

Charakterisierung des *trans*-Aconitat-Metabolismus
und dessen Regulierung in *Ustilago maydis*

Dissertation

zur

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

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Linda Büttner

aus Westerngrund

Marburg/Lahn 2020

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 07.05.2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Christof Taxis

Tag der mündlichen Prüfung am: 08.06.2020

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden von Oktober 2015 bis November 2019 am Institut für Genetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind in dem folgenden Artikel veröffentlicht:

Büttner, L., Hartmann, S., Wege, SM., Büttner S., Friedrich A., Freitag J., Mühlenhoff U., Bölker, M. Characterization of the *trans*-Aconitate metabolism and its regulation in *Ustilago maydis* (in Vorbereitung)

Zusammenfassung

Die ungesättigte Carbonsäure *trans*-Aconitat ist ein Isomer von *cis*-Aconitat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, welches durch die Aconitase synthetisiert wird. Es ist bekannt, dass *trans*-Aconitat von zuckerhaltigen Pflanzen und auch von Bakterien als Schadstoff produziert wird, da es als Inhibitor der Aconitase und der Fumarase wirkt und daher toxisch sein kann.

In *Ustilago maydis* wurde im Verlauf dieser Arbeit ein Gencluster charakterisiert, der es dem Pilz erlaubt, *trans*-Aconitat als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen und darüber hinaus der Toxizität dieses Metaboliten entgegenwirkt. In diesem Gencluster befinden sich vier gemeinsam regulierte Gene. Zwei codieren für die Transporter, die sich in der Plasmamembran bzw. in den Mitochondrien befinden. Die Charakterisierung von Mutanten und HPLC-Messungen des *trans*-Aconitat Abbaus zeigten, dass der in der Zellmembran befindliche Transporter Aip1 notwendig ist, um *trans*-Aconitat in die Zellen einzuschleusen. Der mitochondriale Transporter Mtt2 ist ebenfalls notwendig für das Wachstum von Zellen auf *trans*-Aconitat als alleiniger Kohlenstoffquelle. Zudem sind in dem Cluster eine Aconitat- Δ -Isomerase Adi2 und ein Transkriptionsfaktor Ram1 codiert. Die Isomerase Adi2 war namensgebend für den Cluster, da sie sehr ähnlich zu der Isomerase Adi1 ist, die für die Itaconsäurebiosynthese in *U. maydis* notwendig ist (Geiser et al., 2016). Adi2 konnte aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Adi1 identifiziert werden (Przybilla, 2014). Genetische Analysen wiederum in Kombination mit HPLC-Messungen zeigten, dass Adi2 für die Isomerisierung von *trans*-Aconitat in *cis*-Aconitat verwendet wird und außerdem notwendig ist, um toxisches *trans*-Aconitat aus dem Cytosol zu entfernen.

Der Transkriptionsfaktor Ram1 gehört zur Familie der Zn(II)₂-Cys₆ Transkriptionsfaktoren und ist für die Regulation des Adi2-Genclusters verantwortlich. Diese Transkriptionsfaktor-Familie ist in der Lage, mithilfe eines binuklearen Zink-Clusters konservierte DNA-Motive zu binden. Für die Bindung von Ram1 in der Promotorregion der einzelnen Clustergene konnte ein DNA-Motiv postuliert werden. Die Aktivierungsdomäne von Ram1 wird durch die Anwesenheit von *trans*-Aconitat stimuliert, wodurch Ram1 nur dann in der Lage ist, die Transkription der Clustergene einzuleiten, wenn *trans*-Aconitat vorhanden ist. Der genaue Mechanismus der Wirkung von *trans*-Aconitat auf den Transkriptionsfaktor konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Experimente mit chimären Transkrip-

tionsfaktoren legen jedoch nahe, dass vermutlich nicht direkt die Bindung an die DNA durch *trans*-Aconitat beeinflusst wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Glucose unabhängig von Ram1 die Expression der Gene des Adi2-Genclusters inhibieren kann.

Abstract

The unsaturated carboxylic acid *trans*-aconitate is an isomer of *cis*-aconitate, an intermediate of the citric acid cycle, which is synthesized by the aconitase. It is known that *trans*-aconitate is produced by plants containing sugar and also by bacteria as a toxic substance, since it acts as an inhibitor of aconitase and fumarase.

In *Ustilago maydis* a gene cluster was characterized in the course of this work which allows the fungus to use *trans*-aconitate as the sole carbon source and also counteracts the toxicity of this metabolite. This gene cluster contains four genes that are regulated together. Two code for transporters that are located in the plasma membrane and in the mitochondria. The characterization of mutants and HPLC measurements of the *trans*-aconitate degradation showed that the transporter Aip1 located in the cell membrane is necessary to import *trans*-aconitate into the cells. The mitochondrial transporter Mtt2 is also necessary for the growth of the cells on *trans*-aconitate as the sole carbon source. In addition an aconitate- Δ -isomerase Adi2 and a transcription factor Ram1 are encoded in the cluster. The isomerase Adi2 gave the cluster its name because it is very similar to the isomerase Adi1, which is necessary for itaconic acid biosynthesis in *U. maydis* (Geiser et al., 2016). Adi2 was identified due to its similarity to Adi1 (Przybilla, 2014). Genetic analyzes in combination with HPLC measurements showed that Adi2 is used for the isomerization of *trans*-aconitate to *cis*-aconitate and is also necessary to remove toxic *trans*-aconitate from the cytosol.

The transcription factor Ram1 belongs to the family of Zn(II)₂-Cys₆ transcription factors and is responsible for the regulation of the Adi2 gene cluster. This family of transcription factors is able to bind conserved DNA motifs using a binuclear zinc cluster. A DNA motif was postulated for the binding of Ram1 to the promoter region of the individual cluster genes. The activation domain of Ram1 is stimulated by the presence of *trans*-aconitate, which means that Ram1 is only able to initiate transcription of the cluster genes when *trans*-aconitate is present. The exact mechanism of the effect of *trans*-aconitate on the transcription factor has not been fully elucidated yet. However, experiments with chimeric transcription factors suggest that binding to DNA is probably not directly influenced by *trans*-aconitate. In addition, it was shown that glucose can inhibit the expression of the genes of the Adi2 gene cluster independently of Ram1.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
Aqua dest	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
cA	<i>cis</i> -Aconitat
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
Cbx	Carboxin
DL	Durchlicht
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Gent	Gentamycin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glucose
HA	Hämagglutinin
Hyg	Hygromycin
ip	iron-sulfur-protein
kb	Kilopasenpaar(e)
kD	Kilodalton
MEL	Mannosylerythritol Lipide
min	Minute(n)
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterninus
Nat	Nourseothricin
OD600	optische Dichte bei 600 nm

ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
Phleo	Phleomycin
R	Resistenz
SDS	sodium dodecyl sulfate
tA	<i>trans</i> -Aconitat
Tab.	Tabelle
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UA	Ustilaginsäuren
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Δ	Deletion

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	2
1.1 <i>Ustilago maydis</i>	2
1.1.1 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	2
1.1.2 <i>U. maydis</i> als Modellorganismus	3
1.2 Sekundärmetabolismus	4
1.2.1 Gencluster	4
1.2.2 Sekundärmetaboliten aus <i>U. maydis</i>	5
1.2.3 Der Adi2-Gencluster in <i>U. maydis</i>	7
1.3 Ziele dieser Arbeit	10
2 Ergebnisse	11
2.1 Charakterisierung eines Genclusters, der für die Aufnahme und Verstoff- wechslung von <i>trans</i> -Aconitat zuständig ist	11
2.1.1 Analyse der Gene des Adi2-Genclusters	11
2.1.2 Das Aconitat-Importprotein Aip1 lokalisiert in der Plasmamembran von <i>U. maydis</i>	13
2.1.3 Aip1 ist der Transporter für die Aufnahme von <i>trans</i> -Aconitat . . .	14
2.1.4 Mtt2 lokalisiert in den Mitochondrien	19
2.1.5 Die Aufnahme von <i>trans</i> -Aconitat ist durch eine Deletion von <i>mtt2</i> reduziert	19
2.1.6 <i>Trans</i> -Aconitat wirkt bereits im Cytosol toxisch	21
2.1.7 Modell des <i>trans</i> -Aconitat Metabolismus in <i>U. maydis</i>	22
2.2 Regulation des Adi2-Genclusters	23
2.2.1 Der „Regulator des Aconitat-Metabolismus“ Ram1	23
2.2.2 Ram1 lokalisiert im Zellkern von <i>U. maydis</i>	24
2.2.3 Ram1 wird für die Aufnahme von <i>trans</i> -Aconitat benötigt	25

2.2.4	Das Volllängenprotein von Ram1 ist notwendig für den <i>trans</i> -Aconitat Metabolismus	27
2.2.5	Die Überexpression von <i>ram1</i> ist nicht ausreichend, um die Adi2-Clustergene zu exprimieren	29
2.2.6	<i>Trans</i> -Aconitat aktiviert die AD am C-Terminus von Ram1	31
2.2.7	Die Region zwischen 800 und 600 Basenpaaren vor dem ORF von <i>aip1</i> ist notwendig für eine Erkennung durch Ram1	34
3	Diskussion	36
3.1	Charakterisierung eines Genclusters, der für die Aufnahme und Verstoffwechslung von <i>trans</i> -Aconitat zuständig ist	36
3.1.1	Der Abbau von <i>trans</i> -Aconitat benötigt in <i>U. maydis</i> drei Proteine	36
3.1.2	Die biologische Funktion des Adi2-Genclusters	37
3.1.3	Warum wirkt <i>trans</i> -Aconitat toxisch?	38
3.1.4	Evolution des Adi2-Genclusters	39
3.2	Regulierung des <i>trans</i> -Aconitat Metabolismus durch Ram1 und <i>trans</i> -Aconitat	41
3.2.1	Ram1 ist ein Zn(II) ₂ -Cys ₆ Transkriptionsfaktor	41
3.2.2	Regulation von Ram1	43
4	Material und Methoden	47
4.1	Materialien mit Bezugsquellen	47
4.1.1	Allgemeine Materialien	47
4.1.2	Kits	48
4.1.3	Chemikalien	48
4.1.4	Antikörper und Enzyme	48
4.1.5	Puffer und Lösungen	48
4.1.6	Geräte	49
4.2	Kultivierung von Mikroorganismen	49
4.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	49
4.2.2	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	50
4.2.3	Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Kulturen	51
4.3	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	52
4.3.1	<i>Escherichia coli</i> - Stämme	52
4.3.2	<i>Ustilago maydis</i> - Stämme	52
4.3.3	Plasmide	55
4.4	Mikrobiologische Methoden	62
4.4.1	Transformation von <i>E. coli</i>	62
4.4.2	Transformation von <i>U. maydis</i>	62

4.4.3	Wachstumstests auf Festmedium	64
4.5	Genetische Methoden	64
4.5.1	Deletion von Genen oder Genfragmenten mittels homologer Rekombination	64
4.5.2	Integration von Konstrukten in den <i>ip</i> -Locus von <i>U. maydis</i>	64
4.6	Molekularbiologische Techniken	65
4.6.1	Restriktion und Dephosphorylierung von DNA	65
4.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten	65
4.6.3	Gibson-Assembly von DNA-Fragmenten	65
4.6.4	DNA-Sequenzierung	66
4.6.5	Agarose-Gelelektrophorese	66
4.6.6	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	67
4.6.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	68
4.6.8	Isolierung von genomischer DNA aus <i>U. maydis</i>	69
4.6.9	Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)	69
4.7	Biochemische Methoden	70
4.7.1	Isolierung von denaturierten Proteinen aus <i>U. maydis</i>	70
4.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	71
4.7.3	Elektrophorese von Proteinen	71
4.7.4	Transfer und Nachweis von Proteinen (Western Blot)	72
4.7.5	Isolierung von Glykolipiden aus <i>U. maydis</i>	73
4.7.6	Auftrennung und Nachweis der Glykolipide mit Dünnschichtchromatographie (DC)	73
4.7.7	Analyse von Substratveränderungen im Überstand von <i>U. maydis</i> -Kulturen durch <i>High-Pressure-Liquid-Chromatography</i> (HPLC)	74
4.8	Mikroskopie	74
4.9	Bioinformatik	75
	Literaturverzeichnis	76
	Danksagung	86
	Erklärung	88

Tabellenverzeichnis

2.1	Analyse der Clustergene	13
4.1	<i>Verwendete U. maydis</i> -Stämme	52
4.2	Verwendete Plasmide	55

Abbildungsverzeichnis

1.1	Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	3
1.2	Übersicht der von <i>U. maydis</i> produzierten Sekundärmetabolite	6
1.3	Der potentielle Adi2-Gencluster	7
1.4	Adi2 ist eine Aconitat- Δ -Isomerase	8
1.5	Die Gene des Adi2-Genclusters werden für das Wachstum auf <i>trans</i> -Aconitat benötigt	9
2.1	Vergleich des Adi2-Gencluster in <i>U. maydis</i> mit verwandten Pilzen	12
2.2	Aip1-GFP ist funktionell	14
2.3	Lokalisierung von Aip1 in der Plasmamembran	15
2.4	Aip1 transportiert spezifisch <i>trans</i> -Aconitat	16
2.5	Eine Deletion von <i>aip1</i> kann die Sensitivität von Δ <i>adi2</i> Mutanten gegenüber <i>trans</i> -Aconitat unterdrücken	17
2.6	Aip1 ist das einzige <i>trans</i> -Aconitat Importprotein in <i>U. maydis</i>	18
2.7	Mtt2 lokalisiert in den Mitochondrien von <i>U. maydis</i>	19
2.8	Die Aufnahme von <i>trans</i> -Aconitat ist durch Deletion von <i>mtt2</i> reduziert; bei der Δ <i>mtt2</i> Δ <i>adi2</i> Mutante sind keine Veränderungen der Substratkonzentrationen zu beobachten	20
2.9	Die Deletion von <i>mtt2</i> kann den Phänotyp von Δ <i>adi2</i> nicht unterdrücken .	21
2.10	Modell des <i>trans</i> -Aconitat Metabolismus in <i>U. maydis</i>	22
2.11	Schematische Darstellung von Ram1	23
2.12	Ram1 lokalisiert im Nucleus von <i>U. maydis</i>	25
2.13	Ram1 wird für die Aufnahme von <i>trans</i> -Aconitat benötigt	26
2.14	Schematische Darstellung der Verkürzungen des Transkriptionsfaktors Ram1	27
2.15	Das Volllängenprotein von Ram1 wird für das Wachstum auf <i>trans</i> -Aconitat benötigt	28
2.16	Die Expression von Ram1 hängt von der Anwesenheit von <i>trans</i> -Aconitat ab	29
2.17	Die Überexpression von <i>ram1</i> ist nicht ausreichend für die Expression von Aip1	30
2.18	Schematische Darstellung der Ram1-Rua1-Hybrid-Transkriptionsfaktoren und deren Expression	31

2.19	Hybrid-TF1 ist nicht funktional	32
2.20	<i>Trans</i> -Aconitat aktiviert die Aktivierungsdomäne von Ram1	33
2.21	Eingrenzung der DNA-Bindedomäne von Ram1	34
2.22	Potentielle DNA-Bindemotive für Ram1	35
3.1	Modell des <i>trans</i> -Aconitat Biosyntheseweges in <i>B. thuringiensis</i>	40
3.2	Modell des GAL4 Proteins als Beispiel für ein Zn(II) ₂ -Cys ₆ binukläres Cluster Protein	42
3.3	Modell für die DNA-Bindung von C6 Zinkcluster-Proteinen	44
3.4	<i>trans</i> -Aconitat beeinflusst die Modifikation von Ram1	45

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*

Ustilago maydis ist ein phytopathogener Pilz, der innerhalb der Abteilung der Basidiomycota zur Ordnung der *Ustilaginales* (Brandpilze) gehört. *U. maydis* ist ausschließlich in der Lage Maispflanzen und dessen Wildform Teosinte an allen oberirdischen Teilen der Pflanze zu infizieren.

