ROSENBAUM, D. M., RASMUSSEN, S. G., und KOBILKA, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356-363.

ROSS, K. L., DAVIS, C. N., und FRIDOVICH-KEIL, J. L. (2004). Differential roles of the Leloir pathway enzymes and metabolites in defining galactose sensitivity in yeast. *Mol Genet Metab* **83**, 103-116.

RUSSIN, W. A., EVERT, R. F., VANDERVEER, P. J., SHARKEY, T. D., und BRIGGS, S. P. (1996). Modification of a Specific Class of Plasmodesmata and Loss of Sucrose Export Ability in the sucrose export defective1 Maize Mutant. *The Plant cell* **8**, 645-658.

SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., und MANIATIS, T. (1989a). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., und MANIATIS, T. (1989b). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory).

SAMBROOK, J., und RUSSELL, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

SAUER, N., FRIEDLANDER, K., und GRAML-WICKE, U. (1990). Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* **9**, 3045-3050.

SAUER, N., und STOLZ, J. (1994). SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* **6**, 67-77.

SAUER, N., und TANNER, W. (1989). The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Lett* **259**, 43-46.

SCHELL, M. A., und WILSON, D. B. (1977). Purification and properties of galactokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **252**, 1162-1166.

SCHERER, M., HEIMEL, K., STARKE, V., und KÄMPER, J. (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-2401.

SCHIRAWSKI, J., BÖHNERT, H. U., STEINBERG, G., SNETSELAAR, K., ADAMIKOWA, L., und KAHMANN, R. (2005a). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.

- SCHIRAWSKI, J., HEINZE, B., WAGENKNECHT, M., und KAHMANN, R.** (2005b). Mating type loci of *Sporisorium reilianum*: novel pattern with three a and multiple b specificities. *Eukaryot Cell* **4**, 1317-1327.
- SCHMIDT, M. C., MCCARTNEY, R. R., ZHANG, X., TILLMAN, T. S., SOLIMEO, H., WOLFL, S., ALMONTE, C., und WATKINS, S. C.** (1999). Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**, 4561-4571.
- SCHOLES, J. D., LEE, P. J., HORTON, P., und LEWIS, D. H.** (1994). Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* **126**, 213-222.
- SCHULZ, B., BANUETT, F., DAHL, M., SCHLESINGER, R., SCHÄFER, W., MARTIN, T., HERSKOWITZ, I., und KAHMANN, R.** (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- SCHUSSLER, A., MARTIN, H., COHEN, D., FITZ, M., und WIPF, D.** (2006). Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* **444**, 933-936.
- SEIBOTH, B., GAMAUF, C., PAIL, M., HARTL, L., und KUBICEK, C. P.** (2007). The D-xylose reductase of *Hypocrea jecorina* is the major aldose reductase in pentose and D-galactose catabolism and necessary for beta-galactosidase and cellulase induction by lactose. *Mol Microbiol* **66**, 890-900.
- SEIBOTH, B., und METZ, B.** (2011). Fungal arabinan and L-arabinose metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 1665-1673.
- SELICK, C. A., JOWITT, T. A., und REECE, R. J.** (2009). The effect of ligand binding on the galactokinase activity of yeast Gal1p and its ability to activate transcription. *The Journal of biological chemistry* **284**, 229-236.
- SELICK, C. A., und REECE, R. J.** (2005). Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 405-412.
- SELICK, C. A., und REECE, R. J.** (2006). Contribution of amino acid side chains to sugar binding specificity in a galactokinase, Gal1p, and a transcriptional inducer, Gal3p. *J Biol Chem* **281**, 17150-17155.
- SEXTON, J. A., BROWN, V., und JOHNSTON, M.** (2007). Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. *Yeast* **24**, 847-860.
- SHERSON, S. M., HEMMANN, G., WALLACE, G., FORBES, S., GERMAIN, V., STADLER, R., BECHTOLD, N., SAUER, N., und SMITH, S. M.** (2000). Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of *Arabidopsis thaliana* seeds and seedlings to sugars. *Plant Journal* **24**, 849-857.
- SIDBURY, J. B., JR.** (1960). *Molecular Genetics of Human Diseases*, Charles C Thomas Publishers).
- SKIBBE, D. S., DOEHLEMANN, G., FERNANDES, J., und WALBOT, V.** (2010). Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science* **328**, 89-92.

- SLEPAK, T., TANG, M., ADDO, F., und LAI, K.** (2005). Intracellular galactose-1-phosphate accumulation leads to environmental stress response in yeast model. *Mol Genet Metab* **86**, 360-371.
- SLEWINSKI, T. L., BAKER, R. F., STUBERT, A., und BRAUN, D. M.** (2012). Tie-dyed2 Encodes a Callose Synthase That Functions in Vein Development and Affects Symplastic Trafficking within the Phloem of Maize Leaves. *Plant Physiology* **160**, 1540-1550.
- SLEWINSKI, T. L., GARG, A., JOHAL, G. S., und BRAUN, D. M.** (2010). Maize SUT1 functions in phloem loading. *Plant Signal Behav* **5**, 687-690.
- SLEWINSKI, T. L., MEELEY, R., und BRAUN, D. M.** (2009). Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *Journal of experimental botany* **60**, 881-892.
- SNETSELAAR, K. M., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 299-312.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W.** (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W.** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**, 347-355.
- SNOWDON, C., und VAN DER MERWE, G.** (2012). Regulation of Hxt3 and Hxt7 Turnover Converges on the Vid30 Complex and Requires Inactivation of the Ras/cAMP/PKA Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One* **7**.
- SODERLUND, C., DESCOUR, A., KUDRNA, D., BOMHOFF, M., BOYD, L., CURRIE, J., ANGELOVA, A., COLLURA, K., WISSOTSKI, M., ASHLEY, E., et al.** (2009). Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs. *PLoS Genet* **5**, e1000740.
- SOLS, A., DE LA FUENTE, G., VILLARPALASI, C., und ASENSIO, C.** (1958). Substrate specificity and some other properties of baker's yeast hexokinase. *Biochim Biophys Acta* **30**, 92-101.
- SONNEWALD, U.** (2011). Sweets - the missing sugar efflux carriers. *Front Plant Sci* **2**, 7.
- SONNHAMMER, E. L., EDDY, S. R., und DURBIN, R.** (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**, 405-420.
- SOUTHERN, E. M.** (1975). Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel-Electrophoresis. *Journal of molecular biology* **98**, 503-&.
- SPELLIG, T., BÖLKER, M., LOTTSPEICH, F., FRANK, R. W., und KAHMANN, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- SPIELEWOY, N., FLICK, K., KALASHNIKOVA, T. I., WALKER, J. R., und WITTENBERG, C.** (2004). Regulation and recognition of SCFGrr1 targets in the glucose and amino acid signaling pathways. *Molecular and cellular biology* **24**, 8994-9005.
- SPYROPOULOS, I. C., LIAKOPOULOS, T. D., BAGOS, P. G., und HAMODRAKAS, S. J.** (2004). TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. *Bioinformatics* **20**, 3258-3260.

- STADLER, R., BRANDNER, J., SCHULZ, A., GAHRTZ, M., und SAUER, N.** (1995). Phloem Loading by the PmSUC2 Sucrose Carrier from *Plantago major* Occurs into Companion Cells. *The Plant cell* **7**, 1545-1554.
- STADLER, R., und SAUER, N.** (1996). The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta* **109**, 299-306.
- STAPLES, R. C.** (1985). The Development of Infection Structures by the Rusts and Other Fungi. *Microbiological Sciences* **2**, 193-198.
- STASYK, O. G., MAIDAN, M. M., STASYK, O. V., VAN DIJCK, P., THEVELEIN, J. M., und SIBIRNY, A. A.** (2008). Identification of hexose transporter-like sensor HXS1 and functional hexose transporter HXT1 in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Eukaryotic Cell* **7**, 735-746.
- STASYK, O. V., STASYK, O. G., KOMDUUR, J., VEENHUIS, M., CREGG, J. M., und SIBIRNY, A. A.** (2004). A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *J Biol Chem* **279**, 8116-8125.
- STEINBERG, G., und PEREZ-MARTIN, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biology* **18**, 61-67.
- STOLZ, J., STADLER, R., OPEKAROVA, M., und SAUER, N.** (1994). Functional Reconstitution of the Solubilized *A. thaliana* Stp1 Monosaccharide-H⁺ Symporter in Lipid Vesicles and Purification of the Histidine Tagged Protein from Transgenic *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Plant Journal* **6**, 225-233.
- STURM, A., und CHRISPEELS, M. J.** (1990). Cdna Cloning of Carrot Extracellular Beta-Fructosidase and Its Expression in Response to Wounding and Bacterial-Infection. *Plant Cell* **2**, 1107-1119.
- SUZUKI-FUJIMOTO, T., FUKUMA, M., YANO, K. I., SAKURAI, H., VONIKA, A., JOHNSTON, S. A., und FUKASAWA, T.** (1996). Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Molecular and cellular biology* **16**, 2504-2508.
- TAKANAGA, H., und FROMMER, W. B.** (2010). Facilitative plasma membrane transporters function during ER transit. *Faseb Journal* **24**, 2849-2858.
- TANG, G. Q., LUSCHER, M., und STURM, A.** (1999). Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *The Plant cell* **11**, 177-189.
- TANIOUS, F. A., VEAL, J. M., BUCZAK, H., RATMEYER, L. S., und WILSON, W. D.** (1992). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* **31**, 3103-3112.
- THEVELEIN, J. M., und 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.
- THEVELEIN, J. M., und VOORDECKERS, K.** (2009). Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Mol Biol Evol* **26**, 2407-2414.
- THIRION, J. P., BANVILLE, D., und NOEL, H.** (1976). Galactokinase Mutants of Chinese-Hamster Somatic-Cells Resistant to 2-Deoxygalactose. *Genetics* **83**, 137-147.

- THODEN, J. B., SELICK, C. A., TIMSON, D. J., REECE, R. J., und HOLDEN, H. M.** (2005a). Molecular structure of *Saccharomyces cerevisiae* Gal1p, a bifunctional galactokinase and transcriptional inducer. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 36905-36911.
- THODEN, J. B., TIMSON, D. J., REECE, R. J., und HOLDEN, H. M.** (2005b). Molecular structure of human galactokinase: implications for type II galactosemia. *J Biol Chem* **280**, 9662-9670.
- TIMSON, D. J., und REECE, R. J.** (2003). Functional analysis of disease-causing mutations in human galactokinase. *Eur J Biochem* **270**, 1767-1774.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., und GORDON, J.** (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- TRUERNIT, E., STADLER, R., BAIER, K., und SAUER, N.** (1999). A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **17**, 191-201.
- TRUMBLY, R. J.** (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **6**, 15-21.
- TSUKUDA, T., CARLETON, S., FOTHERINGHAM, S., und HOLLOMAN, W. K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- TURGEON, R.** (1989). The Sink-Source Transition in Leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 119-138.
- TURGEON, R.** (2006). Phloem loading: How leaves gain their independence. *Bioscience* **56**, 15-24.
- UMA, B., RANI, T. S., und PODILE, A. R.** (2011). Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology* **168**, 2141-2152.
- URBAN, M., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- VAN BAARLEN, P., STAATS, M., und VAN KAN, J. A. L.** (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology* **5**, 559-574.
- VAN KAN, J. A. L.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**, 247-253.
- VANBEL, A. J. E.** (1993). Strategies of Phloem Loading. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 253-281.
- VOEGELE, R. T., STRUCK, C., HAHN, M., und MENDGEN, K.** (2001). The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8133-8138.
- VOEGELE, R. T., WIRSEL, S., MOLL, U., LECHNER, M., und MENDGEN, K.** (2006). Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **19**, 625-634.

- VOLLENBROICH, V., MEYER, J., ENGELS, R., CARDINALI, G., MENEZES, R. A., und HOLLENBERG, C. P.** (1999). Galactose induction in yeast involves association of Gal80p with Gal1p or Gal3p. *Mol Gen Genet* **261**, 495-507.
- VRANES, M.** (2006) Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene, Philipps-Universität, Marburg.
- WAHL, R.** (2009) Biotrophic Development of *Ustilago maydis* and the Response of Its Host Plant Maize, Philipps-Universität, Marburg.
- WAHL, R., WIPPEL, K., GOOS, S., KAMPER, J., und SAUER, N.** (2010a). A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS biology* **8**, e1000303.
- WAHL, R., ZAHIRI, A., und KAMPER, J.** (2010b). The *Ustilago maydis* b mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in planta. *Molecular microbiology* **75**, 208-220.
- WASILENKO, J., und FRIDOVICH-KEIL, J. L.** (2006). Relationship between UDP-galactose 4'-epimerase activity and galactose sensitivity in yeast. *J Biol Chem* **281**, 8443-8449.
- WASILENKO, J., LUCAS, M. E., THODEN, J. B., HOLDEN, H. M., und FRIDOVICH-KEIL, J. L.** (2005). Functional characterization of the K257R and G319E-hGALE alleles found in patients with ostensibly peripheral epimerase deficiency galactosemia. *Mol Genet Metab* **84**, 32-38.
- WEINZIERL, G., LEVELEKI, L., HASSEL, A., KOST, G., WANNER, G., und BOLKER, M.** (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **45**, 219-231.
- WELLS, H. J., und SEGAL, S.** (1969). Galactose toxicity in the chick: Tissue accumulation of galactose and galactitol. *FEBS Lett* **5**, 121-123.
- WESCHKE, W., PANITZ, R., GUBATZ, S., WANG, Q., RADCHUK, R., WEBER, H., und WOBUS, U.** (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J* **33**, 395-411.
- WIDHALM, K., MIRANDA DA CRUZ, B. D., und KOCH, M.** (1997). Diet does not ensure normal development in galactosemia. *Journal of the American College of Nutrition* **16**, 204-208.
- WIECZORKE, R., KRAMPE, S., WEIERSTALL, T., FREIDEL, K., HOLLENBERG, C. P., und BOLES, E.** (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **464**, 123-128.
- WIPPEL, K.** (2011) Physiologische und biochemische Charakterisierung zweier Zuckertransporter des biotrophen Maispathogens *Ustilago maydis*, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg.
- WOBUS, U., und WEBER, H.** (1999). Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol Chem* **380**, 937-944.
- WOHLERS, T. M., CHRISTACOS, N. C., HARREMAN, M. T., und FRIDOVICH-KEIL, J. L.** (1999). Identification and characterization of a mutation, in the human UDP-galactose-4-epimerase gene, associated with generalized epimerase-deficiency galactosemia. *Am J Hum Genet* **64**, 462-470.