1.1.1 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

U. maydis besitzt einen dimorphen Lebenszyklus und wechselt zwischen einem nichtpathogenen haploiden und einem pathogenen diploiden Stadium. In der haploiden Form lebt *U. maydis* saprophytisch und vermehrt sich vegetativ durch bipolare Knospung. Um eine pathogene Form anzunehmen, muss ein dikaryotisches Filament ausgebildet werden, was durch die Paarung von zwei kompatiblen, haploiden Sporidien mit unterschiedlichem Paarungstyp möglich wird (siehe Abb. 1.1). Diese erkennen sich auf der Pflanzenoberfläche mithilfe eines Pheromon-Rezeptorsystems, was zum Zellzyklusarrest und zur Ausbildung von Konjugationshyphen führt. Diese Hyphen orientieren sich entlang des Pheromongradienten und wachsen aufeinander zu (Bölker et al., 1992; Snetselaar et al., 1996). Nach der Fusion an der Spitze entsteht eine dikaryotische Infektionshyphale, die sich durch apikales Spitzenwachstum verlängert (Banuett and Herskowitz, 2002) und durch Ausbilden eines Appressoriums in die Pflanze eindringt und die Ausbildung von tumorartigen Gallen induziert. In diesen erfolgt eine Karyogamie und die Hyphen differenzieren sich zu stark pigmentierten diploiden Teliosporen, die aus den reifen Tumoren freigesetzt und anschließend durch Wind und Regen verbreitet werden (Banuett and Herskowitz, 1994, 1996). Die Teliospore stellt die Dauerform von *U. maydis* dar und kann unter geeigneten Bedingungen wieder auskeimen und durch Meiose vegetativ wachsende, haploide Sporen bilden.

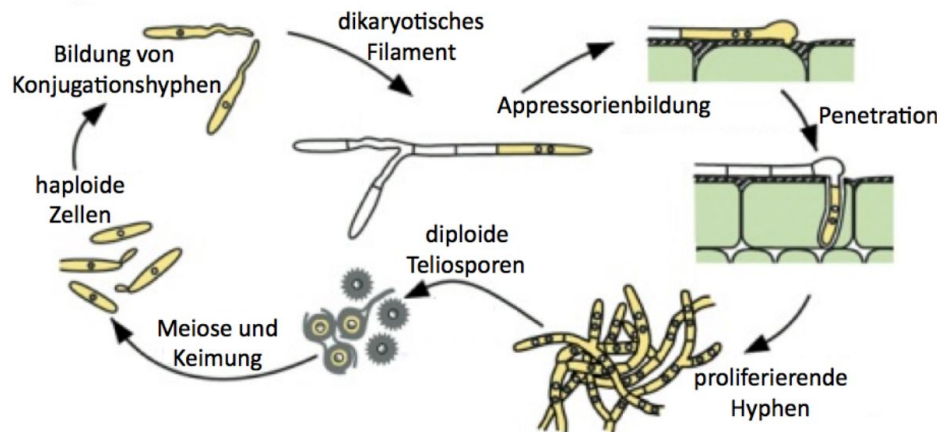


Abbildung 1.1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Der Lebenszyklus von *U. maydis* lässt sich in ein haploides, ein dikaryotisches und ein diploides Stadium einteilen. Sporidien mit unterschiedlichem Paarungstyp sind in der Lage, miteinander zu fusionieren und dikaryotische Filamente zu bilden. Diese Form von *U. maydis* ist pathogen. Nach Penetration der Pflanzenepidermis mithilfe von Appressorien kommt es zur Proliferation der Hyphenzellen und zur Induktion von tumorartigen Gallen. Innerhalb dieser Gallen erfolgt die Proliferation und die Bildung von diploiden Teliosporen, welche, nach Aufplatzen der Gallen, durch Wind und Regen verteilt werden. Unter geeigneten Bedingungen können diese wieder zu haploiden Sporidien auskeimen. (nach(Kämper et al., 2006)).

1.1.2 *U. maydis* als Modellorganismus

Nicht nur für Untersuchungen hinsichtlich der pathogenen Entwicklung mit seiner Wirtspflanze, sondern auch zur Erforschung grundlegender biologischer Fragestellungen eignet sich *U. maydis* besonders gut. Da die Genomsequenz von *U. maydis* vollständig bekannt ist (Kämper et al., 2006), können moderne Methoden der Transkriptom- und Proteom-Analyse durchgeführt werden (Steinberg and Perez-Martin, 2008). Wegen der leichten Kultivierbarkeit des haploiden Stadiums, mit einer Verdopplungszeit von nur zwei Stunden und aufgrund der Zugänglichkeit für genetische Manipulation hat sich *U. maydis* als Modellorganismus etabliert. In den letzten Jahren wurde *U. maydis* vor allem für die Untersuchung der Zellpolarität und der Morphogenese, aber auch für die Charakterisierung der Biosynthesewege von verschiedenen Sekundärmetaboliten etabliert. *U. maydis* ist wie viele andere Pilze in der Lage, verschiedene Sekundärmetaboliten zu produzieren (Bölker et al., 2008). Bisher konnten drei Gencluster charakterisiert werden, die für Enzyme codieren, welche für die Synthese von Varianten der beiden Glykolipide Ustilaginsäure (UA) und Mannosylerythritollipid (MEL) und für die Synthese der Dicarbonsäure Itaconsäure (IA) verantwortlich sind (Hewald, 2005; Hewald et al., 2006; Przybilla, 2014; Teichmann et al., 2007).

1.2 Sekundärmetabolismus

Mikroorganismen sind in der Lage, unter bestimmten Bedingungen Sekundärmetabolite zu produzieren. Dabei handelt es sich um strukturell variable Stoffe mit meist geringem Molekulargewicht, die im Gegensatz zu Primärmetaboliten nicht essentiell für das Überleben bzw. das Wachstum der Organismen sind. Trotzdem kann die Produktion von Sekundärmetaboliten, besonders in Abhängigkeit von der Umwelt, von großem Vorteil für den produzierenden Organismus sein, da diese Stoffe bioaktiv sind und beispielsweise als Antibiotikum wirken. Sekundärmetaboliten werden daher auch häufig nur zu bestimmten Zeiten des Lebenszyklus produziert. Sie verschaffen dem Produzenten dabei einen Selektionsvorteil, indem sie z.B. seine Konkurrenzfähigkeit erhöhen oder den Organismus resistenter gegen Umweltstressfaktoren machen (Hoffmeister and Keller, 2007; Keller et al., 2005).

Beispiele für Sekundärmetaboliten sind Antibiotika (Penicillin, Streptomycin), amphipatische Biodetergenzien und Alkaloide (Codein, Morphin), aber auch chemische Botenstoffe, welche zur Kommunikation dienen (Desai and Banat, 1997; Yim et al., 2007).

1.2.1 Gencluster

In Prokaryoten sind Gene für zusammengehörige Stoffwechselwege häufig als Operons angeordnet (Omelchenko et al., 2003). In filamentösen Pilzen dagegen sind Gene, die für die Synthese von Metaboliten kodieren, verteilt im Genom zu finden. Gene, die jedoch an der Synthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sind, sind häufig in sogenannten Genclustern angeordnet. Die Entstehung solcher Gencluster könnte in horizontalem Gentransfer begründet sein. Dies wird als wichtiger Evolutionsprozess bei Prokaryoten bzw. Pilzen angesehen (Walton, 2000).

Das Grundgerüst vieler Sekundärmetaboliten wird von einem oder mehreren Enzymen gebildet, die essentiell für die Synthese des Moleküls sind. Dabei handelt es sich in vielen Genclustern um Gene, die für Polyketid-Synthasen (PKS) oder nicht ribosomale Peptid-Synthasen (NRPS) kodieren. Zusätzlich können Gene für Proteine, die die Kernstruktur des jeweiligen Enzyms weiter modifizieren oder den Transport der Metaboliten bzw. die Expression der Clustergene kontrollieren, in einem Gencluster vorkommen. Pilzliche Sekundärmetabolit-Gencluster werden von einem komplexen regulatorischen Netzwerk kontrolliert, welches viele Proteine und Proteinkomplexe beinhaltet, die auf bestimmte Umweltveränderungen reagieren. Diese sind meist Änderungen von Umwelteinflüssen wie z.B. Kohlen- oder Stickstoffquelle und pH-Wert (Drew and Wallis, 1983; Tilburn et al., 1995). Die Regulation der Gencluster erfolgt auf verschiedenen Ebenen und bildet ein komplexes Netzwerk aus globalen und spezifischen regulatorischen Proteinen. Globale

Regulation wird durch global wirkende Transkriptionsfaktoren erreicht, die von Genen kodiert werden, die keinem Gencluster angehören und die verschiedene Gene regulieren, die nicht im Sekundärmetabolismus beteiligt sind. So reguliert beispielsweise Nit1, ein Transkriptionsfaktor der Cys₂His₂ Zinkfingerfamilie, die Produktion von Glykolipiden in *U. maydis*. Nach Ausschalten des Gens kommt es zum Ausbleiben der Glykolipidproduktion, wobei Nit1 kein Teil des jeweiligen Genclusters ist (Liu, 2007). Die Gencluster befinden sich am Ende der Signalkaskade dieses Netzwerks und werden häufig zusätzlich durch einen spezifischen Transkriptionsfaktor reguliert, der meist von einem Gen codiert wird, das sich in direkter Nachbarschaft zu dem Gencluster oder sogar in diesem Gencluster befindet (Brakhage, 2013; Keller et al., 2005).

1.2.2 Sekundärmetaboliten aus *U. maydis*

Schon seit den 1950er Jahren ist bekannt, dass *U. maydis* vor allem unter Stickstoffmangelbedingungen eine Reihe interessanter Sekundärmetabolite produziert (Haskins, 1950). Zu diesen Sekundärmetaboliten gehören Glycolipide, wie Mannositolerythritollipide (MELs) und die Ustilaginsäure (UA), aber auch organische Säuren, wie die Itaconsäure (siehe Abb. 1.2), deren Produktion durch *U. maydis* erstmals 1955 beobachtet werden konnte (Haskins et al., 1955). Das extrazelluläre Glykolipid UA hat eine antibiotische Wirkung gegenüber pro- und eukaryotischen Mikroorganismen. Der Biosyntheseweg für UA wurde bereits aufgeklärt. Alle Gene, die an der Biosynthese dieses Cellobioselipids beteiligt sind, liegen in einem Gencluster angeordnet, welches von dem Transkriptionsfaktor Rua1 (regulator of ustilagic acid biosynthesis) reguliert wird (Teichmann et al., 2007). Rua1 gehört zur Cys₂His₂ Zinkfingerfamilie und kann über die C-terminal gelegene Zinkfingerdomäne an ein konserviertes DNA-Motiv auf der Promotorregion der einzelnen Clustergene binden und somit die Transkription aktivieren (Teichmann et al., 2010).

Die Itaconsäure (IA, auch Methylenbernsteinsäure) ist eine einfach ungesättigte organische Dicarbonsäure, welche erstmals 1837 von S. Baup als Thermolyseprodukt der Zitronensäure beschrieben wurde (Baup, 1837). Die Itaconsäure findet heutzutage vor allem als Monomer oder Co-Monomer Verwendung in der Kunststoffindustrie, beispielsweise bei der Herstellung von Farben, Lacken oder Klebstoffen, synthetischen Fasern und Kunstglas, mit dem Ziel die Verwendung von Acryl- oder Methacrylsäure zu vermeiden (Kin et al., 1998). Im Jahr 1932 wurde die Biosynthese der Itaconsäure erstmals in Kulturen von *Aspergillus itaconicus* nachgewiesen (Kinoshita, 1932). Heute wird die Itaconsäure industriell durch die Fermentation von *Aspergillus terreus* mit einer Produktionsrate von etwa 80 g/L erzeugt (Willke and Vorlop, 2001). Neben *A. terreus* wurden weitere natürliche IA-Produzenten entdeckt, zu denen *Candida spec.* (Tabuchi et al., 1981), *Pseudozyma antarctica* (Levinson et al., 2006) und auch *U. maydis* zählen (Haskins et al., 1955).

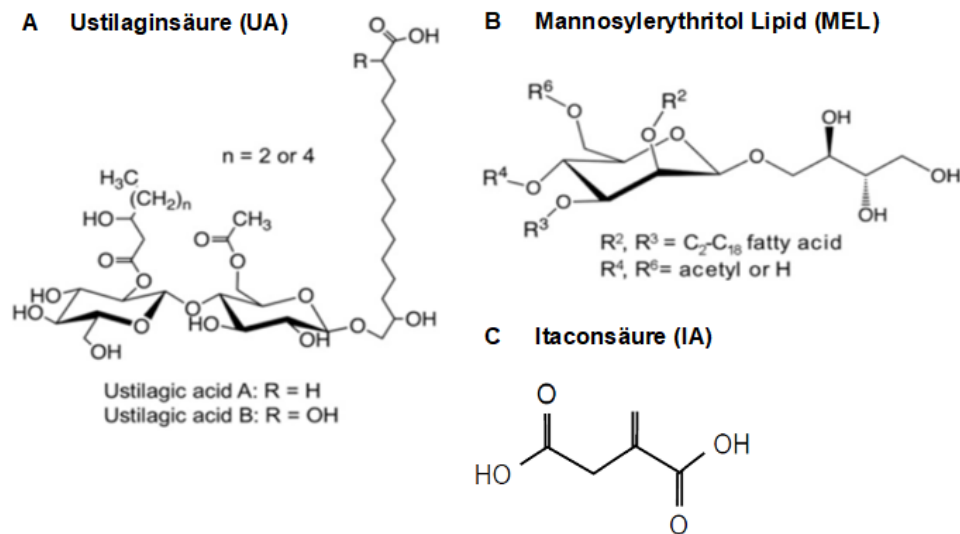


Abbildung 1.2: Übersicht der von *U. maydis* produzierten Sekundärmetabolite

U. maydis ist in der Lage, unter bestimmten Bedingungen verschiedene Sekundärmetabolite zu produzieren.

A Die Ustilaginsäure ist ein Cellobiose-Lipid und hat antibiotische Eigenschaften. **B** MELs haben amphipathische Eigenschaften und finden als oberflächenaktive Stoffe Verwendung. **C** Die Itaconsäure ist ein vergleichsweise kleiner Sekundärmetabolit und wird unter Stickstoffmangel produziert. Der Biosyntheseweg konnte kürzlich charakterisiert werden (Przybilla, 2014). Verändert nach (Bölker et al., 2008).