- WRIGHT, C. S.** (1984). Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *Journal of molecular biology* **178**, 91-104.
- YANG, B., SUGIO, A., und WHITE, F. F.** (2006). Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10503-10508.
- YOSHIDA, A., WEI, D. D., NOMURA, W., IZAWA, S., und INOUE, Y.** (2012). Reduction of Glucose Uptake through Inhibition of Hexose Transporters and Enhancement of Their Endocytosis by Methylglyoxal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 701-711.
- YUAN, M., CHU, Z. H., LI, X. H., XU, C. G., und WANG, S. P.** (2009). Pathogen-Induced Expressional Loss of Function is the Key Factor in Race-Specific Bacterial Resistance Conferred by a Recessive R Gene xa13 in Rice. *Plant and Cell Physiology* **50**, 947-955.
- ZAMAN, S., LIPPMAN, S. I., ZHAO, X., und BROACH, J. R.** (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual review of genetics* **42**, 27-81.
- ZARNACK, K., EICHHORN, H., KAHMANN, R., und FELDBRUGGE, M.** (2008). Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* **69**, 1041-1053.
- ZARNACK, K., MAURER, S., KAFFARNIK, F., LADENDORF, O., BRACHMANN, A., KÄMPER, J., und FELDBRÜGGE, M.** (2006). Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **43**, 727-738.
- ZENKE, F. T., ENGLER, R., VOLLENBROICH, V., MEYER, J., HOLLENBERG, C. P., und BREUNIG, K. D.** (1996). Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science* **272**, 1662-1665.
- ZHAO, S., und FERNALD, R. D.** (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* **12**, 1047-1064.
- ZUKER, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.

6 Anhang

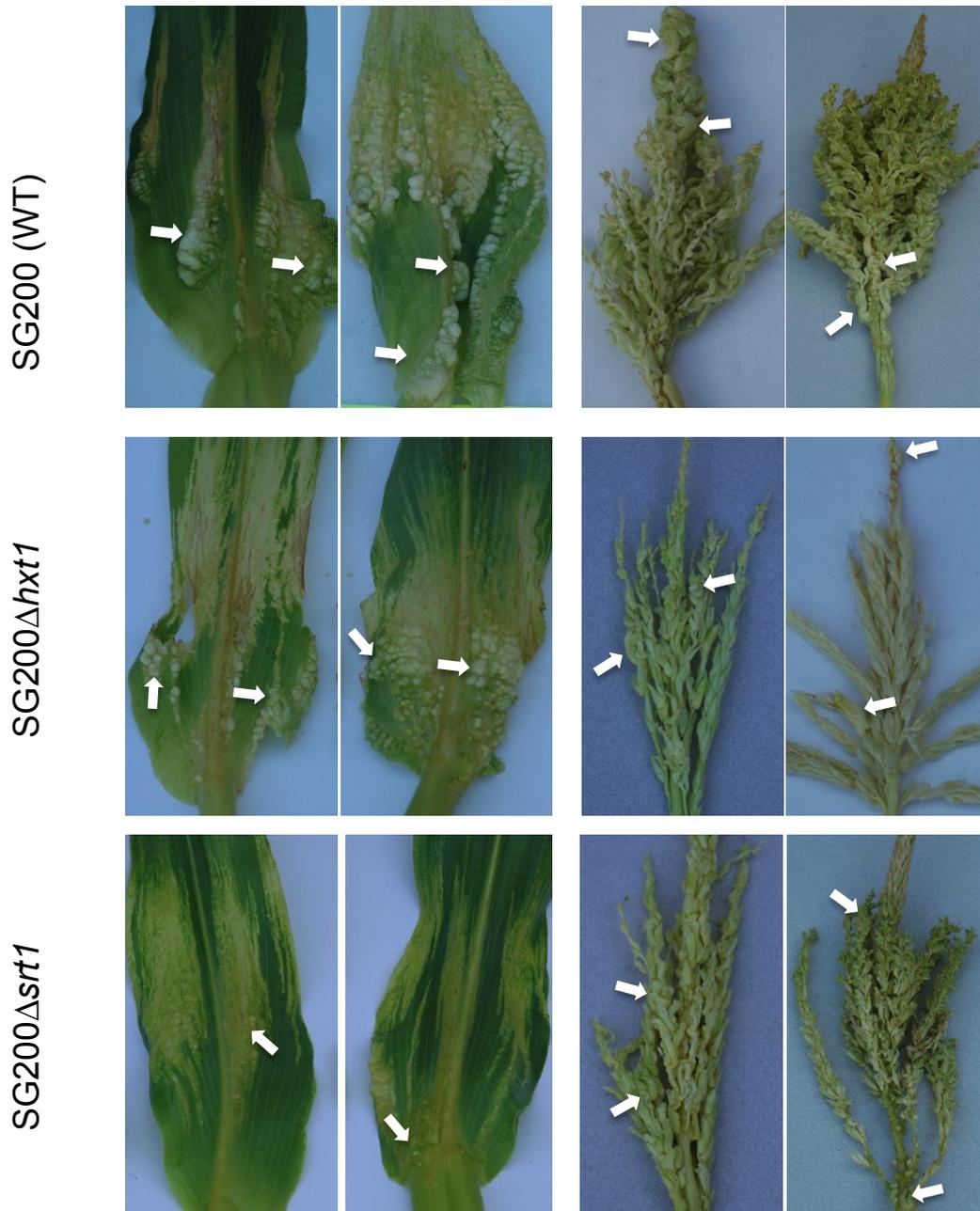


Abb. 6.1 Infektionssymptome von $\Delta hxt1$ - und $\Delta srt1$ -Stämmen an Blättern und Fahnen adulter Maispflanzen. Die Pflanzen wurden 5-6 Wochennach Aussaat mit den angegebenen Stämmen infiziert. Die Auswertung der Symptome erfolgte 14 Tage nach Injektion. Die Infektion mit $hxt1$ - und $srt1$ - Deletionsstämmen führte zur Ausbildung milderer Krankheitssymptome als Infektionen mit SG200. Weiße Pfeile markieren die jeweils größten Tumore auf den Blättern bzw. Fahnen, die zur Klassifizierung der Tumorgöße herangezogen wurden.

Tab. 6.1 Durch Microarray-Analysen detektierte Expression von *U. maydis* Zuckertransporter-Genen je 3 Tage nach Injektion in Maiskeimlingen bzw. Fahnen und Blätter adulter Pflanzen. Die Daten wurden übernommen aus (Skibbe *et al.*, 2010)

Probeset	Gen	Annotation	Keimling 3 dpi			
			Expr_M (1)	Expr_I (2)	FoldChg (3)	Pvalue (4)
7023	um05958	probable maltose permease (MalP)	0,00	50,22		0,0000
17586	um04478	probable ITR2 - myo-inositol transporter	57,47	181,18	3,13	0,0000
31295	um01656	probable sugar transporter	127,75	1025,50	8,54	0,0000
37582	um01476	related to HXT1 - Low-affinity hexose facilitator	52,68	298,57	5,43	0,0000
32894	um02374	related to monosaccharide transporter	215,66	1174,71	5,93	0,0000
11179	um11171	related to sugar transport protein	0,00	67,29		0,0000
40539	um05023	probable monosaccharide transporter	130,10	255,10	1,96	0,0038
2958	um01156	related to myo-inositol transporter	84,74	246,86	3,05	0,0000
26882	um03034	conserved hypothetical protein	165,20	222,58	1,47	0,0253
18780	um05411	probable quinate permease	0,00	71,58		0,0000
36307	um10072	probable monosaccharide transporter	68,60	477,41		0,0000
17508	um10608	related to Quinate permease	108,16	71,46	0,70	0,0039
44767	um06076	related to quinate transport protein	73,07	392,15		0,0000
15499	um00061	related to quinate transport protein	0,00	80,92		0,0000
33445	um01653	related to VPS73 - protein involved in vacuolar protein sorting	92,99	903,70	9,26	0,0000
8161	um11514	probable High-affinity glucose transporter	0,00	56,89		0,0000
31992	um05602	probable sugar transporter	115,49	368,52	3,43	0,0000
24189	um05972	probable Maltose permease	0,00	63,34		0,0000
38479	um02037	probable HXT5 - Hexose transporter	55,71	131,36	2,50	0,0003
35861	um05033	related to glucose/galactose transporter	0,00	0,00		0,0000

(1) Gibt die gemittelten Expressionswerte im nicht-infizierten Gewebe an

(2) Gibt die gemittelten Expressionswerte im infizierten Gewebe an

(3) Gibt die Expressionsänderung im infizierten Gewebe als Vielfaches des nicht-infizierten Gewebes an, wenn der Unterschied >100 ist.

(4) Gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die angegebenen Expressionsänderungen auf Zufall beruhen.

Probeset	Gen	Annotation	Blatt 3 dpi			
			Expr_M (1)	Expr_I (2)	FoldChg (3)	Pvalue (4)
7023	um05958	probable maltose permease (MalP)	0,00	56,08		0,0000
17586	um04478	probable ITR2 - myo-inositol transporter	0,00	128,59	2,23	0,0002
31295	um01656	probable sugar transporter	0,00	357,29	4,98	0,0000
37582	um01476	related to HXT1 - Low-affinity hexose facilitator	0,00	367,57	4,60	0,0000
32894	um02374	related to monosaccharide transporter	104,00	332,93	3,24	0,0000
11179	um11171	related to sugar transport protein	0,00	49,48		0,0000
40539	um05023	probable monosaccharide transporter	89,28	128,04	1,35	0,1473
2958	um01156	related to myo-inositol transporter	0,00	109,40	2,05	0,0009
26882	um03034	conserved hypothetical protein	0,00	114,13	1,38	0,0547
18780	um05411	probable quinate permease	0,00	52,02		0,0000
36307	um10072	probable monosaccharide transporter	0,00	121,71		0,0000
17508	um10608	related to Quinate permease	103,54	79,81	0,75	0,0153
44767	um06076	related to quinate transport protein	0,00	166,30		0,0000
15499	um00061	related to quinate transport protein	0,00	62,31		0,0000
33445	um01653	related to VPS73 - protein involved in vacuolar protein sorting	0,00	253,18	3,82	0,0000
8161	um11514	probable High-affinity glucose transporter	0,00	0,00		0,0000
31992	um05602	probable sugar transporter	0,00	127,71	1,83	0,0003
24189	um05972	probable Maltose permease	0,00	59,79		0,0000
38479	um02037	probable HXT5 - Hexose transporter	0,00	52,19	0,97	0,9038
35861	um05033	related to glucose/galactose transporter	0,00	0,00		0,0000

(1) Gibt die gemittelten Expressionswerte im nicht-infizierten Gewebe an

(2) Gibt die gemittelten Expressionswerte im infizierten Gewebe an

(3) Gibt die Expressionsänderung im infizierten Gewebe als Vielfaches des nicht-infizierten Gewebes an, wenn der Unterschied >100 ist.

(4) Gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die angegebenen Expressionsänderungen auf Zufall beruhen.

Probeset	Gen	Annotation	Fahne 3 dpi			
			Expr_M (1)	Expr_I (2)	FoldChg (3)	Pvalue (4)
7023	um05958	probable maltose permease (MalP)	0,00	100,02		0,0000
17586	um04478	probable ITR2 - myo-inositol transporter	51,93	209,45	2,85	0,0000
31295	um01656	probable sugar transporter	77,75	642,03	7,45	0,0000
37582	um01476	related to HXT1 - Low-affinity hexose facilitator	64,63	651,48	8,65	0,0000
32894	um02374	related to monosaccharide transporter	114,24	569,98	4,72	0,0000
11179	um11171	related to sugar transport protein	0,00	53,57		0,0000
40539	um05023	probable monosaccharide transporter	84,89	177,66	1,95	0,0040
2958	um01156	related to myo-inositol transporter	56,27	152,87	2,40	0,0000
26882	um03034	conserved hypothetical protein	71,58	135,22	1,91	0,0009
18780	um05411	probable quinate permease	0,00	56,51		0,0000
36307	um10072	probable monosaccharide transporter	0,00	149,58		0,0000
17508	um10608	related to Quinate permease	100,68	79,90	0,83	0,1001
44767	um06076	related to quinate transport protein	61,32	188,88		0,0000
15499	um00061	related to quinate transport protein	0,00	73,27		0,0000
33445	um01653	related to VPS73 - protein involved in vacuolar protein sorting	58,10	428,75	6,78	0,0000
8161	um11514	probable High-affinity glucose transporter	0,00	44,75		0,0000
31992	um05602	probable sugar transporter	52,86	138,54	1,82	0,0003
24189	um05972	probable Maltose permease	0,00	68,18		0,0000
38479	um02037	probable HXT5 - Hexose transporter	46,13	69,75	1,43	0,0793
35861	um05033	related to glucose/galactose transporter	0,00	0,00		0,0000

(1) Gibt die gemittelten Expressionswerte im nicht-infizierten Gewebe an

(2) Gibt die gemittelten Expressionswerte im infizierten Gewebe an

(3) Gibt die Expressionsänderung im infizierten Gewebe als Vielfaches des nicht-infizierten Gewebes an, wenn der Unterschied >100 ist.

(4) Gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die angegebenen Expressionsänderungen auf Zufall beruhen.

Tab. 6.2 Bewertung der Pathogenität von *U. maydis* Zuckertransporter-Deletionsstämmen nach Infektion adulter Pflanzen. Die Bewertung der Symptome erfolgte relativ zu Symptomen, die der im gleichen Zeitraum infizierte WT-Stamm SG200 verursachte. Eine Erklärung der Symptom-Kategorien findet sich in Tab. 2.1.

infizierter Stamm	ausgewertete Pflanzen	ausgewertete Blätter pro Pflanze (Ø)	Tumorgröße Blatt (Ø)	Symptomfrequenz Blatt (Ø)	ausgewertete Fahnen	Tumorgröße Fahne (Ø)	Symptomfrequenz Fahne (Ø)	Zeitpunkt Auswertung
SG200 Δ <i>hxt1</i>	7	3,7	0,8	1,3	0	-	-	12 dpi
	11	5,4	2,4	2,4	7	2,6	2,4	12 dpi
	7	6,0	1,6	2,4	4	1,5	1,0	13 dpi
	8	4,5	1,9	2,25	2	1,5	2,0	13 dpi
	12	3,3	1,7	1,7	2	1,0	2,5	13 dpi
SG200 Δ <i>srt1</i>	10	5,3	1,2	1,3	4	1,0	1,0	12 dpi
	10	6,3	0,5	2,3	7	1,3	1,3	12 dpi
	8	6,4	1,1	2,5	3	1,0	2,3	13 dpi
	11	4,0	1,7	2,5	5	1,6	2,6	13 dpi
SG200 Δ <i>hxt1</i> Δ <i>srt1</i>	10	4,9	0,6	0,8	6	1,0	1,0	12 dpi
SG200 Δ <i>um04478</i>	6	4,8	2,7	2,8	2	2,5	2,0	12 dpi
SG200 Δ <i>um01156</i>	8	4,5	3,0	3,0	1	2,0	2,0	12 dpi
SG200 Δ <i>um01653</i>	8	4,3	3,0	3,0	1	3,0	3,0	12 dpi
SG200 Δ <i>um01656</i>	10	4,8	2,9	2,8	4	2,8	3,0	13 dpi
SG200 Δ <i>um02037</i>	10	4,8	2,8	2,5	6	2,2	2,2	13 dpi
SG200 Δ <i>um05602</i>	8	5,3	3,0	3,0	7	4,4	4,8	13 dpi

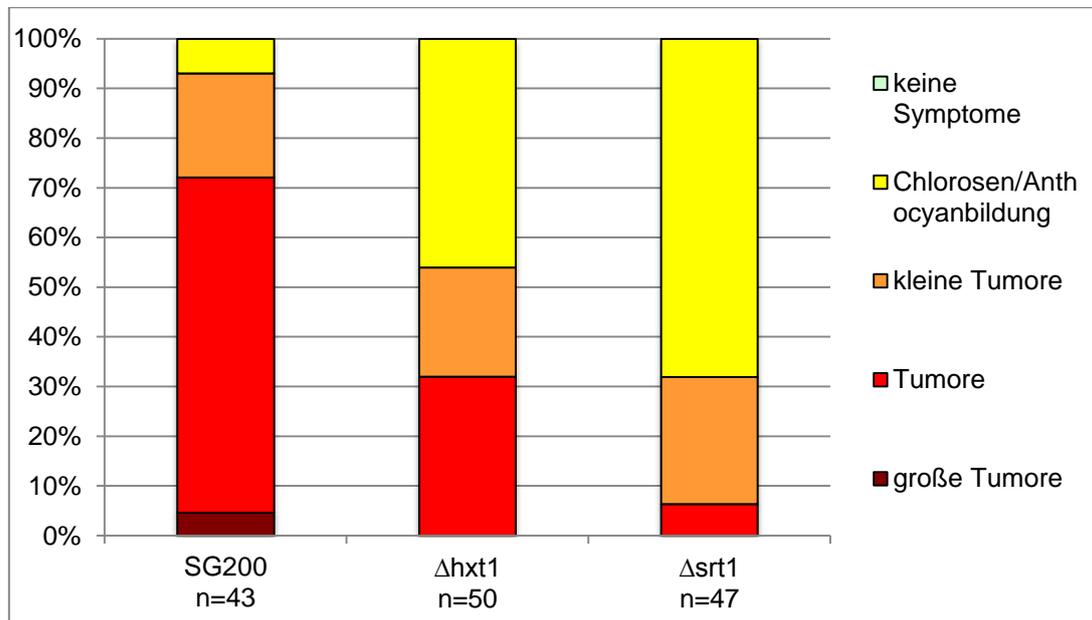


Abb. 6.2 Bewertung der Pathogenität von *hxt1*- bzw. *srt1*-Deletionsstämmen nach Infektion von Maiskeimlingen der Varietät W23. Die Bewertung der Symptome wurde 7 Tage nach Injektion durchgeführt. Beide Stämme zeigten eine reduzierte Virulenz, die der Infektion von Keimlingen der Varietät Early Golden Bantam entspricht (Wahl, 2009).

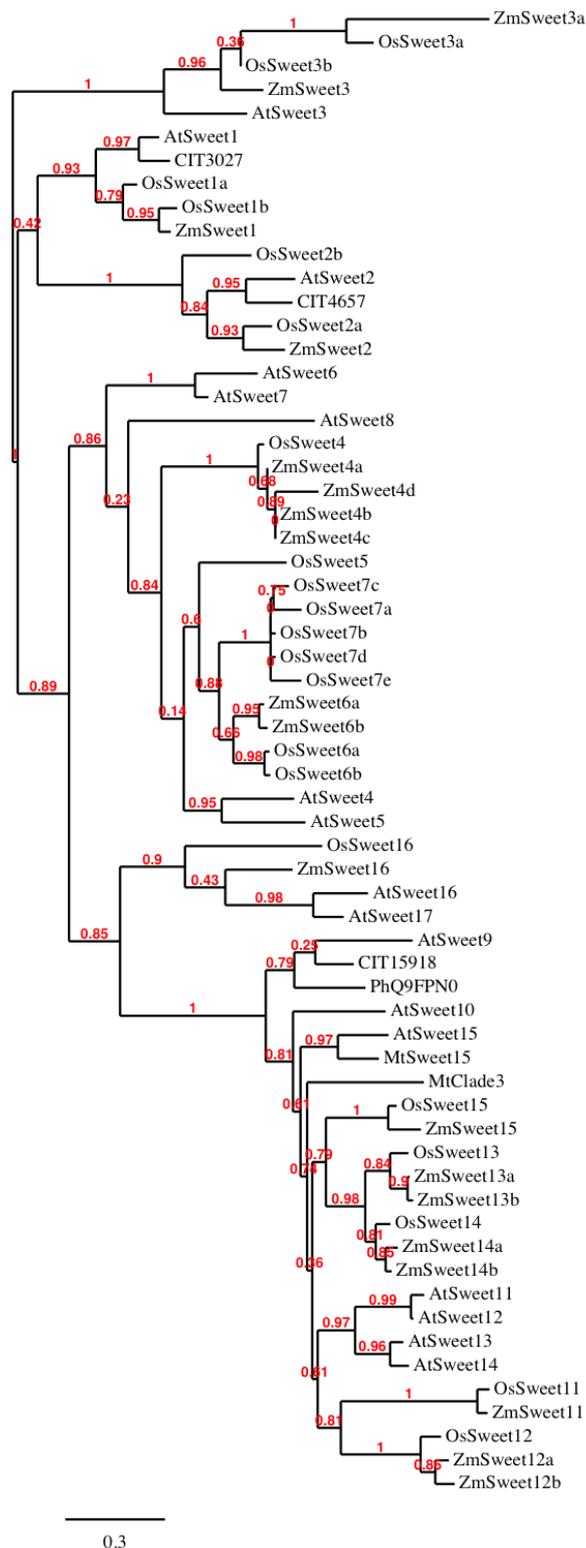


Abb. 6.3 Phylogenetischer Stammbaum von SWEET-Proteinen. Die SWEET-Proteine in Mais wurden entsprechend den nächsten verwandten Orthologen in Reis und *A. thaliana* benannt (D. Sosso, pers. Mitteilung)

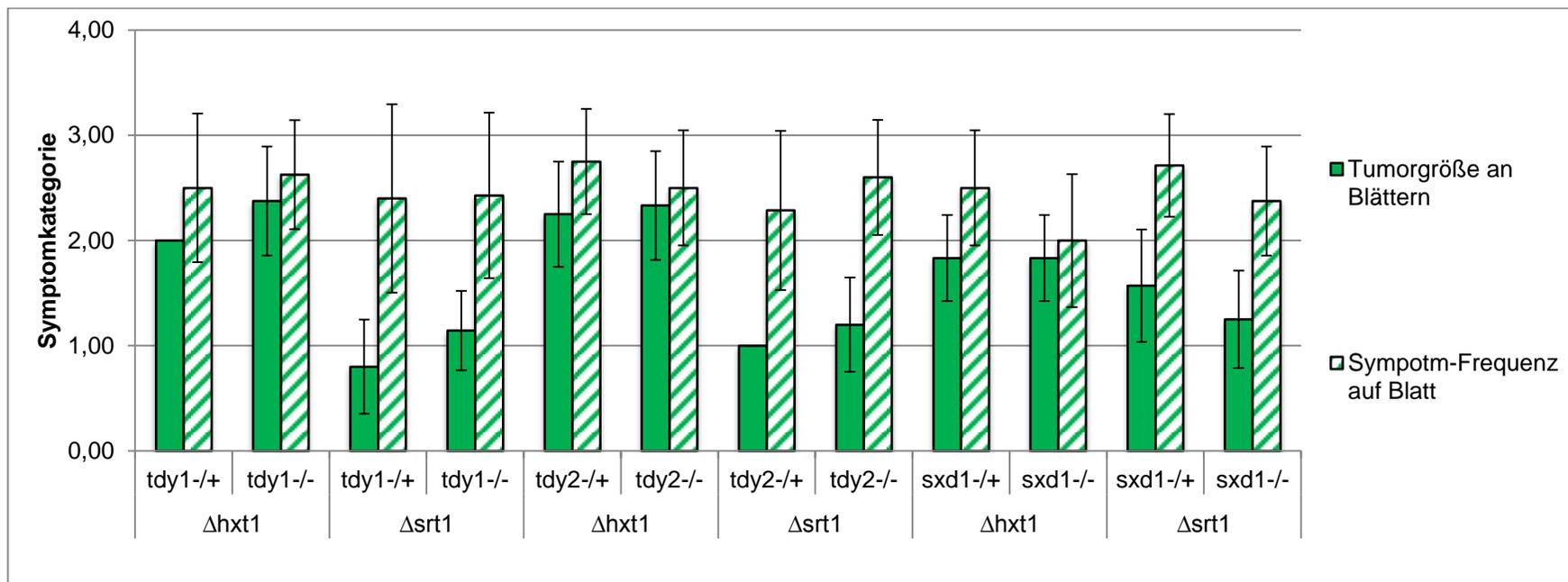


Abb. 6.4 Pathogenität von *hxt1*- und *srt1*-Deletionsstämmen bei Infektion von Maislinien mit Defekten beim Zuckerexport aus den Blättern. Die Pflanzen wurden ca. 6 Wochen nach Aussaat infiziert, die Bewertung der Symptome erfolgte etwa 14 Tage später. Die Bewertung der Symptome erfolgte relativ zu Symptomen, die der im gleichen Zeitraum infizierte WT-Stamm SG200 verursachte und die standardmäßig mit Symptomkategorie 3 bewertet wurde. Eine Erklärung der Symptom-Kategorien findet sich in Tab. 2.1. Die Daten, die dem Diagramm zugrunde liegen, finden sich in Tab. 6.3

Tab. 6.3 Pathogenität von *hxt1*- und *srt1*-Deletionsstämmen bei Infektion von Maislinien mit Defekten beim Zuckerexport aus den Blättern. Die Pflanzen wurden ca. 6 Wochen nach Aussaat infiziert, die Bewertung der Symptome erfolgte etwa 14 Tage später. Die Bewertung der Symptome erfolgte relativ zu Symptomen, die der im gleichen Zeitraum infizierte WT-Stamm SG200 verursachte und die standardmäßig mit Symptomkategorie 3 bewertet wurde. Eine Erklärung der Symptom-Kategorien findet sich in Tab. 2.1.