Auch der Itaconsäure-Biosyntheseweg in *U. maydis* konnte bereits aufgeklärt werden (Przybilla, 2014). Die Biosynthese von Itaconat erfolgt in zwei Schritten, ausgehend von *cis*-Aconitat aus dem Zitronensäurezyklus. Im ersten Schritt katalysiert die Aconitat- Δ -Isomerase Adi1 (Um11778) die Umwandlung von *cis*-Aconitat zu *trans*-Aconitat. Dieses Enzym hat Ähnlichkeit zu der Familie der PrpF-Proteine, die beispielsweise in *Shewanella oneidensis* die *cis-trans*-Isomerisierung von Methylaconitat im Propionat-Abbauweg katalysieren (Garvey et al., 2007). Den zweiten Schritt im Biosyntheseweg katalysiert die *trans*-Aconitat-Decarboxylase Tad1 (Um05076) durch Decarboxylierung von *trans*-Aconitat zu Itaconat. Tad1 hat Ähnlichkeit zu einem 3-carboxy-*cis*, *cis*-Muconat-lactonisierendem Enzym (CMLE), das im Abbau von aromatischen Verbindungen zu finden ist. Mit Hilfe von Deletions- bzw. Überexpressions-Analysen benachbarter Gene, konnte schließlich ein Gencluster abgegrenzt werden, der alle für die Itaconsäure-Biosynthese benötigten Gene enthält und am Ende von Chromosom 4 lokalisiert ist. Neben *adi1* und *tad1* enthält der Gencluster den für die Itaconsäurebiosynthese essentiellen Transkriptionsfaktor Ria1 (*um05080*) und außerdem zwei Gene, die für Transportproteine codieren. Dazu gehört der mitochondrielle Transporter Mtt1 (*um05079*), der vermutlich das im Citratzyklus gebildete Intermediat *cis*-Aconitat aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert. Dort dient es als Substrat für Adi1, das die Isomerisierung von *cis*-Aconitat zu *trans*-Aconitat katalysiert. Anschließend wird das *trans*-Aconitat durch Tad1 zu Itaconat decarboxyliert

und durch Itp1 (Um11777), das zur *Major facilitator superfamily* gehört, aus der Zelle exportiert.

Aconitat liegt während der IA-Produktion in unterschiedlicher Form im Cytosol vor. Aconitsäure, dessen Salze Aconitate genannt werden, ist eine ungesättigte organische Verbindung mit drei Carbonsäurefunktionen und liegt in den beiden Isomeren *cis*- und *trans*-Aconitat vor. Beide Formen befinden sich in einem chemischen Gleichgewicht, welches mit ca. 88 % stark auf der Seite von *trans*-Aconitat liegt. Die Isomerisierung wird durch Adi1 katalysiert (Przybilla, 2014). Während es sich bei *cis*-Aconitat um ein Zwischenprodukt des Citratzyklus handelt, das bei der Umsetzung von Citrat zu Isocitrat durch die Aconitase entsteht, handelt es sich bei *trans*-Aconitat um die stabilere Isoform, da sich die beiden Carboxylgruppen weniger behindern (Ambler and Roberts, 1948). *Trans*-Aconitat ist ein effektiver Inhibitor der Aconitase (Lauble et al., 1994) und der Fumarase (Rehholz and Northrop, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass *trans*-Aconitat z.B. in Gras ein effizienter Antifraßstoff gegen braune Heuschrecken ist (Kim et al., 1976) und eine Akkumulation von mehr als 1 % *trans*-Aconitat im Futter von Wiederkäuern das Weidefieber auslöst, welches oft tödlich endet (Bohman et al., 1969).

1.2.3 Der Adi2-Gencluster in *U. maydis*

Neben der Aconitat- Δ -Isomerase Adi1, konnten in *U. maydis* noch zwei weitere Proteine identifiziert werden, die eine hohe Ähnlichkeit zur Familie der PrpF-Enzyme haben. Während es sich bei *um06058* vermutlich um ein einzelnes Gen handelt, ist *um02807* Teil eines Gencluster, der sich auf Chromosom 6 befindet (siehe Abb. 1.3).

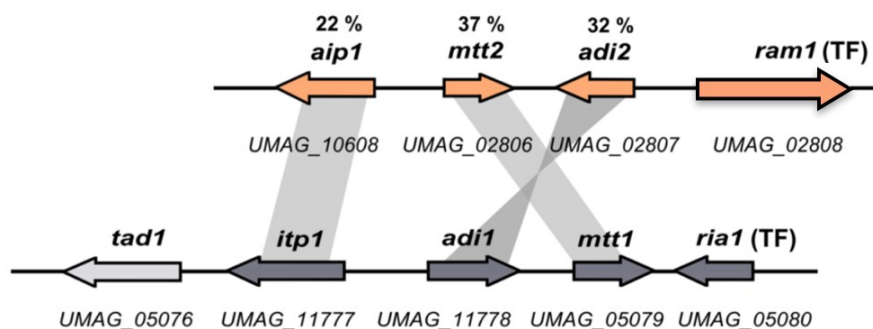


Abbildung 1.3: Der potentielle Adi2-Gencluster

Gezeigt ist die Anordnung der Gene des potentiellen Adi2-Genclusters im Vergleich zum Itaconsäure-Gencluster in *U. maydis*. Neben *adi2* (*um20807*) enthält dieser noch ein Gen für einen möglichen Transporter (*um10608*) mit Ähnlichkeit zu Quinatpermeasen, ein Gen für einen mitochondrialen Transporter (*um02806*), sowie ein Gen für einen transkriptionellen Regulator (*um02808*). Die Prozentzahlen zeigen die Identität des Proteins zum jeweiligen Protein im IA-Genclusters an (BLAST) (Przybilla, 2014).

Der Adi2-Gencluster ist im Vergleich zum IA-Gencluster deutlich kleiner, es fallen je-

doch einige Gemeinsamkeiten auf. Auch in diesem Gencluster befinden sich Gene für ein Transportprotein der MFS-Familie (Aip1, *um010608*), einen mitochondrialen Transporter (Mtt2, *um02806*), einen Transkriptionsfaktor (Ram1, *um02808*), sowie für das PrpF-ähnliche Protein (Adi2, *um02807*). Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von Adi2 haben gezeigt, dass es genau wie Adi1 in der Lage ist, sowohl *cis*- als auch *trans*-Aconitat zu isomerisieren, wobei ein chemisches Gleichgewicht entsteht, das wiederum deutlich auf der Seite des *trans*-Aconitats liegt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Adi2 die Funktion von Adi1 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* vollständig übernehmen kann (siehe Abb. 1.4 Przybilla (2014)).

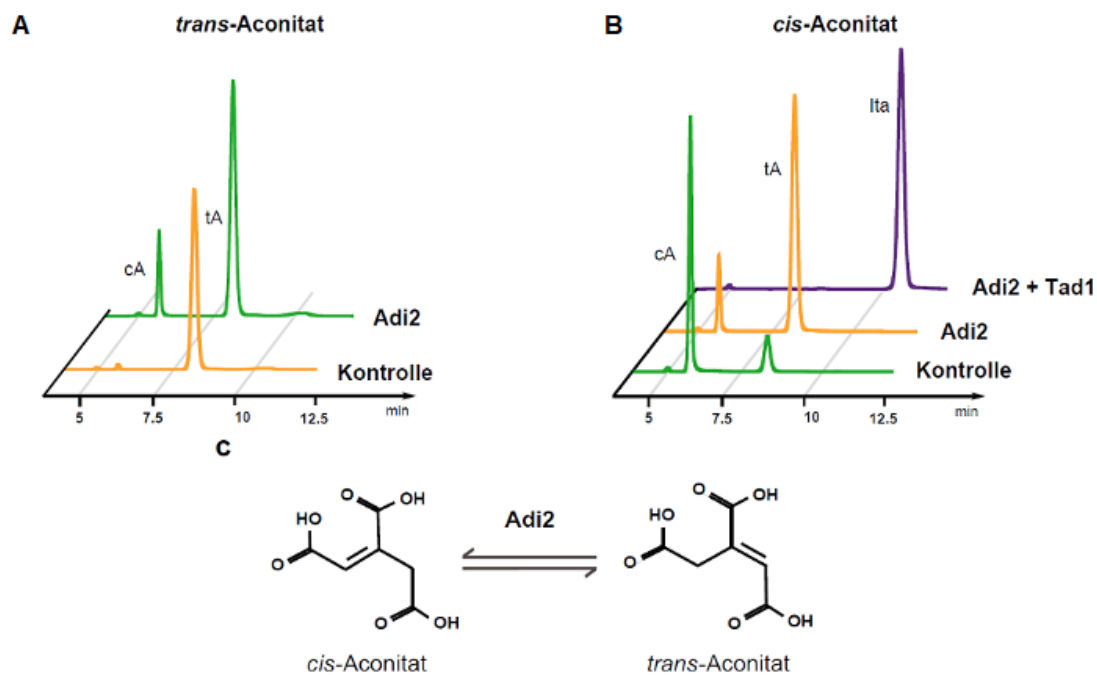


Abbildung 1.4: Adi2 ist eine Aconitat- Δ -Isomerase

A Dargestellt ist eine Zusammenfassung der HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von Adi2 mit *trans*-Aconitat. Adi2 ist in der Lage dieses Substrat in *cis*-Aconitat zu isomerisieren. **B** Außerdem ist Adi2 auch in der Lage, die Isomerisierung von *cis*-Aconitat zu *trans*-Aconitat zu katalysieren. Nach Inkubation von *cis*-Aconitat mit Adi2 und Tad1 wurde dieses durch die katalytische Aktivität der beiden Enzyme zu Itaconat umgewandelt. **c** Schematische Darstellung der enzymatischen Aktivität von Adi2. Auch Adi2 katalysiert die Isomerisierung von *cis*-Aconitat zu *trans*-Aconitat in beide Richtungen (Przybilla, 2014).

Wachstumstests, in denen *cis*- bzw. *trans*-Aconitat als Kohlenstoffquelle verwendet wurden, haben gezeigt, dass der Adi2-Gencluster, für die Verstoffwechslung von *trans*-Aconitat benötigt wird. Hierbei scheint die Aconitat- Δ -Isomerase essentiell zu sein (siehe Abb. 1.5). In *Pseudomonas*-Spezies, welche eine Aconitat-Isomerase besitzen, konnte bereits 1961 die Nutzung von *trans*-Aconitat als alleiniger Kohlenstoffquelle nachgewiesen werden (Rao and Altekar, 1961). Ferner haben die Wachstumstests von Deletionsmutanten gezeigt, dass eine Deletion von *adi2* bereits auf *trans*-Aconitat in Anwesenheit von Glucose

im Vergleich zum Wildtyp zu einer starken Wachstumsbeeinträchtigung führt (Przybilla, 2014), was auf eine toxische Wirkung von *trans*-Aconitat auf *U. maydis* hindeutet. Obwohl *trans*-Aconitat in großen Mengen auch in Pflanzenmaterial vorhanden ist (Bureau and Stout, 1965; MacLennan and Beever, 1964), hatte eine Deletion des *Adi2*-Genclusters keinen Effekt auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis* (Przybilla, 2014). Auch eine *adi1 adi2* Doppelmutante hatte keinen Einfluss auf den pathogenen Phänotyp (persönliche Mitteilung, Sandra Przybilla).

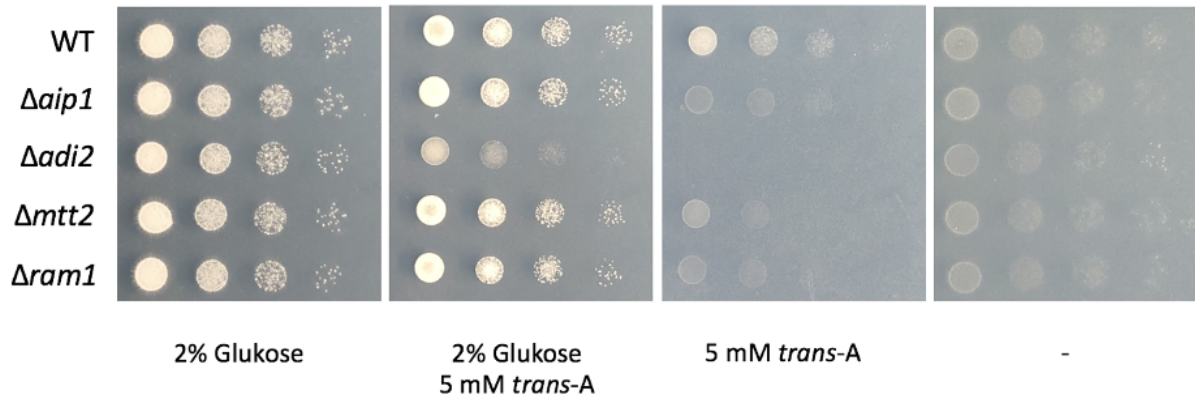


Abbildung 1.5: Die Gene des *Adi2*-Genclusters werden für das Wachstum auf *trans*-Aconitat benötigt

Zu sehen ist ein Wachstumstest der Deletionsmutanten des *Adi2*-Genclusters auf *trans*-Aconitat. Während der Wildtyp *trans*-Aconitat als Kohlenstoffquelle nutzen kann, sind alle Einzel-Deletionsmutanten in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Eine Deletion von *adi2* scheint für *U. maydis* toxisch zu sein (nach Przybilla (2014)).

1.3 Ziele dieser Arbeit

Da als Funktion des *Adi2*-Genclusters die Verstoffwechslung von externem Aconitat vermutet wurde, sollte die Funktion und die Regulation der Gene des Genclusters genauer analysiert werden. Dabei sollte insbesondere die Rolle der beiden Transporter *Aip1* und *Mtt2* untersucht werden. Außerdem war die Charakterisierung des im Cluster kodierten Transkriptionsfaktors *Ram1* ein Fokus dieser Arbeit.

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung eines Genclusters, der für die Aufnahme und Verstoffwechslung von *trans*-Aconitat zuständig ist

In Genclustern codierte Enzyme aus Pilzen sind neben der Synthese von ungewöhnlichen Metaboliten auch am Abbau bzw. der Verstoffwechslung verschiedener Moleküle beteiligt (Keller and Hohn, 1997). Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Entdeckung eines Genclusters im Telomerbereich von Chromosom 6, der aus 4 Genen besteht (siehe Abb. 1.3). Dieser Gencluster besitzt ein Gen für eine Aconitat- Δ -Isomerase (*um02807*), zwei Gene, die für potentielle Transporter codieren (*um10608* und *um02806*) und ein Gen, welches für einen Transkriptionsfaktor (*um02808*) codiert. Aufgrund des Vorhandenseins einer funktionellen Aconitat- Δ -Isomerase (siehe Abb. 1.4), wird der Cluster im Folgenden als Adi2-Gencluster bezeichnet.

Mithilfe von Wachstumstests auf Agaroseplatten mit *cis*- und *trans*-Aconitat, sowohl in Verbindung mit Glucose, als auch als alleinige Kohlenstoffquelle, konnte die generelle Funktion des Adi2-Genclusters in vorherigen Experimenten bereits charakterisiert werden. Es bestand die Vermutung, dass die im Adi2-Gencluster codierten Proteine eine Funktion bei der Aufnahme und Verstoffwechslung von Aconitat haben, damit dieses Molekül als ungewöhnliche Kohlenstoffquelle verwertet werden kann (Przybilla, 2014). Ziel dieser Arbeit war die detaillierte Aufklärung der Funktion des Adi2-Genclusters und seine Regulation.