Infizierter Stamm (<i>U. maydis</i>)	Infizierte Maislinie	Ausgewertete Pflanzen	ausgewertete Blätter pro Pflanze (Ø)	Tumorgroße Blatt (Ø)	Symptom-Frequenz Blatt (Ø)	Zeitpunkt Auswertung
Δ hxt1	tdy1-/+	2	5,00	2,00	2,50	13 dpi
	tdy1-/-	8	4,90	2,38	2,63	13 dpi
Δ srt1	tdy1-/+	5	6,40	0,80	2,40	13 dpi
	tdy1-/-	7	5,60	1,14	2,43	13 dpi
Δ hxt1	tdy2-/+	4	6,80	2,25	2,75	13 dpi
	tdy2-/-	6	5,00	2,33	2,50	13 dpi
Δ srt1	tdy2-/+	7	6,00	1,00	2,29	13 dpi
	tdy2-/-	5	4,60	1,20	2,60	13 dpi
Δ hxt1	sxd1-/+	6	5,80	1,83	2,50	14 dpi
	sxd1-/-	6	4,00	1,83	2,00	14 dpi
Δ srt1	sxd1-/+	7	5,60	1,57	2,71	14 dpi
	sxd1-/-	8	6,10	1,25	2,38	14 dpi

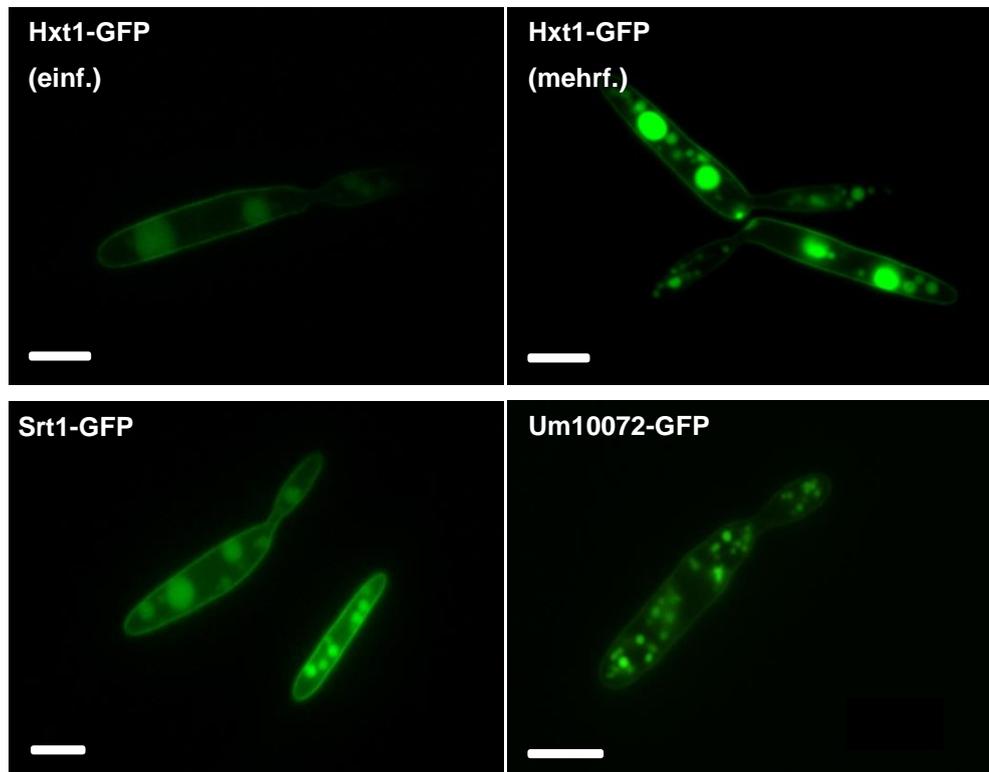


Abb. 6.5 Lokalisierung von Transporter-GFP Fusionsproteinen in SG200 Δ *hxt1* in axenischer Kultur. Neben Hxt1-GFP lokalisieren auch andere *U. maydis* Zuckertransporter-GFP Fusionsproteine sowohl in der zellulären Peripherie als auch in Vakuolen (vgl. Co-Lokalisierung mit dem Vakuolen-Marker CMAC auf Abb. 2.6). Die stärkere Expression in Zellen mit mehrfach integriertem Fusionskonstrukt führte zu einem stärkeren GFP-Signal in den Vakuolen, während die Signale in der zellulären Peripherie vergleichbar waren. Als Kontrollen für die Lokalisierung wurden der Saccharose-Transporter Srt1 sowie der putative Monosaccharid-Transporter Um10072 verwendet. In beiden Fällen wurde die Integration nicht durch Southern Analysen überprüft. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

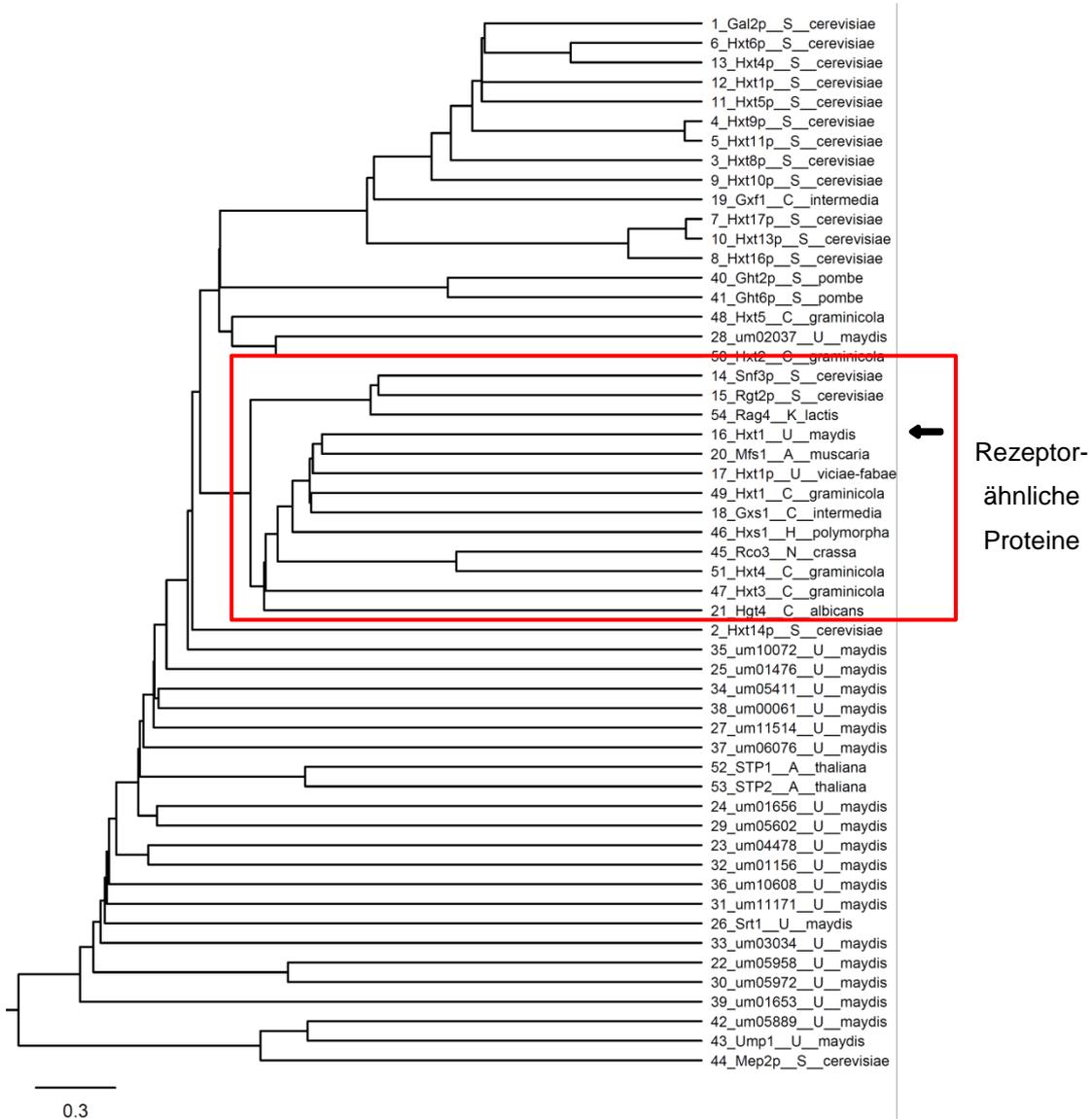
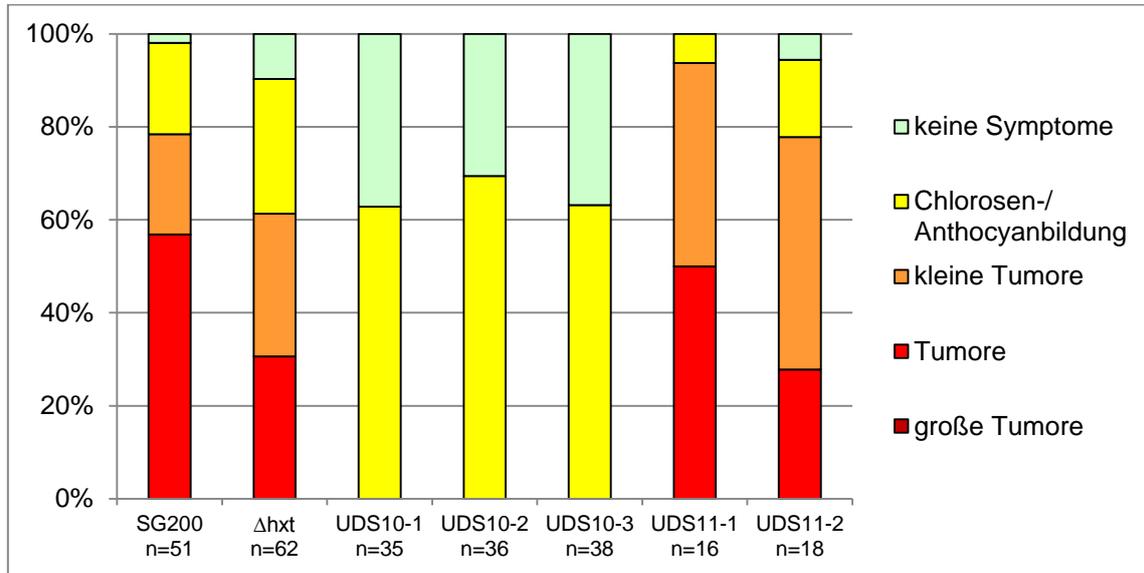


Abb. 6.6 Phylogenetische Analyse von Hxt1. Zur vergleichenden phylogenetischen Analyse von Hxt1 wurde ein multiples Alignment mit der Aminosäure-Sequenz von Hxt1 und Sequenzen anderer Hexosetransporter-ähnlicher Proteine aus *S. cerevisiae* und weiteren Spezies durchgeführt. Die Sequenzen zweier Ammonium-Transporter aus *S. cerevisiae* und *U. maydis* dienen als Aussengruppe. Hxt1 fällt als einziges *U. maydis* Protein in eine Untergruppe mit den bekannten Zucker-Rezeptoren ScSnf3, ScRgt2, CgHgt4 und HpHxs1. Das Alignment der Sequenzen erfolgte durch die G-INS-I Methode von MAFFT Version 6. Der phylogenetische Stammbaum wurde mit der "minimum linkage clustering" Methode berechnet und durch FigTree v1.3.1 dargestellt.



Stammbezeichnung	UDS10	UDS11
Genotyp	SG200Δhxt1 [<i>P_{hxt1}-hxt1(R164K)-gfp</i>] ^{ipm}	SG200 [<i>P_{hxt1}-hxt1(R164K)-gfp</i>] ^{ipm}

Abb. 6.7 Die Überexpression von *hxt1(R164K)* führt im $\Delta hxt1$ - jedoch nicht im WT-Hintergrund zum Verlust der Pathogenität. Die Auswertung der Symptome wurde 7 Tage nach Injektion durchgeführt. Die mehrfache Integration des *hxt1(R164K)-gfp* Expressionskonstrukts im *ip*-Locus führt im *hxt1*-Deletionshintergrund von UDS10 zum vollständigen Verlust der Pathogenität während im WT-Hintergrund von UDS11 kein Effekt festzustellen war. Die Zahl der ausgewerteten Pflanzen ist durch n angegeben.

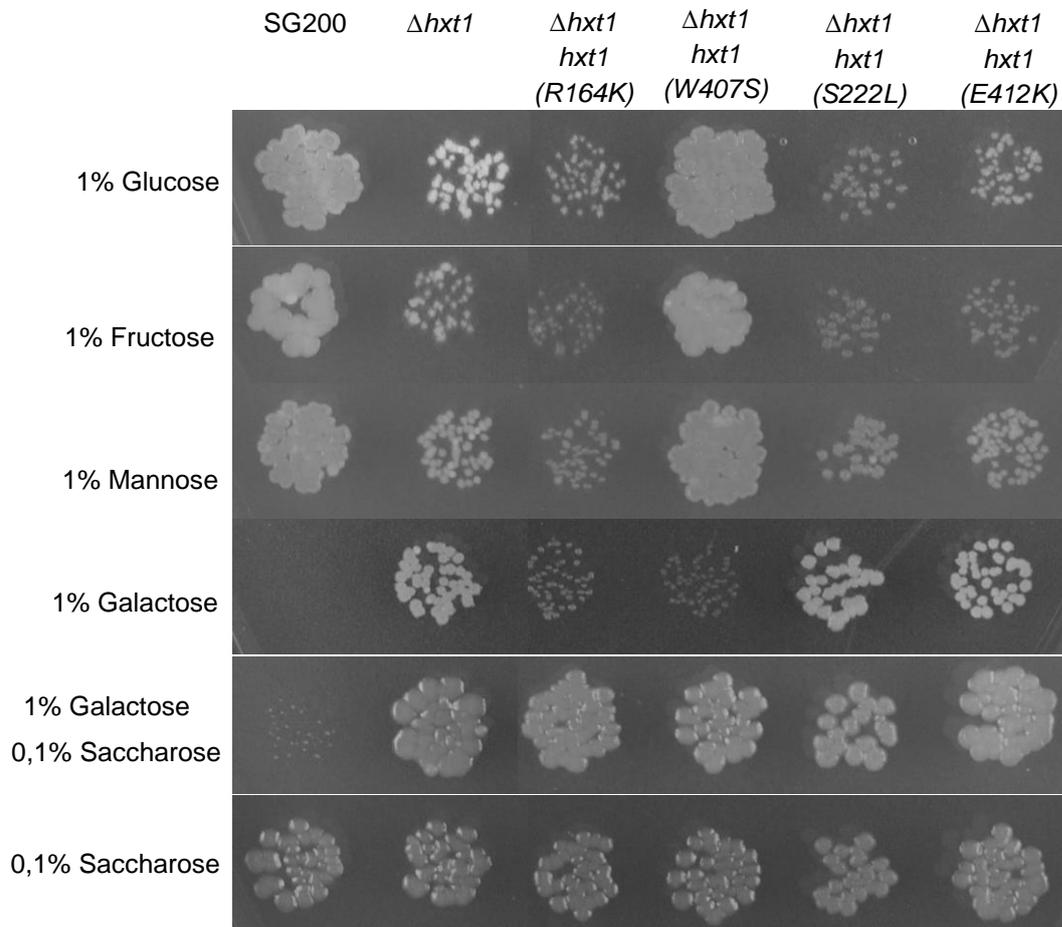


Abb. 6.8 Einfluss verschiedener *hxt1*-Allele auf das Wachstum von *hxt1*-Deletionsstämmen. Verschiedene Varianten des ORF von *hxt1* wurden auf die Fähigkeit zur Komplementation getestet. Diese enthalten Mutationen, die zum jeweils angegebenen Aminosäure-Austausch führen. Die Expression der *hxt1*-Varianten wurde durch die multiple Integration eines Expressionskonstrukts mit dem *hxt1*-Promotor und C-terminaler GFP-Fusion im *hxt1*-Deletionsstamm ermöglicht. Das Wachstum der Stämme auf Ammonium-Minimalmedium mit den angegebenen Zuckern als einziger Kohlenhydratquelle wurde nach 3 Tagen, im Fall von Galactose nach 10 Tagen beobachtet.