2.1.1 Analyse der Gene des Adi2-Genclusters

Trotz der Ähnlichkeit des Adi2-Genclusters zum IA-Gencluster sind die Funktion und die Verbreitung der beiden Gencluster unterschiedlich. Im Gegensatz zum IA-Gencluster konnten Homologe der Gene des Adi2-Genclusters in anderen, verwandten Pilzen wie beispielsweise in *Sporisorium reilianum* und *Pseudozyma hubeiensis* identifiziert werden. Auch die Struktur als Gencluster ist in den drei Pilzen konserviert (siehe Abb. 2.1).

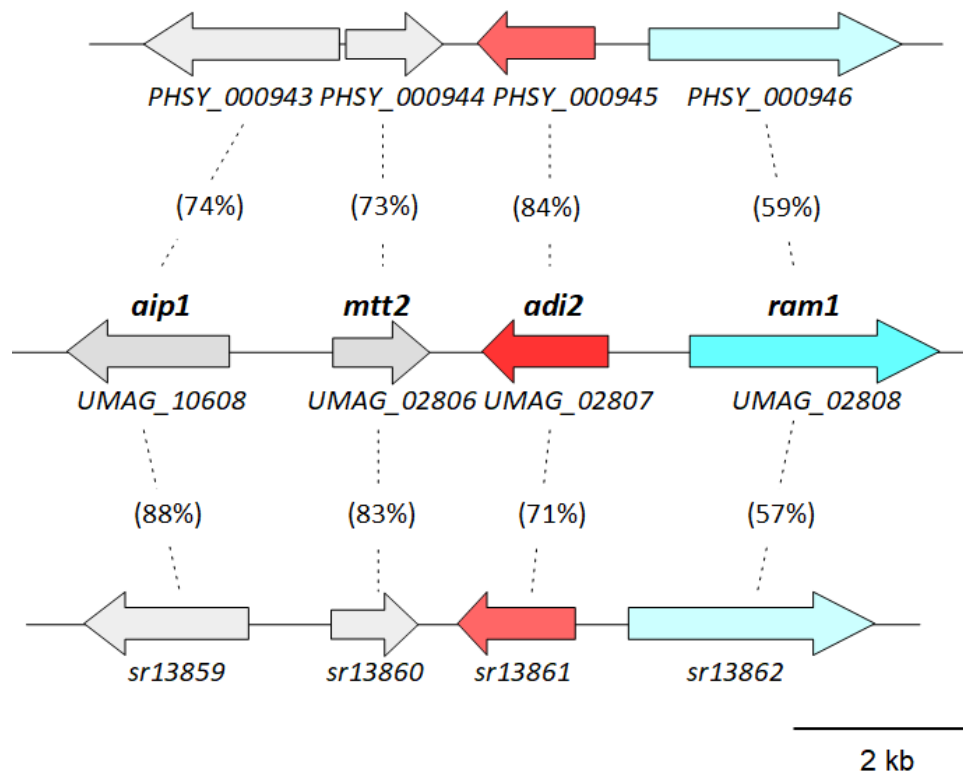


Abbildung 2.1: Vergleich des Adi2-Genclusters in *U. maydis* mit verwandten Pilzen

Dargestellt ist die Anordnung der Gene des Adi2-Genclusters im Genom von *U. maydis* im direkten Vergleich zu dem entsprechenden Gencluster in *P. hubeiensis* und *S. reilianum*. Die Sequenzidentität auf Aminosäureebene zwischen den Genclustern ist angegeben. Putative Transporter sind grau markiert, Enzyme sind in rot und Transkriptionsfaktoren in blau dargestellt.

Die codierten Proteine des Adi2-Genclusters zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu zuvor charakterisierten Proteinen. Das Gen *um10608* (*aip1*) codiert für ein Protein mit einer konservierten MFS Domäne und lässt sich in die Major Facilitator Superfamily (MFS) einteilen, einer großen Gruppe von Transportern, die den Transport von Substraten durch Membranen vereinfachen (Pao et al., 1998). Zu dieser Familie zählt auch das mit einer Permease für Chinasäure (*quinat* permease) verwandte Protein Sr13859 aus *S. reilianum*, welches eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Aip1 aufweist (siehe Tab. 2.1). Transportproteine, die Chinasäure importieren (Wheeler and Hawkins, 1996), werden beispielsweise in *Aspergillus nidulans* dazu benötigt, Chinasäure als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen zu können (Whittington et al., 1987). Das Gen *aip1* besitzt eine gemeinsame Promotorregion mit *mtt2* (*um02806*), welches für ein weiteres Transportprotein codiert (siehe Abb. 1.5). Mtt2 hat eine hohe Sequenzähnlichkeit zu CTP1 (Sr13860), einem putativen mitochondrialen Citrat-Transporter aus *S. reilianum*. Die Aconitat- Δ -Isomerase Adi2 (Um02808), die der PrpF-Familie zuzurechnen ist, lokalisiert im Cytosol (Friedrich, 2013). Dort könnte Adi2 *trans*-Aconitat zu *cis*-Aconitat isomerisieren. Ein noch nicht charakterisiertes Gen

(sr13861) mit hoher Sequenzidentität zu *adi2* und das ebenfalls der PrpF-Familie zuzurechnen ist, konnte auch in *S. reilianum* gefunden werden. Am Ende des Genclusters befindet sich das Gen *um02808* (*ram1*) welches eine gemeinsame Promotorregion mit *adi2* besitzt. Ram1 ist nah verwandt mit Nit-4 (Sr13862), einem möglichen Transkriptionsfaktor aus *S. reilianum*, und besitzt neben einer am C-Terminus gelegenen pilzlichen Transkriptionsfaktor regulierenden MHR (middle homology region) eine N-terminal gelegene GAL4-ähnliche DNA-Bindedomäne. Eine Deletion von *ram1* führt dazu, dass *trans*-Aconitat nicht weiter als Kohlenstoffquelle genutzt werden kann (siehe Abb. 1.5: Przybilla 2014).

Tabelle 2.1: Analyse der Clustergene

Gen-Nr.	Mögliche Funktion	Größe	Homolog in <i>S. reilianum</i> (Schirawski et al., 2010)	E-value	Strukturmotiv
<i>aip1</i> (um10608)	<i>trans</i> -Aconitat Import	574	Chinatpermease (sr13859)	0.0	Major Facilitator Familie (MFS)
<i>mtt2</i> (um02806)	Mitochondrialer <i>cis</i> -Aconitat Transport	354	Citrat-Transport Protein (CTP1) (sr13860)	0.0	mitochondriales Transportprotein
<i>adi2</i> (um02807)	Isomerisierung von Aconitat	440	hypothetisches Protein mit PrpF-Region (sr13861)	0.0	PrpF-Familie
<i>ram1</i> (um02808)	Regulator des Aconitat-Metabolismus	955	Stickstoff assoziierter Transkriptionsfaktor Nit4 (sr13862)	0.0	GAL4-ähnliche Transkriptionsfaktoren

2.1.2 Das Aconitat-Importprotein Aip1 lokalisiert in der Plasmamembran von *U. maydis*

Mithilfe von Fluoreszenz-Mikroskopie konnte die Isomerase Adi2 bereits im Cytosol lokalisiert werden (Friedrich, 2013). In dieser Arbeit wurde mithilfe einer GFP-Fusion die Lokalisierung des als Transportprotein vorhergesagten Aip1 untersucht und seine Aufgabe im *trans*-Aconitat Metabolismus genauer charakterisiert. In Zusammenarbeit mit Sandra Büttner wurde im *U. maydis* Stamm MB215 *aip1* endogen am C-Terminus mit dem offenen Leserahmen von *gfp* fusioniert. Hierzu wurde *gfp* zusammen mit einem Nourseothricin-Resistenzmarker am C-Terminus von *aip1* vor das Stop-Codon integriert. Somit konnte *aip1-gfp* unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert werden. Die Funktionalität von Aip1-GFP wurde mithilfe eines Wachstumstests auf *trans*-Aconitat untersucht (siehe Abb. 2.2). MB215 Aip1-GFP zeigte auf *trans*-Aconitat ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstumsverhalten, während eine *aip1*-Mutante auf *trans*-Aconitat stark be-

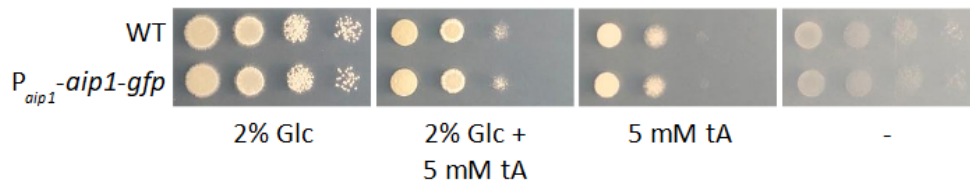


Abbildung 2.2: Aip1-GFP ist funktionell

Gezeigt ist ein Wachstumstest auf *trans*-Aconitat des Wildtyps im Vergleich mit einem Stamm der eine endogene *aip1-gfp*-Fusion enthält. MB215 Aip1-GFP kann wie der Wildtyp auf *trans*-Aconitat wachsen und wird somit als funktionsfähig angesehen.

einträchtig ist (Przybilla, 2014) (siehe Abb. 2.2). Nach 15 minütiger Inkubationszeit (t1) in Medium mit *trans*-Aconitat als alleiniger Kohlenstoffquelle war das Aip1-GFP-Signal in der Plasmamembran zu beobachten (siehe Abb. 2.3a). Nach einstündiger Inkubationszeit (t2) konnte die Lokalisierung von Aip1 in der Plasmamembran der Zellen auch in Anwesenheit von *cis*-Aconitat nachgewiesen werden. In Kombination mit Glucose war das GFP-Signal schwächer in den Zellen zu sehen (siehe Abb. 2.3a).

Zur Detektion der Aip1-GFP Expression wurde ein Western Blot durchgeführt (siehe Abb. 2.3b). Hierzu wurden Proben nach 15 minütiger und einstündiger Inkubation verwendet. Ein deutliches Aip1-GFP-Signal konnte nach 15 Minuten Inkubation nur in Anwesenheit von *trans*- und *cis*-Aconitat als alleiniger Kohlenstoffquelle detektiert werden. In Verbindung mit Glucose wurde nur ein sehr geringes Signal detektiert, was mit den fluoreszenzmikroskopischen Analysen dieses Stammes vergleichbar war. Nach einstündiger Inkubation konnte das GFP-Signal zusätzlich auch in Anwesenheit von Glucose nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.3a,b).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei Aip1 um ein membranständiges Protein handelt, dass eine Funktion bei der Aufnahme von *trans*-Aconitat haben könnte.

2.1.3 Aip1 ist der Transporter für die Aufnahme von *trans*-Aconitat

Die Lokalisierung von Aip1 in der Plasmamembran machte es wahrscheinlich, dass es sich um einen Transporter für Aconitat handelt. Um diese Annahme zu testen, wurde in Zusammenarbeit mit Sarah-Maria Wege ein Testsystem etabliert, mithilfe dessen sich der Verbrauch bzw. die Aufnahme von Aconitat aus dem Medium mithilfe einer HPLC basierten Analyse messen lässt. Die Konzentration von *cis*- und *trans*-Aconitat im Überstand einer Wildtypkultur und einer $\Delta aip1$ -Mutante wurde über die Zeit nach Zugabe einer wässrigen 5 mM *cis*- bzw. *trans*-Aconitat-Lösung analysiert. Als Kontrolle wurde Wasser mit den Substraten inkubiert, um mögliche Schwankungen von *cis*- bzw. *trans*-Aconitat im Medium zu messen. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die anschließend mittels HPLC analysiert wurden (siehe Abb. 2.4).

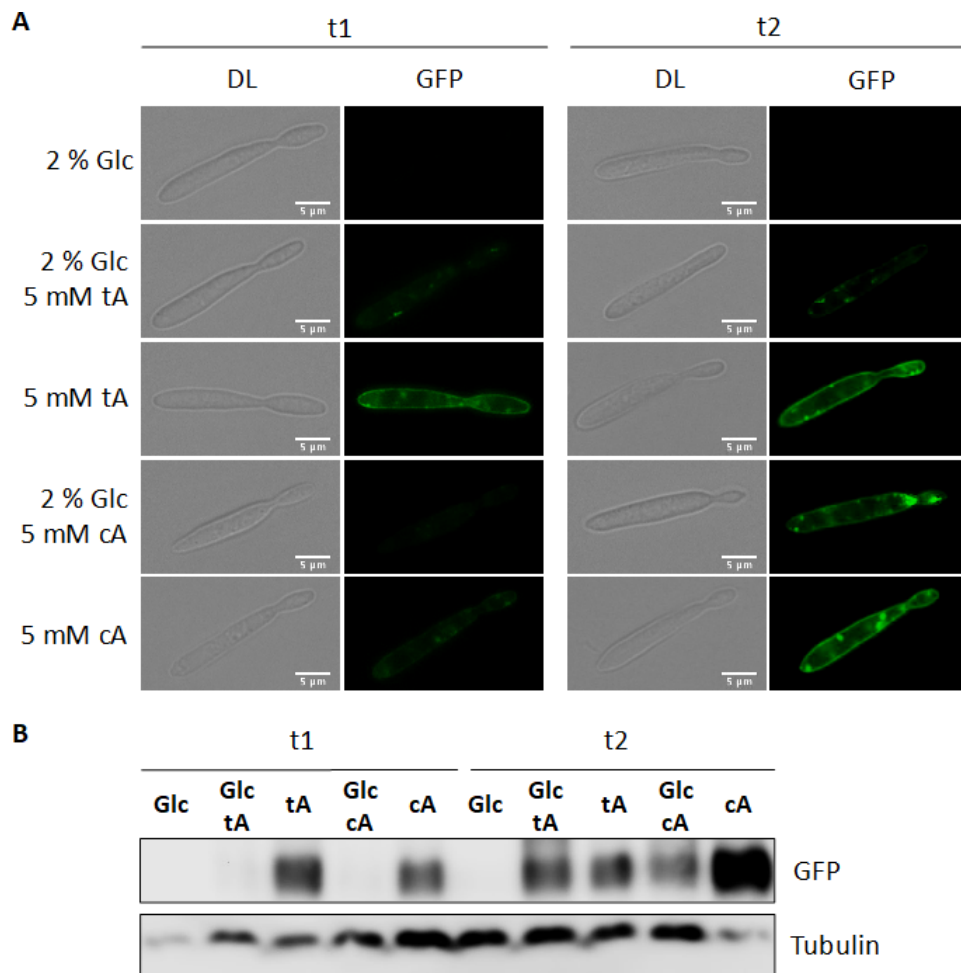


Abbildung 2.3: Lokalisierung von Aip1 in der Plasmamembran

A Dargestellt ist die intrazelluläre Lokalisierung von Aip1-GFP in Glucose und in Anwesenheit von *cis*- bzw. *trans*-Aconitat im Wildtyp MB215 nach 15 min Inkubationszeit (t1, links). In Anwesenheit von *trans*-Aconitat lokalisiert Aip1 deutlich in der Plasmamembran. In t2, rechts, ist die intrazelluläre Lokalisierung von Aip1-GFP in Anwesenheit von *cis*- bzw. *trans*-Aconitat in Kombination mit und ohne Glucose im Wildtyp MB215 nach einstündiger Inkubationszeit gezeigt. Aip1-GFP lokalisiert in Anwesenheit von *cis*- und *trans*-Aconitat in der Plasmamembran. In Anwesenheit von Glucose ist das GFP-Signal schwach in der Plasmamembran zu sehen. **B** Gezeigt ist ein Western Blot, der das ca. 90 kDa große Aip1-GFP detektiert. Aip1-GFP ist nach 15 minütiger Inkubation (t1) im Wildtyp MB215 in Anwesenheit von *cis*- bzw. *trans*-Aconitat zu sehen. Nach einstündiger Inkubation (t2) ist das Aip1-GFP Signal auch in Anwesenheit von Glucose zu beobachten. Tubulin diente der Mengenkontrolle.

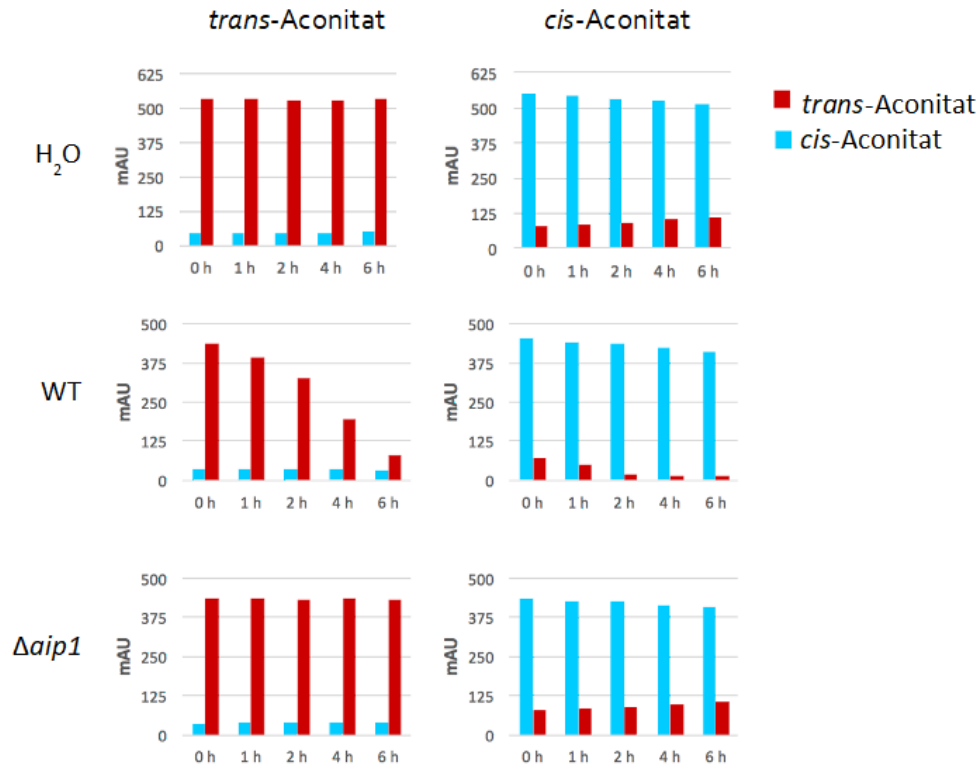


Abbildung 2.4: Aip1 transportiert *trans*-Aconit

Dargestellt ist die mithilfe von HPLC gemessene Veränderung der Substratkonzentrationen von *cis*- und *trans*-Aconit in den Kulturüberständen von Wildtyp MB215 (WT) und der $\Delta aip1$ -Mutanten. Die Retentionszeiten wurden mit Standards für *cis*- bzw. *trans*-Aconit verglichen. Proben wurden zur Startzeit und nach 1,2,4 und 6 Stunden aus dem Kulturüberstand entnommen und mithilfe von HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind graphisch dargestellt in mAU=*milli absorption unit* (Milli-Absorptionseinheit). Zu den Kulturen wurden jeweils 5 mM Substrat zugegeben. H₂O diente als Negativkontrolle. Im WT nimmt *trans*-Aconit bei Zugabe von *cis*- und *trans*-Aconit ab. In $\Delta aip1$ Zellen bleibt bei Zugabe von *trans*-Aconit die *trans*-Aconitmenge gleich, bei Zugabe von *cis*-Aconit nimmt die *cis*-Aconitmenge leicht ab und die *trans*-Aconitkonzentration nimmt entsprechend zu.

Die Wasser-Kontrolle zeigte bei Inkubation mit *cis*-Aconit über die Zeit eine Zunahme der Konzentration von *trans*-Aconit, die auf das spontane Einstellen des chemischen Gleichgewichts der beiden Isoformen zurückzuführen war. Da *trans*-Aconit die stabilere Isoform ist, liegt das chemische Gleichgewicht auf der Seite des *trans*-Aconits (Ambler and Roberts, 1948; Malachowski and Maslowski, 1928). Ferner zeigte diese Analyse, dass weder *cis*- noch *trans*-Aconit in reiner Form vorlagen. Nach Inkubation mit *trans*-Aconit verringerte sich die gemessene *trans*-Aconit-Konzentration im Überstand der Wildtypkultur auf ein Fünftel. Bei Inkubation des gleichen Stammes in *cis*-Aconit, blieb die Konzentration von *cis*-Aconit fast gleich, während das durch Verunreinigung und durch spontane *cis/trans*-Isomerisierung gebildete *trans*-Aconit abnahm. Bei einem Vergleich der $\Delta aip1$ -Mutante mit dem Wildtyp wurde deutlich, dass die Aufnahme von *trans*-Aconit in der Mutante nicht mehr erfolgte. *U. maydis* ist demnach in der Lage,

trans-Aconitat in die Zellen aufzunehmen, wobei das Importprotein Aip1 spezifisch für die Aufnahme von *trans*-Aconitat zu sein scheint. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Membrantransport durch Aip1 der einzige Importweg für *trans*-Aconitat in die Zellen ist.

Diese Aussage wurde durch ein weiteres Ergebnis bestätigt. Die Deletion des für die Aconitat- Δ -Isomerase codierenden Gens *adi2* führt zur erhöhten Sensitivität von *U. maydis* gegenüber *trans*-Aconitat (Przybilla, 2014). Es bestand die Vermutung, dass diese erhöhte Sensitivität durch eine fehlende *trans*-Aconitat Aufnahme kompensiert werden könnte, falls *trans*-Aconitat seine toxische Wirkung intrazellulär ausübt. Daher wurde *adi2* am genomischen Locus in $\Delta aip1$ Zellen durch homologe Rekombination deletiert. Die Doppelmutante zeigte tatsächlich ein mit einer $\Delta aip1$ -Mutante vergleichbares Wachstumsverhalten (siehe Abb. 2.5). Daraus kann geschlossen werden, dass Aip1 *trans*-Aconitat importiert, das in Abwesenheit von Adi2 toxisch wird.

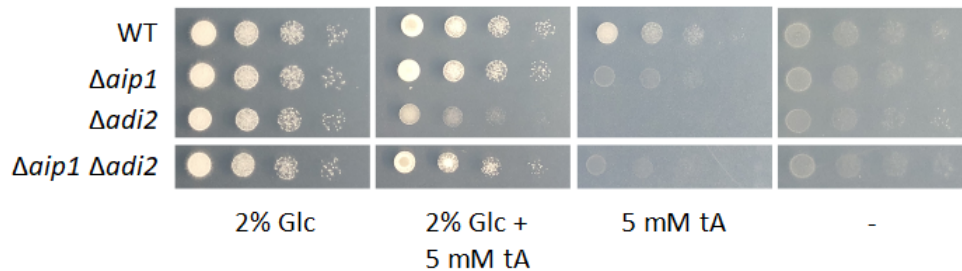


Abbildung 2.5: Eine Deletion von *aip1* kann die Sensitivität von $\Delta adi2$ -Mutanten gegenüber *trans*-Aconitat unterdrücken

Gezeigt ist ein Wachstumstest der Einzel- und Doppeldeletionsmutanten von *adi2* und *aip1* auf Medium mit *trans*-Aconitat. Während der Wildtyp auf *trans*-Aconitat wachsen kann, ist die $\Delta aip1$ -Mutante stark in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Durch die Deletion von *adi2* wird *trans*-Aconitat toxisch. Die zusätzliche Deletion von *aip1* in einer $\Delta adi2$ -Mutante kompensiert die erhöhte Sensitivität der Einzelmutante.

HPLC-Analysen der Doppelmutante $\Delta aip1 \Delta adi2$ zeigten, dass die Konzentration von *trans*-Aconitat im Kulturüberstand nicht abnimmt und der Phänotyp der Doppelmutante mit dem der Einzelmutanten $\Delta aip1$ und $\Delta adi2$ vergleichbar ist (siehe Abb. 2.6).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die starke Sensitivität gegenüber *trans*-Aconitat durch den fehlenden Import von *trans*-Aconitat durch das Fehlen von Aip1 aufgehoben werden kann. Somit ist Aip1 vermutlich das einzige, zumindest unter diesen Bedingungen exprimierte, Importprotein für das Substrat *trans*-Aconitat.

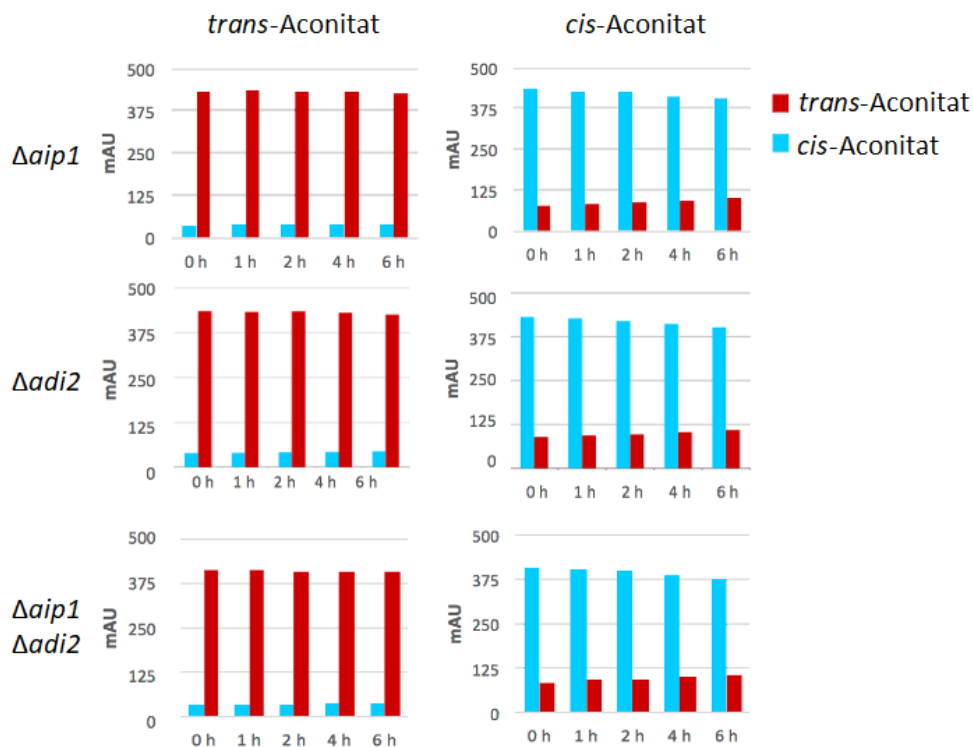


Abbildung 2.6: Aip1 ist das einzige *trans*-Aconitat Importprotein in *U. maydis*

Dargestellt ist die mithilfe von HPLC gemessene Veränderung der Substrate *cis*- und *trans*-Aconitat in den Kulturüberständen der Deletionsmutante des Aip1-Importproteins ($\Delta aip1$), der Adi2-Aconitat-Isomerase ($\Delta adi2$) und der $\Delta aip1 \Delta adi2$ Mutante. Zu den Kulturen wurden jeweils 5 mM Substrat zugegeben. In den drei Mutanten bleibt bei Zugabe von *trans*-Aconitat die *trans*-Aconitatkonzentration gleich, bei Zugabe von *cis*-Aconitat nimmt die *cis*-Aconitatkonzentration leicht ab und die *trans*-Aconitatkonzentration nimmt zu.

2.1.4 Mtt2 lokalisiert in den Mitochondrien

Nachdem die intrazelluläre Lokalisierung von Adi2 und Aip1 untersucht worden war, wurde die Lokalisierung von Um02806 (Mtt2) bestimmt und seine Aufgabe im *trans*-Aconitat Metabolismus näher charakterisiert. In Kooperation mit Sandra Przybilla wurde eine C-terminale GFP-Fusion von Mtt2 hergestellt und in einer $\Delta mtt2$ Mutante unter der Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors exprimiert. Mtt2-GFP lokalisierte in Zellkompartimenten, die durch Färbung mit Mitotracker Rhodamin B als Mitochondrien identifiziert werden konnten (siehe Abb. 2.7). Die beobachtete Lokalisierung entspricht der Annotation von *um02806*, dass es sich um ein Gen für einen mitochondrialen Transporter handelt.

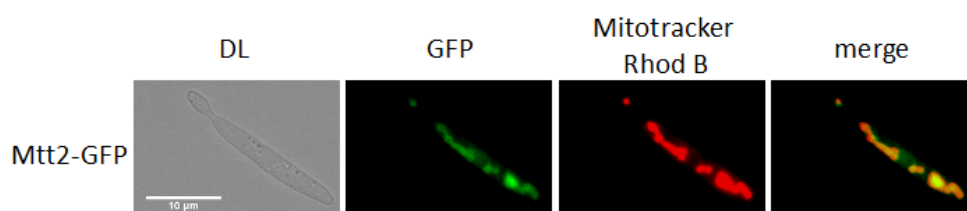


Abbildung 2.7: Mtt2 lokalisiert in den Mitochondrien von *U. maydis*

Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisierung von GFP-Mtt2 in *U. maydis*. Durch Färbung der Mitochondrien mit Mitotracker Rhodamin B konnte gezeigt werden, dass sich GFP-Mtt2 in den Mitochondrien befindet.

2.1.5 Die Aufnahme von *trans*-Aconitat ist durch eine Deletion von *mtt2* reduziert

Mtt2 ist strukturell verwandt mit Proteinen aus der *mitochondrial carrier family* (MCF), deren Aufgabe es ist, Metaboliten in die Mitochondrien zu transportieren (Palmieri and Pierri, 2010). Es wurde vermutet, dass Mtt2 das im Cytosol vorhandene, durch Adi2 isomerisierte, *cis*-Aconitat in die Mitochondrien transportiert, wo es im Citratzyklus als Energiequelle genutzt werden kann. Daher wurde zunächst die Aufnahme von *trans*-Aconitat in eine $\Delta mtt2$ Mutante untersucht. Dazu wurde die $\Delta mtt2$ Mutante in Wasser mit *cis*- bzw. *trans*-Aconitat als Substrat inkubiert, nach verschiedenen Zeitpunkten Proben der Kulturüberstände entnommen und mithilfe von HPLC analysiert. Die Konzentration von *trans*-Aconitat im Kulturüberstand der $\Delta mtt2$ Mutante nahm deutlich weniger ab als im Kulturüberstand des Wildtypstammes (siehe Abb. 2.8).