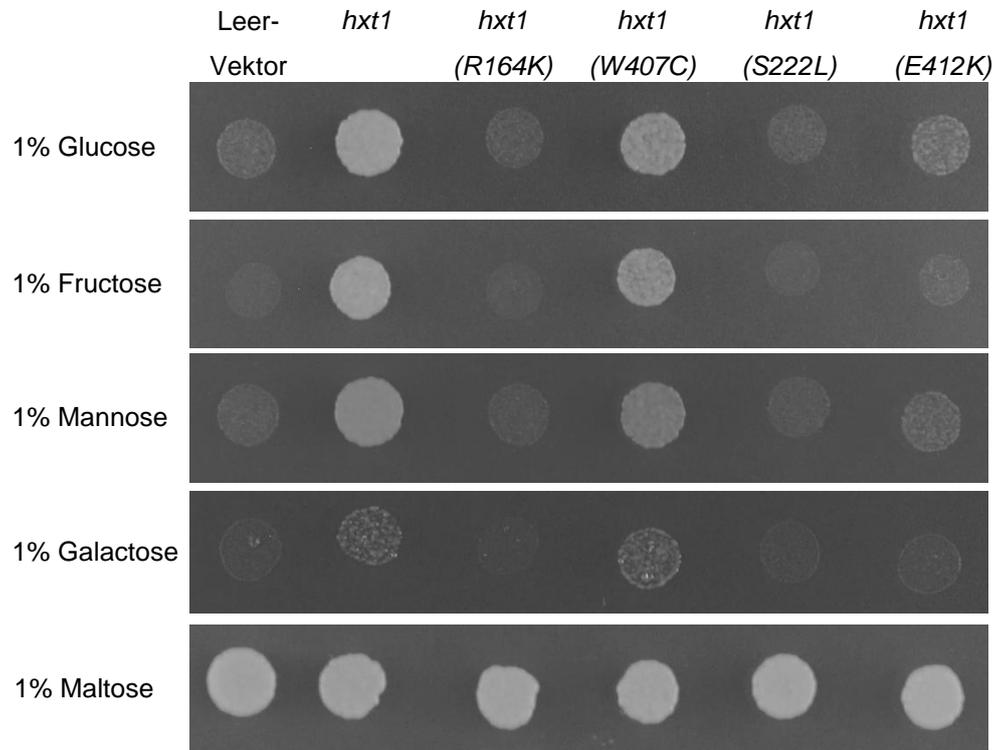


Abb. 6.9 Wachstumsanalyse mit *hxt1* exprimierenden Hefezellen. Definierte Zellmengen des Hefestamms EBY.VW4000 wurden auf Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft und das Wachstum nach 3 Tagen beobachtet. Die Zellen trugen zur Kontrolle den leeren Expressionsvektor oder exprimierten *hxt1* bzw. *hxt1*-Varianten mit Mutationen die zum jeweils angegebenen Aminosäure-Austausch führen. Neben *hxt1* führt nur die Expression von *hxt1*(W407C) zu einem verbesserten Wachstum.

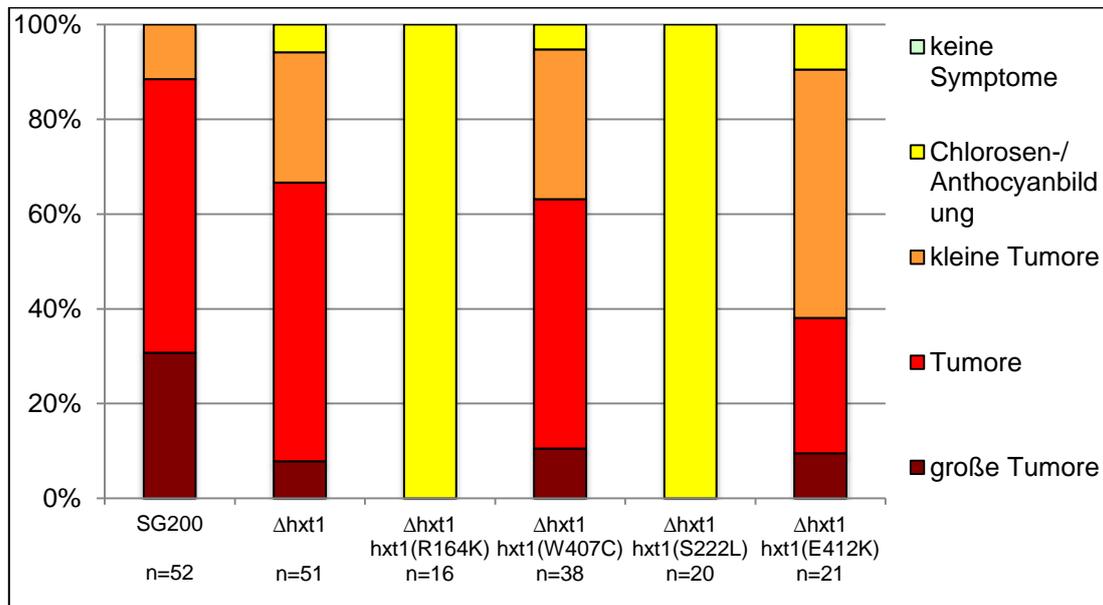


Abb. 6.10 Einfluss der Überexpression von Hxt1-Varianten im $\Delta hxt1$ -Hintergrund auf die Pathogenität. Die Bewertung der Symptome erfolgte sieben Tage nach Injektion. Die Hxt1-Varianten mit den jeweils angegebenen mutierten Aminosäuren wurden in den jeweiligen Stämmen im *hxt1*-Deletionshintergrund mit C-terminaler GFP-Fusion unter Kontrolle des *hxt1*-Promotors exprimiert. Die Expressionskonstrukte waren dabei jeweils mehrfach im *ip*-Locus integriert. n gibt die Anzahl der untersuchten Pflanzen an.

Tab. 6.4 Expressionswerte der in UDS10 im Vergleich zu SG200 und SG200 Δ hxt1 auf der Pflanzenoberfläche reprimierten Gene in Cluster 1

Probe Set	Gen	Annotation	gemittelte Expressionswerte (Expr), Calls (C) und Standardfehler (SE)									Fold Changes	
			SG200			SG200 Δ hxt1			UDS10			SG200 vs. UDS10	SG200 Δ hxt1 vs. UDS10
			Expr	C	SE	Expr	C	SE	Expr	C	SE		
W85um125G_at	um10556	NO ANNOTATION AVAILABLE	445,7	P	164,3	113,9	P	22,9	16,8	A	7,3	-26,58	-6,79
W140um005G_at	um05819	NO ANNOTATION AVAILABLE	755,6	P	172,2	176,8	P	38,2	71,2	A	9,9	-10,61	-2,48
W125um140G_at	um03752	NO ANNOTATION AVAILABLE	250,1	P	86,0	87,8	P	22,3	24,1	A	5,4	-10,36	-3,64
W40um264G_at	um11060	NO ANNOTATION AVAILABLE	393,6	P	164,7	95,0	P	13,2	38,6	P	1,5	-10,2	-2,46
W105um126G_at	um02194	NO ANNOTATION AVAILABLE	933,9	P	290,8	252,4	P	54,3	96,2	P	7,2	-9,71	-2,62
C15um256G_at	um05780	NO ANNOTATION AVAILABLE	860,5	P	368,6	160,6	P	30,3	103,2	P	15,3	-8,34	-1,56
C5um277G_at	um05296	NO ANNOTATION AVAILABLE	800,9	P	174,9	235,7	P	63,4	100,4	P	5,7	-7,98	-2,35
C25um179G_at	um01377	NO ANNOTATION AVAILABLE	2425,0	P	686,4	605,9	P	112,2	321,7	P	33,0	-7,54	-1,88
W125um220G_at	um06290	NO ANNOTATION AVAILABLE	898,9	P	233,5	259,9	P	70,6	123,3	P	15,3	-7,29	-2,11
W90um126G_at	um02196	NO ANNOTATION AVAILABLE	915,5	P	280,5	246,3	P	48,7	134,1	P	14,5	-6,83	-1,84
C10um245G_at	um05932	NO ANNOTATION AVAILABLE	497,4	P	139,2	127,8	P	13,9	77,4	P	11,3	-6,43	-1,65
C90um210G_at	um02826	NO ANNOTATION AVAILABLE	778,1	P	224,8	239,2	P	60,5	121,5	P	9,3	-6,4	-1,97
W61um021G_at	um03105	NO ANNOTATION AVAILABLE	1165,4	P	334,9	352,2	P	72,7	197,8	P	37,3	-5,89	-1,78
C60um206G_at	um10609	TRICARBOXYLATE TRANSPORT PROTEIN (CITRATE TRANSPORT PROTEIN) (CTP).	1430,7	P	410,8	471,0	P	144,1	246,8	P	91,2	-5,8	-1,91
C55um081G_at	um03224	NO ANNOTATION AVAILABLE	996,6	P	285,2	300,7	P	45,2	184,9	P	23,3	-5,39	-1,63
W55um206G_at	um02807	HYPOTHETICAL PROTEIN YRAM.	1935,9	P	548,3	684,3	P	188,8	373,5	P	153,4	-5,18	-1,83
W60um081G_at	um03223	MIG1 PROTEIN.	1842,0	P	470,7	559,7	P	88,8	363,1	P	62,1	-5,07	-1,54
C15um277G_at	um05294	NO ANNOTATION AVAILABLE	833,1	P	193,4	280,6	P	60,3	179,3	P	31,4	-4,65	-1,56
W35um122G_at	um01695	NO ANNOTATION AVAILABLE	758,2	P	220,9	334,6	P	56,3	183,2	P	12,0	-4,14	-1,83
W45um103G_at	um01987	NO ANNOTATION AVAILABLE	1065,0	P	267,9	479,9	P	115,1	257,6	P	26,8	-4,13	-1,86
W182um119G_at	um11362	NO ANNOTATION AVAILABLE	326,4	P	102,5	157,9	P	15,2	81,3	P	6,6	-4,01	-1,94
W35um074G_at	um01829	ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDASE A PRECURSOR (EC 3.2.1.55) (ARABINOSIDASE A) (ABF A).	3871,3	P	1080,1	1853,7	P	348,7	1176,7	P	216,7	-3,29	-1,58
W5um043G_at	um10608	QUINATE PERMEASE (QUINATE TRANSPORTER).	3438,4	P	463,6	1848,7	P	270,3	1198,0	P	333,6	-2,87	-1,54

Tab. 6.5 Expressionswerte der in UDS10 im Vergleich zu SG200 und SG200 Δ hxt1 auf der Pflanzenoberfläche reprimierten Gene in Cluster 2

Probe Set	Gen	Annotation	gemittelte Expressionswerte (Expr), Calls (C) und Standardfehler (SE)									Fold Changes	
			SG200			SG200 Δ hxt1			UDS10			SG200 vs. UDS10	SG200 Δ hxt1 vs. UDS10
			Expr	C	SE	Expr	C	SE	Expr	C	SE		
C140um209G_at	um00029	MYO-INOSITOL OXYGENASE (EC 1.13.99.1).	508,1	P	165,1	295,7	P	81,1	74,3	P	17,8	-6,84	-3,98
W160um003G_at	um01944	ALLANTOATE PERMEASE.	784,1	P	167,4	418,1	P	177,0	118,2	P	56,5	-6,63	-3,54
C160um117G_at	um11944	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEMBER C4 (EC 1.1.1.-) (CHLORDECONE REDUCTASE) (EC 1.1.1.225) (CDR) (3-ALPHA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE) (EC 1.1.1.50) (3-ALPHA-HSD) (DIHYDRODIOL DEHYDROGENASE 4) (DD4) (HAKRA).	2583,0	P	514,1	1667,6	P	315,3	557,0	P	40,8	-4,64	-2,99
W110um098G_at	um00158	POLYUNSATURATED FATTY ACID SPECIFIC ELONGATION ENZYME 1.	278,6	P	99,9	263,6	P	115,0	69,4	P	23,5	-4,01	-3,8
W45um126G_at	um10072	HEXOSE TRANSPORTER 2.	1255,3	P	242,7	1072,6	P	201,0	313,7	P	25,8	-4	-3,42
C30um069G_at	um05033	GLUCOSE/GALACTOSE TRANSPORTER.	1378,6	P	486,0	1148,0	P	437,0	346,8	P	39,6	-3,97	-3,31
C20um183G_at	um05548	L-ASCORBATE OXIDASE (EC 1.10.3.3).	657,4	P	116,7	438,1	P	168,8	198,1	P	42,0	-3,32	-2,21
W5um057G_at	um06076	H(+)/MONOSACCHARIDE COTRANSPORTER.	1330,2	P	188,3	798,2	P	83,8	446,0	P	32,5	-2,98	-1,79
W165um003G_at	um01943	GLUCOSIDASE.	786,5	P	270,2	483,9	P	78,8	270,0	P	66,6	-2,91	-1,79
W120um074G_at	um10248	ALDOSE 1-EPIMERASE (EC 5.1.3.3) (MUTAROTASE).	176,8	P	42,1	180,6	P	11,3	62,5	P	5,6	-2,83	-2,89
W50um126G_at	um02204	BETA-GALACTOSIDASE (EC 3.2.1.23).	322,6	P	85,9	333,0	P	73,2	117,1	P	6,6	-2,76	-2,84
W5um166G_at	um10104	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEMBER C4 (EC 1.1.1.-) (CHLORDECONE REDUCTASE) (EC 1.1.1.225) (CDR) (3-ALPHA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE) (EC 1.1.1.50) (3-ALPHA-HSD) (DIHYDRODIOL DEHYDROGENASE 4) (DD4) (HAKRA).	487,1	P	94,1	430,0	P	50,7	179,9	P	15,7	-2,71	-2,39