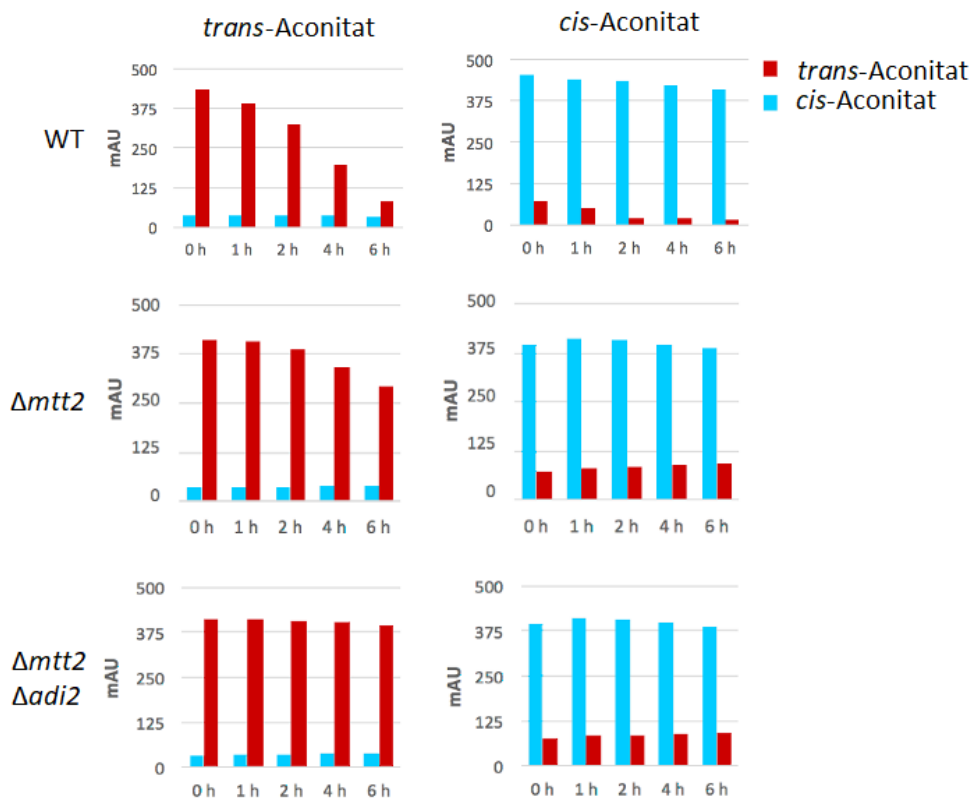


Abbildung 2.8: Die Aufnahme von *trans*-Aconit ist durch Deletion von *mtt2* reduziert; bei der $\Delta mtt2 \Delta adi2$ Mutante sind keine Veränderungen der Substratkonzentrationen zu beobachten

Dargestellt ist die mithilfe von HPLC gemessene Veränderung der Substrate *cis*- und *trans*-Aconit in den Kulturüberständen des Wildtypstammes MB215 (WT), von $\Delta mtt2$ und der Doppelmutante $\Delta mtt2 \Delta adi2$. Zu den Kulturen wurde jeweils 5 mM Substrat zugegeben. Im Vergleich zum WT nimmt die Konzentration von *trans*-Aconit im Kulturüberstand von $\Delta mtt2$ nur in geringem Maße ab, bei Zugabe von *cis*-Aconit zu $\Delta mtt2$, als auch bei der $\Delta mtt2 \Delta adi2$ -Mutante sind keine Veränderungen der Substratkonzentrationen zu beobachten.

Durch eine Deletion von *mtt2* scheint die Aufnahme von *trans*-Aconit zwar gewährleistet, jedoch stark reduziert zu sein. In einer $\Delta mtt2$ Mutante könnte es zu einer Ansammlung von *cis*-Aconit im Cytosol kommen. Die weitere Verwertung des Substrats scheint nicht oder nur langsam abzulaufen, weshalb eine effiziente Aufnahme von *trans*-Aconit ausbleibt. Die Daten sprechen außerdem gegen die Annahme, dass ein weiterer mitochondrialer Aconit-Transporter zu diesem Zeitpunkt aktiv ist.

2.1.6 *Trans*-Aconitat wirkt bereits im Cytosol toxisch

Trans-Aconitat ist ein bekannter Inhibitor der Aconitase, die in den meisten Organismen in den Mitochondrien lokalisiert, aber auch beispielsweise in der Bäckerhefe im Cytosol vorzufinden ist (Regev-Rudzki et al., 2005). Wie zuvor beschrieben, führt eine Deletion von *adi2*, zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber *trans*-Aconitat. Es wurde vermutet, dass in einer $\Delta*adi2*$ Mutante das nicht isomerisierte *trans*-Aconitat über einen mitochondrialen Transporter in die Mitochondrien transportiert wird und die mitochondriale Aconitase inhibiert, was den beschriebenen Phänotyp zur Folge haben könnte. Da die Wachstumstests auf *trans*-Aconitat-haltigem Medium und die HPLC-Analysen von $\Delta*mtt2*$ Mutanten darauf hindeuteten, dass neben Mtt2 kein weiterer mitochondrialer Aconitat-Transporter aktiv ist, wurde untersucht, ob eine Deletion von *mtt2* in $\Delta*adi2*$ die Sensitivität gegenüber *trans*-Aconitat aufheben kann. Hierzu wurde *adi2* in einem $\Delta*mtt2*$ Hintergrund durch homologe Rekombination deletiert.

Wachstumstests von $\Delta*mtt2*\Delta*adi2*$ auf *trans*-Aconitat-haltigem Medium, welches zusätzlich Glucose als Kohlenstoffquelle enthielt, zeigten, dass die zusätzliche Deletion von *mtt2* keinen Einfluss auf den Phänotyp von *adi2*-Mutanten hatte (siehe Abb. 2.9).

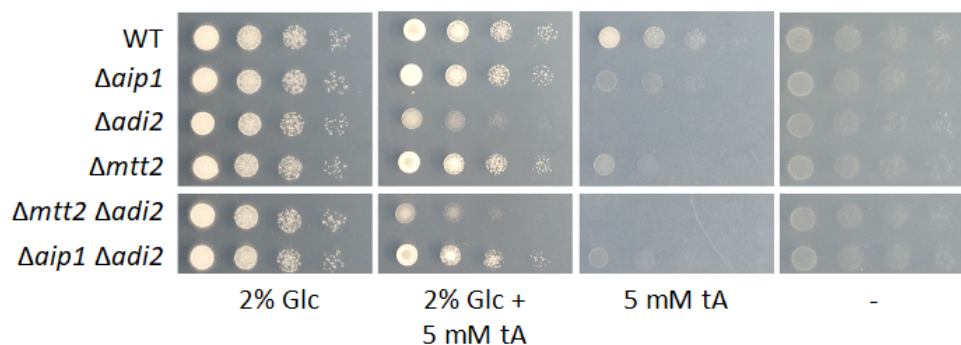


Abbildung 2.9: Die Deletion von *mtt2* kann den Phänotyp von $\Delta*adi2*$ nicht unterdrücken
Gezeigt ist ein Wachstumstest der Einzel- und Doppeldeletionsmutanten von *adi2* und *mtt2* bzw. *aip1* auf *trans*-Aconitat-haltigem Medium. Während der Wildtyp auf *trans*-Aconitat wachsen kann sind die Einzelmutanten stark in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Die Deletion von *adi2* ist sensitiv gegenüber *trans*-Aconitat. Die Deletion von *mtt2* in $\Delta*adi2*$ hebt im Gegensatz zur Deletion von *aip1* die Sensitivität der *adi2*-Mutante gegenüber *trans*-Aconitat nicht auf.

Auch HPLC-Analysen der Kulturüberstände der $\Delta*mtt2*\Delta*adi2*$ Mutante zeigten im Gegensatz zur $\Delta*mtt2*$ Mutante keine deutliche Veränderung der *trans*-Aconitat-Konzentration im Überstand der *U. maydis*-Kulturen (siehe Abb. 2.8). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das aufgenommene *trans*-Aconitat in *U. maydis* bereits im Cytosol toxisch auf die Zellen wirkt.

2.1.7 Modell des *trans*-Aconitat Metabolismus in *U. maydis*

Die vorliegenden Daten ermöglichten das Formulieren eines Modells für die Verstoffwechslung von *trans*-Aconitat (siehe Abb.2.10). *Trans*-Aconitat wird spezifisch über den zur Familie der *Major Facilitator* (MFS) gehörenden Membrantransporter Aip1 in die Zellen transportiert. Dies geschieht vor allem in Abwesenheit von bevorzugten Kohlenstoffquellen wie Glucose (siehe Abb. 2.3). Das im Cytosol akkumulierende *trans*-Aconitat wird durch die Aconitat- Δ -Isomerase Adi2 zu *cis*-Aconitat isomerisiert und die toxische Wirkung von *trans*-Aconitat somit wettgemacht. Mtt2 und somit auch die Verwertung von *cis*-Aconitat werden benötigt, um den stetigen Import von *trans*-Aconitat zu gewährleisten.

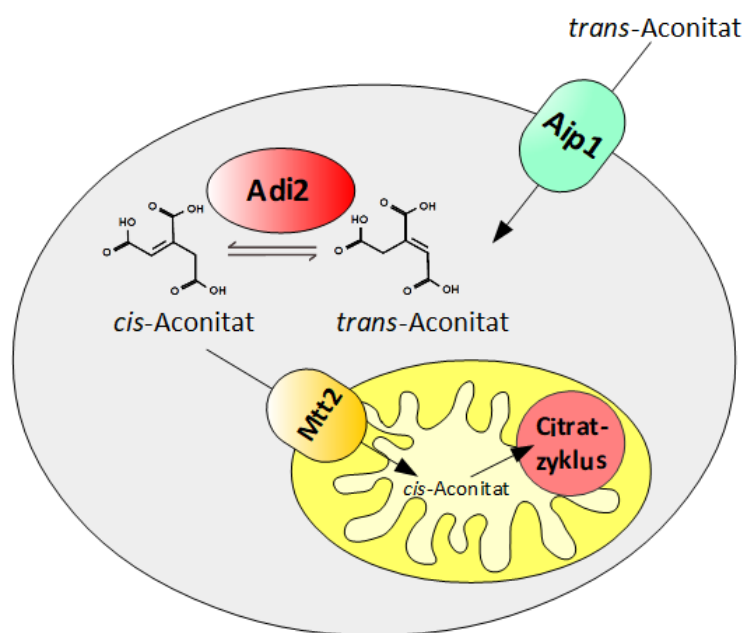


Abbildung 2.10: Modell des *trans*-Aconitat Metabolismus in *U. maydis*

Schematische Darstellung der *trans*-Aconitat Verstoffwechslung in *U. maydis*. *Trans*-Aconitat wird über den Membrantransporter Aip1 in die Zellen aufgenommen und im Cytosol durch die Aconitat- Δ -Isomerase Adi2 zu *cis*-Aconitat isomerisiert. Anschließend wird dieses vermutlich durch den mitochondrialen Transporter Mtt2 in die Mitochondrien transportiert und wahrscheinlich im Citrat-Zyklus verwertet.

2.2 Regulation des Adi2-Genclusters

Im Adi2-Gencluster ist neben den Enzymen, die für die Aufnahme und Weiterverarbeitung von *trans*-Aconitat zuständig sind, ein weiteres Gen vorhanden (*um02808*), welches für einen Transkriptionsfaktor codiert. Pilzliche Gencluster werden häufig durch einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor reguliert, welcher Teil des Genclusters sein kann. Um02808 ist nahe verwandt mit dem als Transkriptionsfaktor annotierten Nit-4 aus *S. reilianum* und besitzt für Transkriptionsfaktoren typische Domänen. Da es sich bei Um02808 vermutlich um einen Transkriptionsfaktor handelt, wurde das zugehörige Gen *ram1* genannt, was eine Abkürzung von *regulator of the aconitate metabolism* („Regulator des Aconitat-Metabolismus“) ist.

2.2.1 Der „Regulator des Aconitat-Metabolismus“ Ram1

Ram1 ist ein 955 Aminosäuren langes Protein und besitzt im N-terminalen Bereich eine GAL4-ähnliche Zn(II)₂-Cys₆ DNA-Bindedomäne (siehe Abb. 2.11).

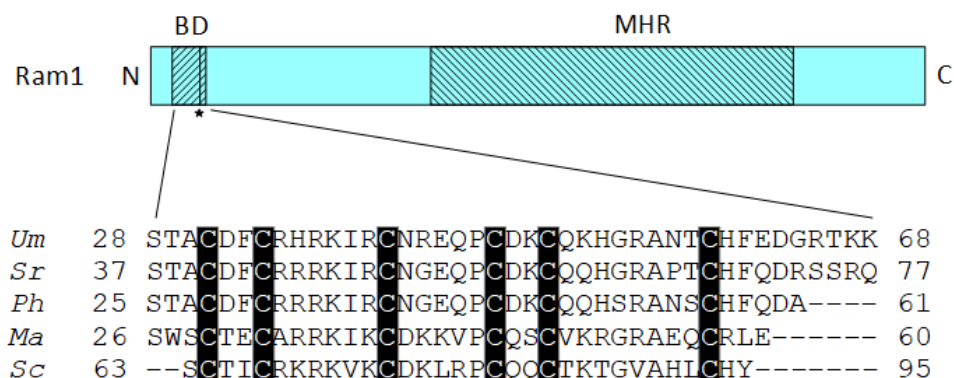


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung von Ram1

Ram1 ist ein 955 Aminosäuren großes Protein, das eine hohe Sequenzähnlichkeit zu anderen GAL4-Transkriptionsfaktoren aufweist. Am N-terminalen Bereich befindet sich eine GAL4-ähnliche DNA-Bindedomäne (BD, links schraffierter Balken) in welcher auch eine Kernlokalisierungsdomäne identifiziert wurde (Stern). Am C-Terminus befindet sich eine pilzliche Transkriptionsfaktor regulierende MHR (middle homology region) (rechts schraffierter Balken). Im unteren Teil der Abbildung ist die Sequenz der GAL4-Domäne im Vergleich zu anderen pilzlichen Proteinen dargestellt. Die 6 überall konservierten Cysteine, die für die Ausbildung des binuklearen Zink-Clusters zuständig sind, sind schwarz hinterlegt. Die Abkürzungen stehen für: *Um* = *U. maydis*, *Sr* = *S. reilianum*, *Ph* = *P. hubeiensis*, *Ma* = *Moesziomyces antarcticus*, *Sc* = *Saccharomyces cerevisiae*.

Das cysteinreiche Motiv ist in der Zink-abhängigen DNA-Bindung involviert. In dieser Region werden zwei Zink-Ionen von sechs Cystein-Resten koordiniert und so ein binukleares Zink-Cluster gebildet, jedoch keine Zinkfinger-Formation angenommen (Pan and Coleman, 1990; Todd and Andrianopoulos, 1997). Diese GAL4-Domäne ist typisch für Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der pilzlichen Zinkcluster Transkriptionsfaktoren

gehören, wobei die Cystein-Reste in verschiedenen Organismen konserviert sind (Todd and Andrianopoulos, 1997). Die Aktivierungsdomäne von Ram1 befindet sich am C-Terminus (Aminosäuren 101-955), kann jedoch nicht genau eingegrenzt werden. Im C-Terminus besitzt Ram1 außerdem eine MHR-Domäne (middle homology region), eine mittig liegende homologe Region mit regulatorischer Funktion für den Transkriptionsfaktor. Diese Domäne kommt in der Familie der pilzlichen Zink-Cluster Transkriptionsfaktoren vor, die am N-Terminus eine GAL4-ähnliche $Zn(II)_2$ -Cys₆ DNA-Bindedomäne besitzen (Schjerling and Holmberg, 1996). Außerdem wurde in der Sequenz von Ram1 eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) identifiziert (cNLS-Mapper: Kosugi et al. (2009)).