Probe Set	Gen	Annotation	gemittelte Expressionswerte (Expr), Calls (C) und Standardfehler (SE)									Fold Changes	
			SG200			SG200 Δ <i>hxt1</i>			UDS10			SG200 vs. UDS10	SG200 Δ <i>hxt1</i> vs. UDS10
			Expr	C	SE	Expr	C	SE	Expr	C	SE		
C120um049G_at	um00105	IRON TRANSPORT MULTICOPPER OXIDASE FET5 PRECURSOR (EC 1.-.-.-).	513,6	P	155,8	518,5	P	119,6	192,5	P	16,9	-2,67	-2,69
W120um119G_at	um01722	PUTATIVE CYTOPLASMIC PROTEIN.	323,6	P	61,6	242,8	P	41,0	123,9	P	18,3	-2,61	-1,96
C80um214G_at	um06453	TRANSALDOLASE B (EC 2.2.1.2).	456,6	P	50,8	331,8	P	84,8	177,8	P	14,9	-2,57	-1,87
C95um157G_at	um02169	AQUAPORIN 3.	873,4	P	60,5	1115,6	P	264,0	339,2	P	74,8	-2,57	-3,29
C125um013G_at	um03524	PEROXISOMAL COPPER AMINE OXIDASE (EC 1.4.3.6) (METHYLAMINE OXIDASE).	478,9	P	8,5	334,8	P	34,1	198,0	P	44,7	-2,42	-1,69
C140um075G_at	um06071	PARA-NITROBENZYL ESTERASE (EC 3.1.1.-) (PNB CARBOXY-ESTERASE) (PNBCE).	182,0	P	64,8	129,4	P	39,4	78,0	P	13,0	-2,33	-1,66
C50um072G_at	um00955	DELTA-9 FATTY ACID DESATURASE (EC 1.14.99.5).	2490,2	P	596,7	1667,7	P	370,4	1075,8	P	279,2	-2,31	-1,55
C25um056G_at	um01885	FATTY ACID SYNTHASE (EC 2.3.1.85) [INCLUDES: EC 2.3.1.38; EC 2.3.1.39; EC 2.3.1.41; EC 1.1.1.100; EC 4.2.1.61; EC 1.3.1.10; EC 3.1.2.14].	172,3	P	97,6	214,7	P	65,7	74,7	P	15,3	-2,31	-2,87
C36um245G_at	um05923	2-DEOXY-D-GLUCONATE 3-DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.125).	1405,0	P	187,1	989,5	P	336,0	611,6	P	137,5	-2,3	-1,62
C50um228G_at	um01921	D-XYLULOSE KINASE (EC 2.7.1.17).	145,8	P	25,8	118,6	P	10,0	66,2	P	9,5	-2,2	-1,79
W125um049G_at	um10023	HIGH-AFFINITY IRON PERMEASE CAFTR2.	200,4	P	53,6	164,4	P	21,5	92,8	P	13,6	-2,16	-1,77
W45um025G_at	um04133	RHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS 3-OXOACYL-[ACYL-CARRIER PROTEIN] REDUCTASE (EC 1.1.1.100) (3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN REDUCTASE).	442,6	P	146,3	435,3	P	92,6	206,3	P	2,3	-2,15	-2,11
W35um170G_at	um05002	METHYLTRANSFERASE CMCJ.	242,0	P	123,7	204,3	P	109,7	115,3	P	19,4	-2,1	-1,77
C80um060G_at	um02115	MANDELATE RACEMASE (EC 5.1.2.2).	212,6	P	44,6	201,5	P	43,9	106,0	P	20,9	-2,01	-1,9
C25um282G_at	um02683	HYPOTHETICAL 34.5 KDA PROTEIN (L-GALACTOSE DEHYDROGENASE) (AT4G33670/T16L1_160).	212,9	P	53,8	284,8	P	136,4	105,7	P	9,9	-2,01	-2,7

Probe Set	Gen	Annotation	gemittelte Expressionswerte (Expr), Calls (C) und Standardfehler (SE)									Fold Changes	
			SG200			SG200 Δ <i>hxt1</i>			UDS10			SG200 vs. UDS10	SG200 Δ <i>hxt1</i> vs. UDS10
			Expr	C	SE	Expr	C	SE	Expr	C	SE		
W100um227G_at	um11667	ATP-DEPENDENT RNA HELICASE DOB1 (MRNA TRANSPORT REGULATOR MTR4).	168,6	P	38,9	144,5	P	18,1	85,4	P	8,4	-1,98	-1,69
C5um112G_at	um04667	DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHASE (EC 4.2.1.52) (DHDPS).	786,9	P	26,9	827,8	P	146,2	397,3	P	25,2	-1,98	-2,08
W110um165G_at	um00424	CHOLINE OXIDASE (EC 1.1.3.17).	345,4	P	52,0	284,8	P	61,2	180,5	P	15,1	-1,91	-1,58
W140um013G_at	um03522	GABA-SPECIFIC PERMEASE (GABA-SPECIFIC TRANSPORT PROTEIN).	1441,3	P	171,6	1220,2	P	124,2	762,4	P	41,8	-1,89	-1,6
W65um126G_at	um02201	PUTATIVE METHYLTRANSFERASE RV3342 (EC 2.1.1.-).	1656,5	P	214,7	1411,4	P	114,6	891,0	P	161,1	-1,86	-1,58
W55um015G_at	um04629	ACETYL COA CARBOXYLASE (EC 6.4.1.2).	637,6	P	112,4	832,2	P	364,1	349,6	P	8,9	-1,82	-2,38
C60um203G_at	um04988	MITOCHONDRIAL 2-OXODICARBOXYLATE CARRIER 2.	670,2	P	139,0	579,7	P	78,3	371,2	P	41,7	-1,81	-1,56
W85um194G_at	um01508	AQUAPORIN 3.	267,4	P	91,5	277,5	P	51,7	148,9	P	14,3	-1,8	-1,86
W70um053G_at	um10339	FATTY ACID SYNTHASE (EC 2.3.1.85) (CONTAINS: EC 2.3.1.38, EC 2.3.1.39, EC 2.3.1.41, EC 1.1.1.100, EC 4.2.1.60, EC 4.2.1.61, EC 1.3.1.10, AND EC 3.1.2.14).	319,3	P	32,2	335,9	P	79,5	180,5	P	13,5	-1,77	-1,86
C220um074G_at	um01788	DEACETYLASE PRECURSOR.	1144,0	P	166,7	1352,6	P	88,2	674,5	P	76,7	-1,7	-2,01
W15um286G_at	um00529	CARBOXYLIC ACID TRANSPORT PROTEIN.	446,1	P	97,8	664,6	P	244,3	265,4	P	72,5	-1,68	-2,5
C5um003G_at	um11380	MFS TRANSPORTER OF UNKOWN SPECIFICITY.	248,6	P	13,6	229,7	P	9,0	152,7	P	14,8	-1,63	-1,5
W20um158G_at	um01772	ALDOSE 1-EPIMERASE PRECURSOR (EC 5.1.3.3) (MUTAROTASE).	462,9	P	93,6	828,7	P	129,5	284,2	P	5,6	-1,63	-2,92
W91um089G_at	um10822	ATP12 PROTEIN, MITOCHONDRIAL PRECURSOR.	212,2	P	5,4	224,8	P	19,1	130,1	P	8,9	-1,63	-1,73
W60um066G_at	um04186	AMINO ACID TRANSPORTER.	151,7	P	18,1	184,7	P	46,4	93,8	P	2,3	-1,62	-1,97
W35um159G_at	um01634	60S RIBOSOMAL PROTEIN L19 (YL15).	1294,9	P	100,6	1319,4	P	222,3	805,9	P	45,5	-1,61	-1,64
C90um021G_at	um10634	HYPOTHETICAL 10.1 KDA PROTEIN.	255,8	P	51,6	438,7	P	96,9	160,7	P	22,9	-1,59	-2,73

Probe Set	Gen	Annotation	gemittelte Expressionswerte (Expr), Calls (C) und Standardfehler (SE)									Fold Changes	
			SG200			SG200 Δ <i>hxt1</i>			UDS10			SG200 vs. UDS10	SG200 Δ <i>hxt1</i> vs. UDS10
			Expr	C	SE	Expr	C	SE	Expr	C	SE		
C115um024G_at	um01533	SPERMIDINE/SPERMINE N(1)-ACETYLTRANSFERASE (EC 2.3.1.57) (DIAMINE ACETYLTRANSFERASE) (SSAT) (PUTRESCINE ACETYLTRANSFERASE).	237,2	P	25,0	268,0	P	83,9	152,3	P	8,2	-1,56	-1,76
C90um203G_at	um04994	DOLICHYL-DIPHOSPHOOLIGOSACCHARIDE--PROTEIN GLYCOSYLTRANSFERASE BETA SUBUNIT PRECURSOR (EC 2.4.1.119) (OLIGOSACCHARYL TRANSFERASE BETA SUBUNIT).	155,9	P	14,8	162,9	P	10,2	103,9	P	40,5	-1,5	-1,57

Tab. 6.6 Expressionswerte der in UDS10 im Vergleich zu SG200 und SG200 Δ hxt1 auf der Pflanzenoberfläche induzierten Gene in Cluster 3

Probe Set	Gen	Annotation	gemittelte Expressionswerte (Expr), Calls (C) und Standardfehler (SE)									Fold Changes	
			SG200			SG200 Δ hxt1			UDS10			SG200 vs. UDS10	SG200 Δ hxt1 vs. UDS10
			Expr	C	SE	Expr	C	SE	Expr	C	SE		
C94um144G_at	um04057	ALDEHYDE REDUCTASE II (EC 1.1.1.2).	1280,2	P	142,7	2026,4	P	472,4	3634,3	P	275,3	2,84	1,79
C30um007G_at	um05355	STEROL O-ACYLTRANSFERASE 2 (EC 2.3.1.26) (STEROL-ESTER SYNTHASE 2).	1438,5	P	306,1	2135,1	P	527,8	3827,7	P	76,5	2,66	1,79
W52um151G_at	um10939	NO ANNOTATION AVAILABLE	213,3	P	21,6	336,6	P	36,7	540,7	P	27,2	2,54	1,61
W51um117G_at	um03073	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ERD13 (EC 2.5.1.18) (GST CLASS-PHI).	96,1	P	10,8	140,9	P	27,6	237,8	P	52,4	2,48	1,69
C140um107G_at	um11266	NO ANNOTATION AVAILABLE	484,1	P	156,7	712,9	P	166,3	1176,9	P	54,0	2,43	1,65
C107um076G_at	um10657	NO ANNOTATION AVAILABLE	104,4	P	8,0	148,4	P	13,3	253,2	P	73,9	2,42	1,71
C142um154G_at	um02527	UDP-GLUCOSE:STEROL GLUCOSYLTRANSFERASE (EC 2.4.1.173).	1584,4	P	197,5	2280,9	P	366,5	3835,6	P	586,1	2,42	1,68
C42um217G_at	um04499	(S)-ADENOSYL-L-METHIONINE:DELTA 24-STEROL METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.41).	202,7	P	12,6	221,3	P	17,7	468,6	P	93,9	2,31	2,12
EST03um129_at	um03738	NO ANNOTATION AVAILABLE	85,9	P	11,6	112,6	P	1,1	190,3	P	26,9	2,21	1,69
C35um070G_at	um02481	NO ANNOTATION AVAILABLE	249,5	P	13,1	354,7	P	62,0	549,8	P	66,8	2,2	1,55
C15um083G_at	um03158	PEROXISOMAL BIFUNCTIONAL ENZYME (PBE) (PBE) [INCLUDES: ENOYL-COA HYDRATASE (EC 4.2.1.17); 3,2-TRANS-ENOYL-COA ISOMERASE (EC 5.3.3.8); 3-HYDROXYACYL-COA DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.35)].	525,8	P	63,9	674,9	P	93,0	1121,5	P	255,7	2,13	1,66
C115um211G_at	um04557	NO ANNOTATION AVAILABLE	2569,7	P	622,4	3422,8	P	295,4	5446,3	P	1175,9	2,12	1,59
C30um223G_at	um01406	NO ANNOTATION AVAILABLE	305,7	P	66,6	418,4	P	25,9	642,4	P	91,1	2,1	1,54
C142um107G_at	um11266	LYSOPHOSPHOLIPASE C1450.09C PRECURSOR (EC 3.1.1.5).	114,7	P	29,5	157,3	P	37,0	239,7	P	9,0	2,09	1,52
W30um169G_at	um02325	WAX SYNTHASE-LIKE PROTEIN.	119,1	P	15,0	131,2	P	14,2	244,9	P	17,5	2,06	1,87