2.2.2 Ram1 lokalisiert im Zellkern von *U. maydis*

Da in der Sequenz von Ram1 eine NLS identifiziert werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass Ram1 im Nucleus lokalisiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Plasmide hergestellt, die für eine C-terminale bzw. N-terminale GFP Fusion von Ram1 unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *etef* codieren (siehe Abb.2.12a). Die Konstrukte wurden in den *ip*-Locus von *U. maydis* in einem $\Delta ram1$ Hintergrund integriert. Der *ip*-Locus („*iron-sulfur protein*“; *sdh2: um00844*) erlaubt eine ortsspezifische Integration von DNA. Eine mutierte Version der Succinatdehydrogenase mit einem Aminosäureaustausch an Position 257 von Histidin nach Leucin (*ip^R*) wird eingeführt und führt dazu, dass der Pilz eine Resistenz gegen das Fungizid Carboxin entwickelt (Broomfield and Hargreaves, 1992). Resultierende Transformanten wurden mithilfe von Wachstumstests auf Funktionalität überprüft. Hierzu wurden Zellen von verschiedenen Transformanten in seriellen Verdünnungen ausgehend von einer optische Dichte von 1 ($OD_{600}=1$) auf Minimalmedium mit Glucose bzw. *trans*-Aconitat getropft. Alle Transformanten waren in der Lage, den Phänotyp einer $\Delta ram1$ Mutante zu retten. Die Position von GFP war dafür unerheblich (siehe Abb. 2.12b).

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Transformanten wurden die Zellen auf eine $OD_{600}=1$ in Vollmedium angezogen, anschließend gewaschen und dann für 2 Stunden in verschiedenen Medien inkubiert. Für die Medien wurden unterschiedliche Kohlenstoffquellen genutzt: Glucose, Glucose- und *trans*-Aconitat und *trans*-Aconitat als alleinige Kohlenstoffquelle. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der GFP-Fusionen von Ram1 zeigten, dass beide Konstrukte im Zellkern von *U. maydis* lokalisieren (siehe Abb. 2.12c), der durch Färbung mit DAPI als solcher identifiziert wurde (siehe Abb. 2.12d). Ein Unterschied in der Lokalisierung nach Inkubation in den verschiedenen Medien wurde dabei jedoch nicht beobachtet. Die Position von GFP am C- bzw. N-Terminus von Ram1 ergab jedoch leichte Unterschiede. War die Position von GFP am N-Terminus von Ram1, wurde das GFP-Signal punktförmig im Zellkern detektiert. War das GFP am C-Terminus von

Ram1, dann war das GFP-Signal an verschiedenen Strukturen im Zellkern zu beobachten.

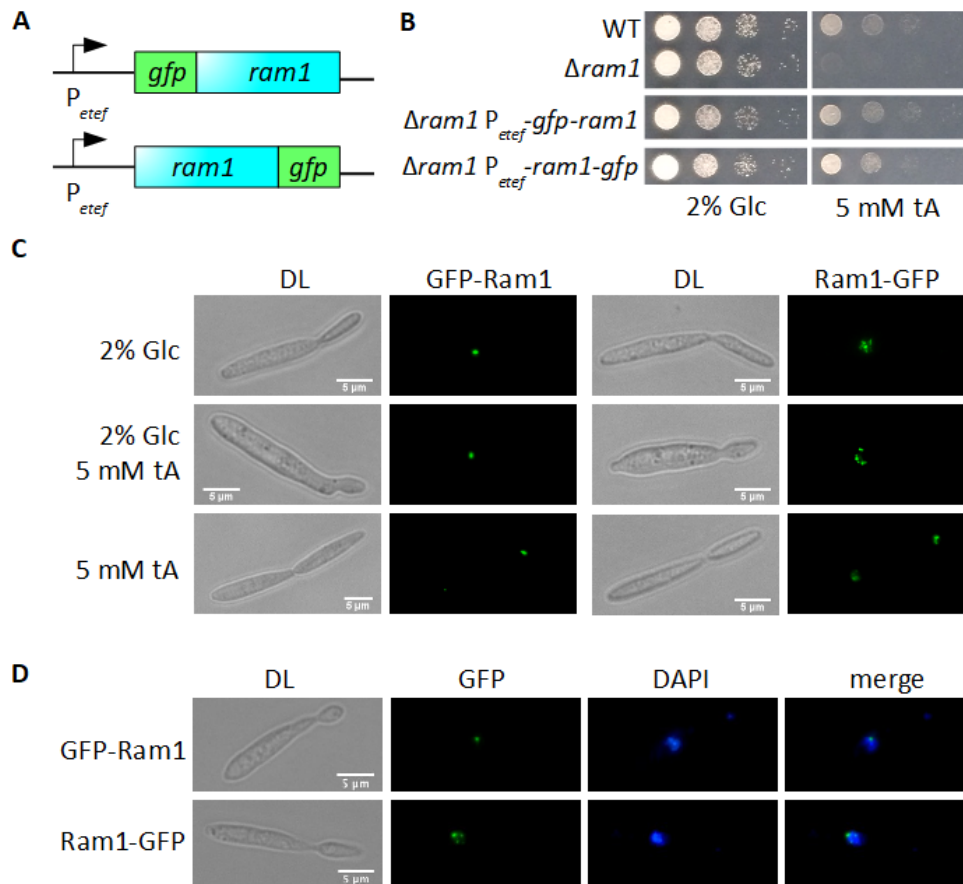


Abbildung 2.12: Ram1 lokalisiert im Nucleus von *U. maydis*

A Schematische Darstellung der N-terminalen bzw. C-terminalen GFP-Fusionen von Ram1 unter der Kontrolle des konstitutiven *eteft*-Promotors. **B** Abgebildet ist ein Wachstumstest, welcher die erfolgreiche Komplementation einer $\Delta ram1$ -Mutante durch Ram1-GFP bzw. GFP-Ram1 zeigt. **C** Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisation von Ram1 in *U. maydis*. GFP-Ram1 und Ram1-GFP lokalisieren im Nucleus der Zellen, wobei sich das GFP-Signal innerhalb des Zellkerns zwischen den beiden Fusionsproteinen leicht unterscheidet. Die Inkubation von Ram1-GFP bzw. GFP-Ram1 in den verschiedenen Medien Glucose, Glucose und *trans*-Aconitat und *trans*-Aconitat als alleinige Kohlenstoffquelle haben jedoch keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Ram1. **D** Für die Färbung des Zellkerns wurde DAPI verwendet.

2.2.3 Ram1 wird für die Aufnahme von *trans*-Aconitat benötigt

Mithilfe von Wachstumstests auf *trans*-Aconitat konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion von *ram1* dazu führt, dass die Zellen *trans*-Aconitat nicht mehr verwerten können (siehe Abb. 1.5, Przybilla (2014)). HPLC-Analysen sollten zeigen, ob Ram1 auch für die Aufnahme von *trans*-Aconitat benötigt wird. Dafür wurde die Veränderung von *cis*- bzw. *trans*-Aconitat im Kulturüberstand der $\Delta ram1$ -Mutante gemessen (siehe Abb. 2.13).

Im Vergleich zum Wildtyp lässt sich bei $\Delta ram1$ keine Abnahme von *trans*-Aconitat, weder bei Zugabe von *cis*- noch bei Zugabe von *trans*-Aconitat, beobachten. Daher scheint die

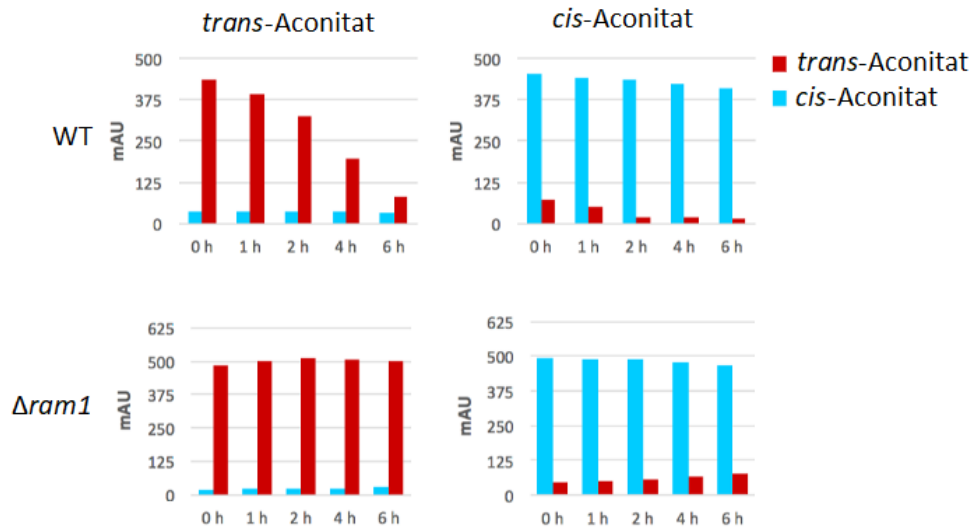


Abbildung 2.13: Ram1 wird für die Aufnahme von *trans*-Aconit benötigt

Dargestellt ist die mithilfe von HPLC gemessene Veränderung der Substrate *cis*- und *trans*-Aconit in den Kulturüberständen des Wildtyps (WT) und der $\Delta ram1$ -Mutante. Zu den Kulturen wurde jeweils 5 mM Substrat gegeben. Im Gegensatz zum Wildtyp nimmt die Konzentration von *trans*-Aconit im Kulturüberstand in $\Delta ram1$ nicht ab, bei Zugabe von *cis*-Aconit zu $\Delta ram1$ steigt die Konzentration von *trans*-Aconit leicht an.

Expression von *ram1* für die Aufnahme von *trans*-Aconit essentiell zu sein.

2.2.4 Das Volllängenprotein von Ram1 ist notwendig für den *trans*-Aconitat Metabolismus

Da Ram1 für den *trans*-Aconitat Metabolismus benötigt wird, sollte der Transkriptionsfaktor und seine vorhergesagten spezifischen Bereiche näher untersucht werden. Hierzu wurden anhand von Vorhersagen der strukturellen Bereiche für Ram1 mit der NCBI „Protein-Database“ drei Verkürzungen des Transkriptionsfaktors generiert (siehe Abb. 2.14).

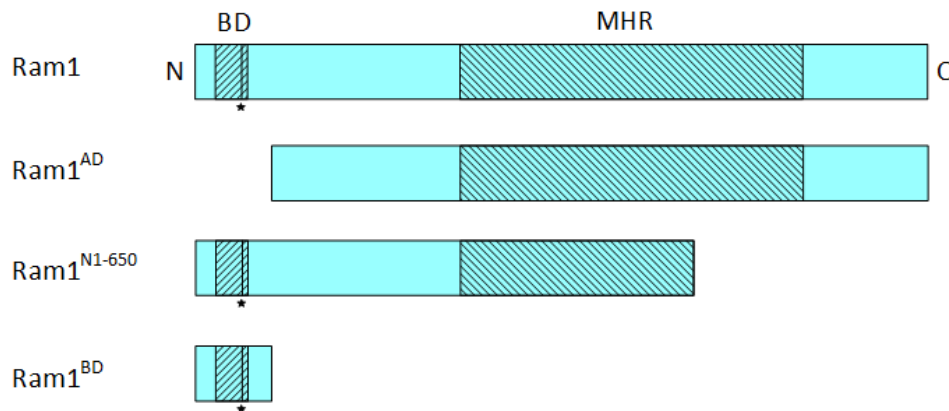


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der Verkürzungen des Transkriptionsfaktors Ram1

Schematische Darstellung des Volllängenproteins Ram1 und dessen drei generierten Verkürzungen. Eingezeichnet sind am N-Terminus die GAL4-ähnliche DNA Bindedomäne und am C-Terminus die regulatorische Domäne MHR (schraffierte Bereiche), sowie die NLS (Stern). Ram1 bezeichnet das Volllängenprotein, Ram1^{AD} die Verkürzung mit fehlender Bindedomäne, Ram1^{N1-650} die mit gekürzter regulatorischer Domäne und Ram1^{BD} besitzt ausschließlich die Bindedomäne von Ram1.

In einer $\Delta ram1$ -Mutante wurden sowohl das Volllängenprotein Ram1, als auch die drei Verkürzungen von Ram1 exprimiert. Hierzu wurden Plasmide hergestellt, die für das Volllängenprotein Ram1 bzw. die drei Verkürzungen von Ram1 codieren und diese unter der Kontrolle des endogenen *ram1*-Promotors exprimieren. Nach erfolgreicher Integration in den *ip*-Locus des *U. maydis* Stamms MB215 $\Delta ram1$ wurde die Funktionalität der Ram1-Derivate mithilfe von Wachstumstests auf *trans*-Aconitat überprüft. Die Wachstumstests zeigten, dass nur das Volllängenprotein Ram1 in der Lage war $\Delta ram1$ zu komplementieren und *trans*-Aconitat als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Alle drei Trunkationen, die mit fehlender DNA-Bindedomäne (Ram1^{AD}) und auch die mit fehlender (Ram1^{BD}) bzw. gekürzter (Ram1^{N1-650}) regulatorischer Domäne, führten zu Wachstumsdefekten, die mit der $\Delta ram1$ -Mutante vergleichbar waren. Die Verkürzungen von Ram1 sind demnach nicht mehr funktionsfähig (siehe Abb. 2.15).

Die Expression der Volllängen- und der verkürzten Ram1-Proteine konnten mittels Western Blot bestätigt werden. Auch eine Überexpression von *ram1*^{N1-650} unter der Kontrolle

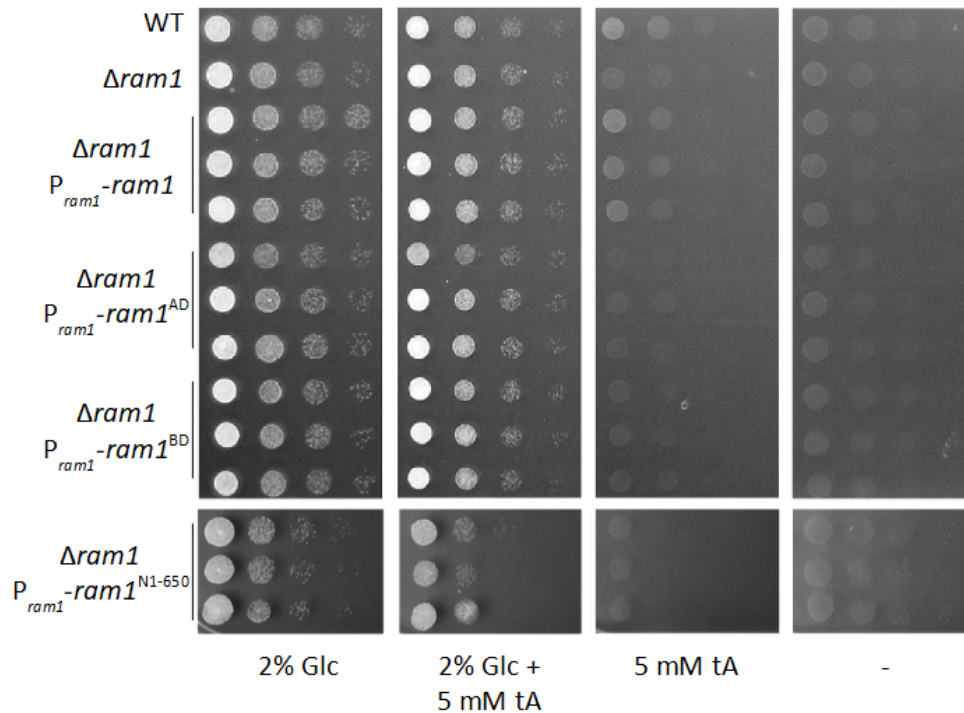


Abbildung 2.15: Das Volllängenprotein von Ram1 wird für das Wachstum auf *trans*-Aconitat benötigt

Gezeigt ist ein Wachstumstest von $\Delta ram1$ -Mutanten, die drei unterschiedliche Ram1-Verkürzungen bzw. das Volllängenprotein exprimieren im Vergleich mit einer $\Delta ram1$ -Mutante und dem Wildtyp. Während der Wildtyp MB215 auf *trans*-Aconitat wachsen kann, ist die $\Delta ram1$ -Mutante stark in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Nur die Komplementation mit dem Volllängenprotein von Ram1 war erfolgreich.

des konstitutiven Promotors *etef* zeigte keine Veränderung des Wachstumsverhaltens auf *trans*-Aconitat, was die Annahme unterstützt, dass die verkürzten Proteine nicht mehr funktionsfähig waren (Wege, 2018).