Probe Set	Gen	Annotation	gemittelte Expressionswerte (Expr), Calls (C) und Standardfehler (SE)									Fold Changes	
			SG200			SG200 Δ <i>hxt1</i>			UDS10			SG200 vs. UDS10	SG200 Δ <i>hxt1</i> vs. UDS10
			Expr	C	SE	Expr	C	SE	Expr	C	SE		
W130um166G_at	um00386	PUTATIVE GTP CYCLOHYDROLASE, RIBOFLAVIN BIOSYNTHESIS.	578,6	P	20,2	720,6	P	57,1	1149,8	P	210,3	1,99	1,6
W15um264G_at	um04029	STEROL DESATURASE FAMILY PROTEIN.	1305,2	P	99,8	1611,9	P	40,5	2527,0	P	334,0	1,94	1,57
W57um276G_at	um11592	CARBOXYLASE.	136,8	P	12,2	149,4	P	14,3	262,4	P	53,8	1,92	1,76
W25um269G_at	um05414	DHA14-LIKE MAJOR FACILITATOR.	570,1	P	79,6	446,8	P	53,7	1081,0	P	115,4	1,9	2,42
C25um093G_at	um10923	NO ANNOTATION AVAILABLE	131,6	P	32,8	158,0	P	12,7	245,7	P	37,6	1,87	1,56
C35um188G_at	um04793	HYPOTHETICAL PROTEIN C584.11C IN CHROMOSOME III.	2310,9	P	379,0	2617,3	P	308,0	4325,1	P	837,9	1,87	1,65
W20um138G_at	um02641	PEROXIN 10.	142,6	P	13,9	151,3	P	11,5	266,2	P	52,0	1,87	1,76
C25um013G_at	um03544	SEC14 CYTOSOLIC FACTOR (PHOSPHATIDYLINOSITOL/PHOSPHATIDYLCHOLINE TRANSFER PROTEIN) (PI/PC TP).	359,9	P	62,1	352,3	P	50,9	670,1	P	83,1	1,86	1,9
W120um126G_at	um02190	NO ANNOTATION AVAILABLE	1085,8	P	309,7	585,7	P	72,9	2000,1	P	643,3	1,84	3,41
W55um283G_at	um00309	MACROFAGE ACTIVATING GLYCOPROTEIN.	85,3	P	28,7	69,4	A	25,0	153,6	P	65,6	1,8	2,21
W45um192G_at	um00191	NO ANNOTATION AVAILABLE	68,7	P	16,6	71,0	P	10,4	123,5	P	22,3	1,8	1,74
C40um019G_at	um06399	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.	448,7	P	76,2	342,2	P	59,7	800,9	P	245,1	1,79	2,34
W26um190G_at	um00336	NO ANNOTATION AVAILABLE	884,1	P	305,5	988,8	P	222,2	1567,5	P	326,7	1,77	1,59
C40um284G_at	um10746	SOLUBLE EPOXIDE HYDROLASE (SEH) (EC 3.3.2.3) (EPOXIDE HYDRATASE) (CYTOSOLIC EPOXIDE HYDROLASE) (CEH).	313,3	P	26,6	328,9	P	4,6	547,9	P	88,6	1,75	1,67
W50um235G_at	um10183	SPORULATION PROTEIN SPS19 (SPORULATION-SPECIFIC PROTEIN SPX19).	1740,6	P	98,0	1824,5	P	98,7	2959,9	P	227,9	1,7	1,62
C25um280G_at	um11604	FERRIC REDUCTASE TRANSMEMBRANE COMPONENT 7 (EC 1.6.99.13) (FERRIC- CHELATE REDUCTASE 7).	337,3	P	51,4	267,2	P	47,5	570,0	P	127,5	1,69	2,13
W135um154G_at	um02528	PEROXISOMAL TARGETING SIGNAL RECEPTOR (PEROXISOMAL PROTEIN PAY32) (PEROXIN-5) (PTS1 RECEPTOR).	393,0	P	48,8	421,4	P	38,4	663,1	P	102,2	1,69	1,57
C179um010G_at	um01244	RING FINGER PROTEIN 13 (C-RZF).	349,1	P	50,7	358,6	P	31,6	589,0	P	50,0	1,69	1,64
W40um223G_at	um11330	O-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.-).	134,3	P	33,3	141,7	P	9,1	227,1	P	25,3	1,69	1,6

Probe Set	Gen	Annotation	gemittelte Expressionswerte (Expr), Calls (C) und Standardfehler (SE)									Fold Changes	
			SG200			SG200 Δ <i>hxt1</i>			UDS10			SG200 vs. UDS10	SG200 Δ <i>hxt1</i> vs. UDS10
			Expr	C	SE	Expr	C	SE	Expr	C	SE		
W35um189G_at	um00712	MGATP-ENERGIZED GLUTATHIONE S- CONJUGATE PUMP (EC 3.6.1.3).	836,5	P	81,3	800,4	P	98,9	1401,3	P	289,6	1,68	1,75
C45um170G_at	um05004	NO ANNOTATION AVAILABLE	199,8	P	35,2	221,0	P	9,4	334,8	P	74,0	1,68	1,52
W120um144G_at	um04063	SOLUBLE EPOXIDE HYDROLASE (SEH) (EC 3.3.2.3) (EPOXIDE HYDRATASE) (CYTOSOLIC EPOXIDE HYDROLASE) (CEH).	523,7	P	74,1	562,1	P	37,6	877,1	P	211,4	1,67	1,56
C50um084G_at	um06252	NO ANNOTATION AVAILABLE	121,1	P	18,5	123,6	P	17,1	202,7	P	17,9	1,67	1,64
C45um083G_at	um03149	MOLYBDENUM COFACTOR SULFURASE.	1764,1	P	361,5	1806,8	P	146,2	2906,8	P	498,5	1,65	1,61
C54um043G_at	um02794	26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 9 (26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT P27).	253,1	P	24,2	274,2	P	28,9	415,0	P	43,4	1,64	1,51
C135um157G_at	um02162	NO ANNOTATION AVAILABLE	375,9	P	58,5	373,2	P	44,7	607,7	P	92,0	1,62	1,63
C115um144G_at	um04062	NO ANNOTATION AVAILABLE	161,0	P	18,9	152,4	P	14,8	258,8	P	37,7	1,61	1,7
W5um267G_at	um06125	NO ANNOTATION AVAILABLE	373,2	P	73,5	385,5	P	17,4	598,6	P	107,3	1,6	1,55
W30um126G_at	um02208	ACYL-COA OXIDASE (EC 1.3.3.6) (AT4G16760/DL4405C).	1894,2	P	193,6	1808,0	P	53,1	3018,2	P	785,0	1,59	1,67
W60um250G_at	um10365	MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1.	700,2	P	78,4	660,3	P	83,2	1106,8	P	101,9	1,58	1,68
C105um073G_at	um10916	NO ANNOTATION AVAILABLE	169,3	P	15,4	159,4	P	18,5	263,0	P	25,6	1,55	1,65
C102um173G_at	um11482	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2 (EC 6.3.2.19) (UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE) (UBIQUITIN CARRIER PROTEIN) (UBIQUITIN--PROTEIN LIGASE-LIKE PROTEIN).	871,1	P	175,1	753,0	P	37,7	1328,1	P	89,5	1,52	1,76
C102um185G_at	um05480	CHITIN SYNTHASE 1 (EC 2.4.1.16) (CHITIN-UDP ACETYL-GLUCOSAMINYL TRANSFERASE 1) (CLASS-IV CHITIN SYNTHASE 1).	340,1	P	21,0	337,3	P	5,4	516,3	P	19,1	1,52	1,53

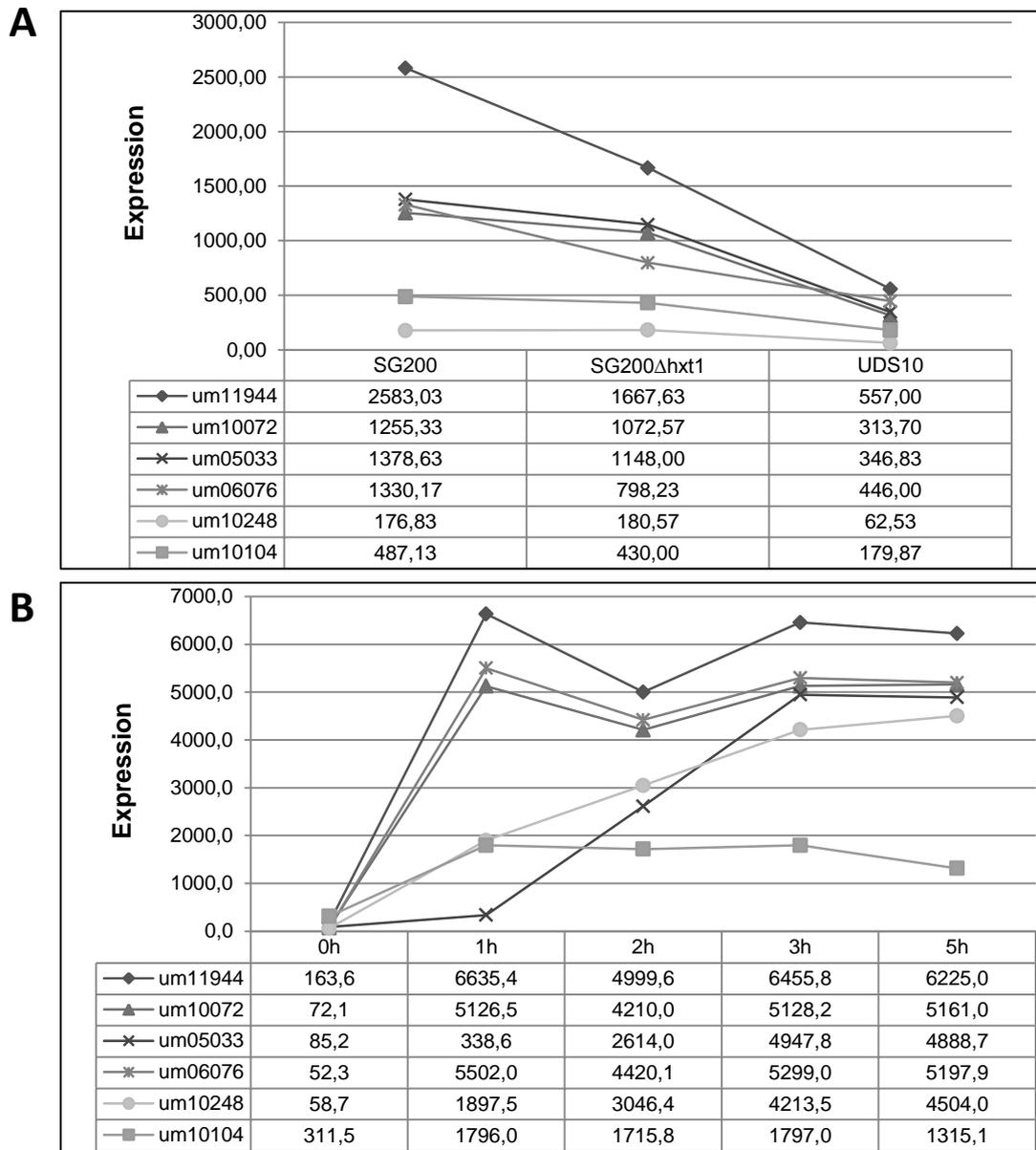


Abb. 6.11 Expression von Genen, die in UDS10 auf der Pflanzenoberfläche reprimiert sind und nach einem Wechsel von Glucose-haltigem zu Arabinose-haltigem Medium induziert werden. Die Daten basieren auf Microarray-Analysen von der Pflanzenoberfläche 24 hpi (A) bzw. einer Arabinose-Induktion des Stamms AB32 (B) (Heimel *et al.*, 2010b). In den Tabellen sind gemittelte Expressionswerte aus mehreren biologischen Replikaten angegeben.

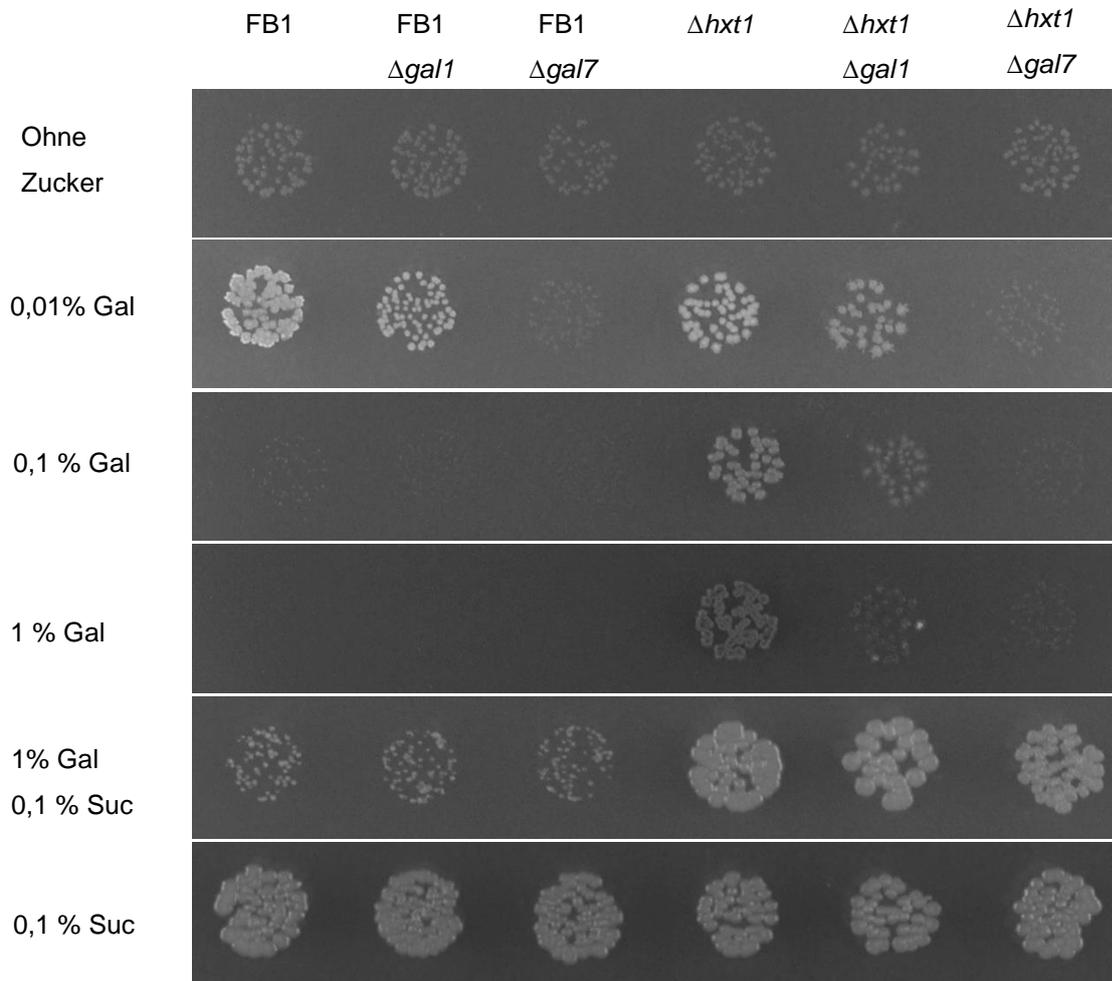


Abb. 6.12 Einfluss der Deletion von *gal1* und *gal7* auf das Wachstum von FB1 und FB1 $\Delta hxt1$ auf Galactose-haltigen Medien. Das Wachstum auf Medien mit Galactose (Gal) als einziger Kohlenhydratquelle wurde nach 10 Tagen, auf Saccharose (Suc)-haltigen Medien nach 3 Tagen beobachtet.

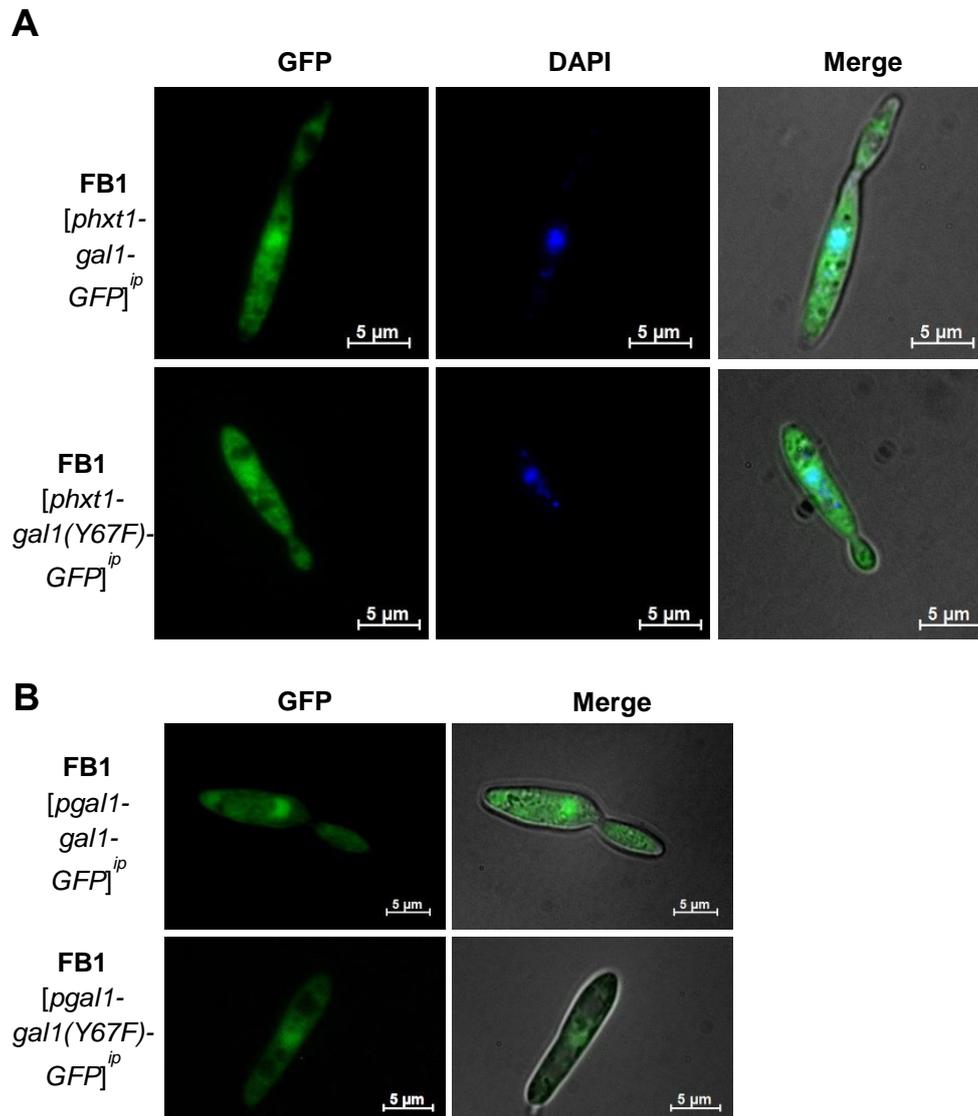


Abb. 6.13 Lokalisierung von Gal1- bzw. Gal1(Y67F)-GFP Fusionsproteinen. (A) Im *ip*-Locus unter Kontrolle des *hxt1*-Promotors exprimierte Gal1- GFP Fusionsproteine lokalisieren im Zytoplasma und co-lokalisieren mit DAPI gefärbten Zellkernen. Die Stämme wurden bis zu einer $OD_{600}=0,5$ in YEPS light Vollmedium angezogen und vor der Beobachtung mit Formaldehyd fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **(B)** Die Expression von Gal1-GFP Fusionsproteinen im *ip*-Locus unter Kontrolle eines 2,5 kb Fragments des nativen *gal1*-Promotors führt zur gleichen Lokalisierung wie die Überexpression unter Kontrolle des *hxt1*-Promotors. Ein Wechsel der Kohlenhydratquelle von Glucose zu Galactose hatte keinen Einfluss auf die Lokalisierung (nicht gezeigt).

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name David Schuler
Geburtsdatum 04. Juli 1983
Geburtsort Karlsruhe
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig, keine Kinder

Schullaufbahn

1990-1994 Werner-von-Siemens Grundschule
1994-2000 Humboldt-Gymnasium Karlsruhe
2000-2003 Elisabeth-von-Selbert-Gymnasium, Karlsruhe
07/2003 **Abitur** (Note: 1,9)

Zivildienst

2003-2004 Patientenbegleitservice Städtisches Klinikum Karlsruhe

Studienlaufbahn

2004-2006 Grundstudium der Biologie an der Universität Karlsruhe
11/2006 Vordiplom (Note: 3,0)
2006-2009 Hauptstudium der Biologie an der Universität Karlsruhe/am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
11/2008-03/2009 Diplomprüfungen
Hauptfach: Molekularbiologie (Note:1,0)
Nebenfächer: Botanik (Note:1,3), Mikrobiologie (Note:1,3)
04/2009-01/2010 Diplomarbeit (Note:1,0)
Unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Kämper im Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Thema: „*in vivo*-Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren in *Ustilago maydis*“
02/2010 **Diplom** – Abschluss (Dipl. Biol.) mit Auszeichnung (1,1)

Promotion

seit 03/2010 Anfertigung der Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Kämper im Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Thema: Charakterisierung der Akquisition von Kohlenhydraten in *Ustilago maydis*

Auslandsaufenthalt

05/2011-10/2011 Labor von Prof. Virginia Walbot, Department of Biology, Stanford University, Stanford, CA, USA,
Organspezifische Untersuchungen zur Funktion von Zuckertransportern im *Ustilago*/Mais-Pathosystem

Stipendien

05/2011-10/2011 Auslandsstipendium des Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS)
06/2012 Weiterqualifizierungsstipendium des KHYS

Konferenzbeiträge

09-10/2010 Abstract/Poster: "Hxt1, a Monosaccharide Transporter and Sensor Required for Virulence of *Ustilago Maydis*", 4th International Workshop Rauscholzhausen: Novel Molecular Targets for Improvement of Crop Resistance as a Measure against Global Famine, Rauscholzhausen, Deutschland

04/2011 Abstract/Poster: "Hxt1, a Monosaccharide Transporter and Sensor Required for Virulence of the Maize Pathogen *Ustilago maydis*", Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Karlsruhe, Deutschland,
Ausgezeichnet mit dem Posterpreis im Bereich "Microbial pathogens and pathogenicity"

03-04/2012 Abstract/Poster: "Hxt1, a Monosaccharide Transporter and Sensor Required for the Virulence Of *Ustilago maydis*", 11th European Conference On Fungal Genetics, Philipps-Universität Marburg, Deutschland,

06/2012 Abstract/Poster: "Carbon Acquisition in the *Ustilago*/Maize Pathosystem", Gordon Conference Cellular & Molecular Fungal Biology, Holderness School, Holderness, NH, USA,

Publikationen

HEIMEL, K., SCHERER, M., SCHULER, D., und KAMPER, J. (2010a). The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and b-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *Plant Cell* **22**, 2908-2922.

HEIMEL, K., SCHERER, M., VRANES, M., WAHL, R., POTHIRATANA, C., SCHULER, D., VINCON, V., FINKERNAGEL, F., FLOR-PARRA, I., und KAMPER, J. (2010b). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **6**, e1001035.

Lehrtätigkeit

seit 2010

Eigenständige Planung, Durchführung und Betreuung von verschiedenen Laborpraktika für Studenten in Einzel- und Gruppenbetreuung, Anleitung von zwei Diplomarbeiten und einer Bachelorarbeit

Arbeitserfahrung

01/2010-02/2010

Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Vorbereitung von Praktika, Mitarbeit an wissenschaftlichen Projekten

Danksagung

Mein erster Dank geht an Jörg, der mir diese Arbeit ermöglicht hat und mich wann immer möglich unterstützt hat. Danke für die Ratschläge und Ideen zu meinem Projekt und den Interpretationen meiner nicht immer ganz eindeutigen Ergebnissen. Danke natürlich auch für die Ermöglichung des Stanford-Aufenthalts, die vielen Freiheiten die du mir bei der Gestaltung des Projekts gelassen hast und natürlich auch für die Aktionen außerhalb des Labors wie unser unvergessliches Grünkohl-Essen.

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Puchta möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Mein Dank geht außerdem nach Erlangen zu Franz Klebl für die Unterstützung bei den Aufnahmemessungen, zu Norbert Sauer und Kathrin Wippel für die zur Verfügung gestellten Plasmide und an Lars Voll für die (geplante) Aktivitätsmessung.

Ein großes Dankeschön an Prof. Virginia Walbot für die Gastfreundschaft während meines Aufenthalts in ihrer Arbeitsgruppe, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen interessanten Gespräche und die Kontakte, die sie für mich hergestellt hat. Danke natürlich auch an ihre Mitarbeiter Tim, Rachel, Darren, Gilian, Blaine und John, die mich in jeglicher Hinsicht bei meiner Arbeit unterstützt haben. Ein Riesendank auch an Davide Sosso für die FRET-Messungen und natürlich auch für die weniger wissenschaftlichen Aktivitäten. Darüber hinaus danke ich dem KHYS für die finanzielle Unterstützung meines Auslandsaufenthaltes und dem Besuch der Gordon Konferenz.

Als nächstes möchte ich meinen Mitstreitern Bastian Dillner, Christina Höll und Jonas Ulrich danken, die im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Bachelorarbeit und Praktika an dem Zucker-Projekt mitgearbeitet und so einen großen Teil zu den Ergebnissen beigetragen haben. Natürlich nicht zu vergessen ist Ramon: Danke für die großartigen Vorarbeiten, deine Ideen und die Vorbildlich sortierte Stamm- und Plasmidsammlung, die mir den Einstieg in das Projekt deutlich erleichtert haben. Und natürlich danke für den Kontakt zu Virginia Walbot, ohne dich wäre der Aufenthalt nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank an alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter der AG Kämper. An Kai1 für die guten Gespräche und an Kai2 dafür dass du immer für'n Spaß zu haben warst. Danke Christoph für die Beiträge und Diskussionen in den Seminaren. Ein großer Dank an Nikola, die gute Seele des Labors: Danke für dein Engagement, mit dem du immer dafür gesorgt hast, dass das Labor nicht aus den Fugen gerät! Ich denke wir wissen das alle zu schätzen. Danke Miro für die Hilfe in allen Labor- und sonstigen Lebenslagen. Ob Klonierung, PCR, Excel, PowerPoint, Microarray, Cevapcici und Krautwickel, PC, Mac oder natürlich deine Parade-Disziplin, der Southern Blot, auf dich ist immer Verlass. Danke Bebbly für die vielen Reparaturen im Labor und die Diskussionen über diverse Unterhaltungselektronik-Gadgets, bei denen andere Leute wohl nur den Kopf schütteln können ;-). Danke Benny für Orange Chicken, Chili, Bratwurst- und Sandwich-Einkäufe und danke Theresa für die gute Laune, die du immer im Labor verbreitest (wenn du nicht gerade in Buenos Aires Steak isst).

Ein riesen Dankeschön geht an meine Familie und besonders meine Eltern. Danke dass ihr mich über die gesamte Zeit meiner nicht enden wollenden Lehrjahre immer mit allem unterstützt habt was nötig war und immer bereit standet, wenn ich euch gebraucht habe. Danke auch an Rose für deine Care-Pakete, die mir den Einstieg in so manche Woche versüßt haben.

Und zu guter Letzt, Danke Alex, für die schöne Zeit mit dir und dass du immer für mich da warst. Ich freue mich auf die Zukunft mit dir!