Ram1 scheint auch unter Glucose-Bedingungen basal exprimiert zu sein. Eine erhöhte Expression von Ram1 hängt jedoch von der alleinigen Anwesenheit von *trans*-Aconitat ab (siehe Abb. 2.16b). Dies legt nahe, dass auch der Ram1-Promotor *trans*-Aconitat abhängig induziert werden muss oder die Stabilität von Ram1 posttranskriptionell abhängig von *trans*-Aconitat kontrolliert wird. Das zweite Szenario ist unwahrscheinlich, da GFP-Ram1 und Ram1-GFP exprimiert unter der Kontrolle des *etef*-Promotors beide auch in Medium ohne *trans*-Aconitat im Fluoreszenzmikroskop sichtbar waren (siehe Abb. 2.12). Ram1 wurde ferner mit dem Hämagglutinin A (HA) Epitop fusioniert und anschließend auf Expression und Funktionalität hin überprüft (siehe Abb. 2.16a). Mit Tropftests konnte gezeigt werden, dass sowohl HA-Ram1 als auch HA₂-Ram1 funktionsfähig sind (siehe Abb. 2.16c).

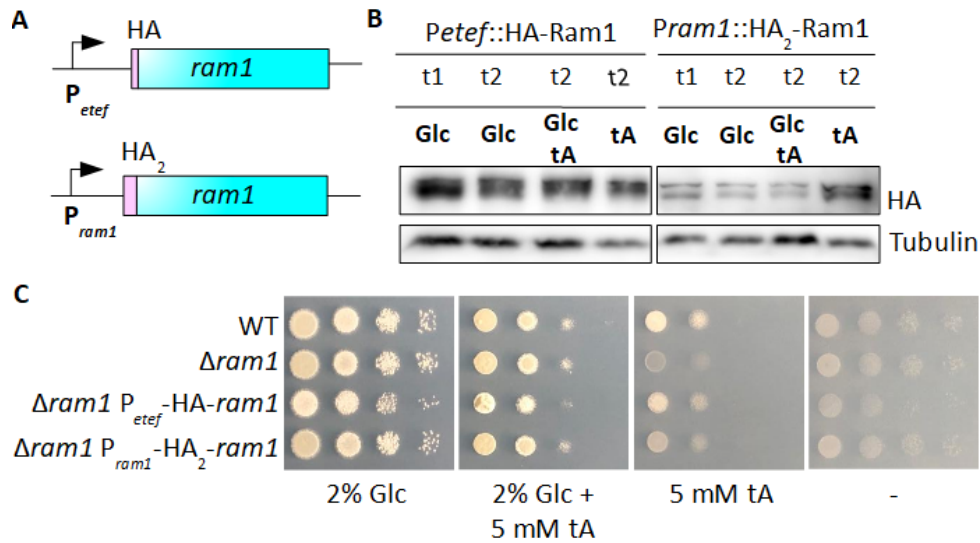


Abbildung 2.16: Die Expression von Ram1 hängt von der Anwesenheit von *trans*-Aconitat ab

A Schematische Darstellung von *HA-ram1*-Konstrukten **B** Western Blot, der die Expression von *HA₂-Ram1* und *HA-Ram1* in verschiedenen Medien zeigt. Für den Western Blot wurden Proben von $OD_{600}=1$ Zellen zum Start der Inkubation (t1) und nach 2 stündiger Inkubation (t2) in Glucose (Glc), Glucose und *trans*-Aconitat (Glc+tA) bzw. *trans*-Aconitat (tA) verwendet. Tubulin diente der Mengenkontrolle. **C** Gezeigt sind Wachstumstests für die Stämme, die im $\Delta ram1$ -Hintergrund *HA-Ram1* unter Kontrolle des *ete f*-Promotors bzw. *HA₂-Ram1* unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimieren. Die Überexpression von *HA-ram1* komplementiert den $\Delta ram1$ -Phänotyp. Die Expression von *HA₂-ram1* unter der Kontrolle des endogenen Promotors komplementiert den $\Delta ram1$ -Phänotyp ebenfalls, jedoch schwächer als die Überexpression.

2.2.5 Die Überexpression von *ram1* ist nicht ausreichend, um die *Adi2*-Clustergene zu exprimieren

Während der fluoreszenzmikroskopischen Analysen war zu sehen, dass die Expression von *Aip1-GFP* nur in Anwesenheit von *trans*-Aconitat bzw. mit zeitlicher Verzögerung auch in *cis*-Aconitat als alleiniger Kohlenstoffquellen detektierbar war (siehe Abb. 2.3). Da *ram1* unter der Kontrolle des konstitutiven *ete f*-Promotors auch in Vollmedium exprimiert wurde, wurde anschließend getestet, ob das *Aip1-GFP* Signal durch eine konstitutive Expression von *Ram1* nachweisbar war.

Hierzu wurde ein *Aip1-GFP*-Reporterstamm generiert. Im Stammhintergrund von *aip1-gfp* wurde *ram1* deletiert und das *HA-ram1* Konstrukt (siehe Abb. 2.16a) in den *ip*-Locus integriert. Auch dieser Stamm konnte *trans*-Aconitat als alleinige Kohlenstoffquelle benutzen (siehe Abb. 2.17a). Überraschenderweise wurde *Aip1-GFP* nur dann detektiert, wenn *trans*-Aconitat im Medium vorhanden war (siehe Abb. 2.17b). Die Analyse der Expression von *Aip1-GFP* mithilfe eines Western Blot bestätigte die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie. *Aip1-GFP* konnte nur nachgewiesen werden, wenn *trans*-Aconitat vorhanden war, obwohl *HA-Ram1* konstitutiv in den Zellen vorlag (siehe Abb. 2.17c).

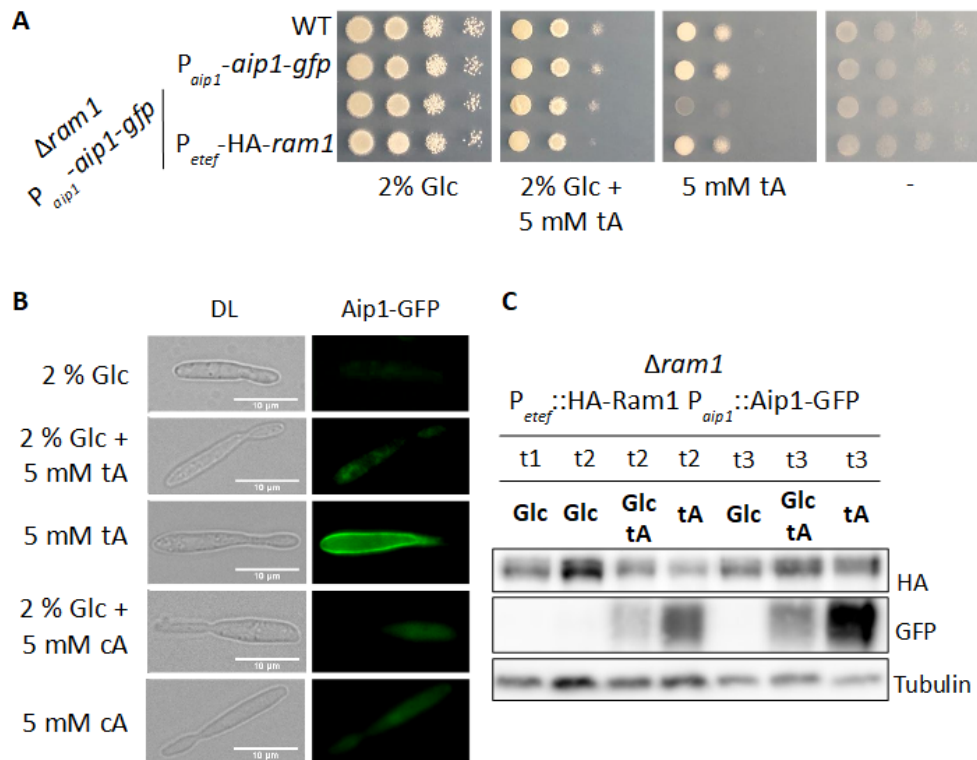


Abbildung 2.17: Die Überexpression von *ram1* ist nicht ausreichend für die Expression von Aip1

A Wachstumstest einer $\Delta ram1$ -Mutante, die zusätzlich Aip1-GFP und HA-Ram1 exprimiert. Der Stamm war in der Lage vergleichbar mit einem Wildtyp *trans*-Aconitat zu verwenden. **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MB215 $\Delta ram1$ $P_{etef}^{-} -HA-ram1$ $Aip1-GFP$. Aip1-GFP ist nur zu detektieren, wenn HA-Ram1 und *trans*-Aconitat vorhanden sind. **C** Western Blot, der die Expression von HA-Ram1 und Aip1-GFP in verschiedenen Medien zeigt. Für den Western Blot wurden Proben von $OD_{600}=1$ Zellen vor Inkubation, nach 15 minütiger Inkubation und nach 2 stündiger Inkubation in Glucose (Glc), Glucose und *trans*-Aconitat (Glc+tA) und *trans*-Aconitat (tA) als alleinige Kohlenstoffquellen verwendet. In Kombination mit Glucose ist nur ein sehr schwaches Aip1-GFP Signal zu beobachten. Tubulin diente der Mengenkontrolle.

Demnach reguliert der Metabolit *trans*-Aconitat noch auf mindestens eine zusätzliche Weise die Expression der Clustergene. Für den zugrundeliegenden Mechanismus wurde eine Reihe von Möglichkeiten in Betracht gezogen. Zum Beispiel könnte *trans*-Aconitat einen weiteren Faktor induzieren, der die Promotoren der Clustergene direkt bindet und aktiviert oder mit Ram1 interagiert. Ram1 könnte auch direkt an *trans*-Aconitat binden und so als Transkriptionsfaktor aktiviert werden. Sowohl die Bindung von Ram1 an die Promotoren der Clustergene, als auch die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie könnten somit *trans*-Aconitat abhängig sein. Ferner könnte der Transkriptionsfaktor auch in Abwesenheit von *trans*-Aconitat post-translational modifiziert werden.

2.2.6 *Trans*-Aconitat aktiviert die AD am C-Terminus von Ram1

Die Überexpression des Transkriptionsfaktors Ram1 war in Abwesenheit von *trans*-Aconitat nicht ausreichend, um die Expression von Aip1-GFP zu induzieren. Um zu untersuchen, ob *trans*-Aconitat die Bindung an die DNA oder die Aktivierung von Ram1 moduliert, wurden hybride Transkriptionsfaktoren (Hybrid-TF) konstruiert (siehe Abb. 2.18a). Rua1 ist

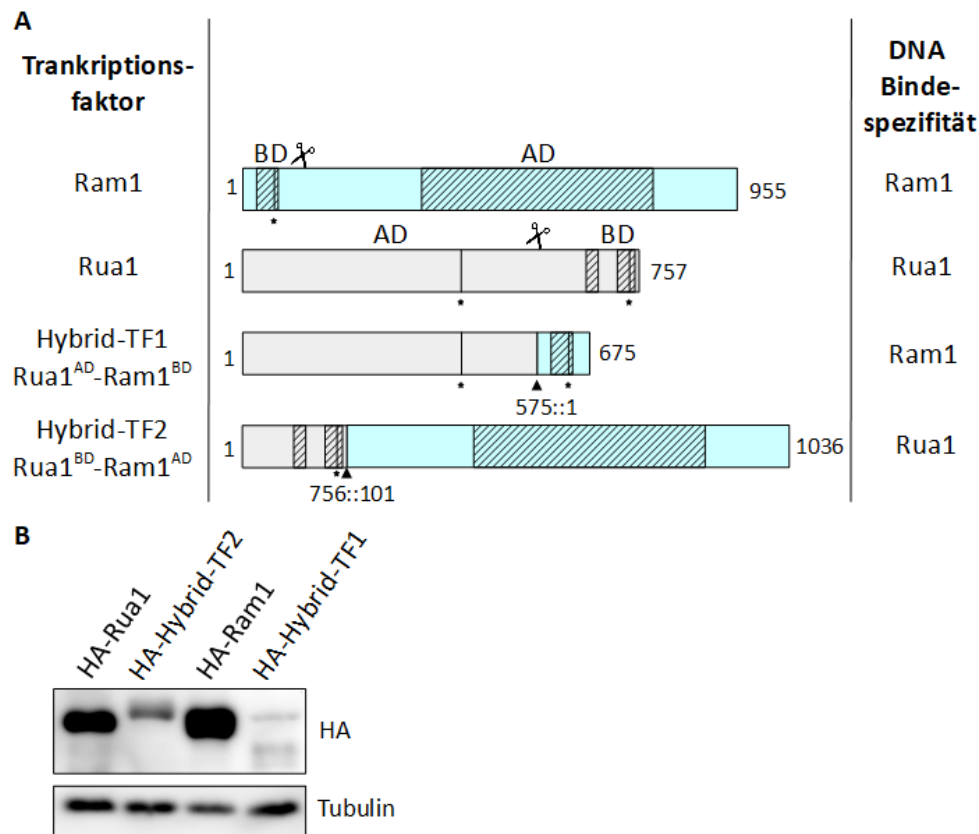


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung der Ram1-Rua1-Hybrid-Transkriptionsfaktoren und deren Expression

A Schematische Darstellung des Aufbaus der Transkriptionsfaktoren Ram1 und Rua1, und der Hybrid-Transkriptionsfaktoren 1 und 2. Die DNA-Bindedomäne (BD) von Ram1 besteht aus dem GAL4-ähnlichen Zn(II)₂-Cys₆ binuklearen Cluster (links schraffierter Bereich) und die Aktivierungsdomäne (AD) von Ram1 befindet sich am C-Terminus und beinhaltet die MHR-Domäne (*middle homology region*). Die BD von Rua1 befindet sich C-Terminal (schraffierter Bereich) und besteht aus zwei Zinkfingerdomänen. Die NLS sind eingezeichnet (Stern). Die Fusionsstellen in den Hybrid-Transkriptionsfaktoren sind mit einem Pfeilkopf markiert und mit den jeweiligen eingrenzenden Aminosäuren beschriftet. Die DNA-Bindeszifitäten der Transkriptionsfaktoren sind angegeben. Die Scheren zeigen die Stellen an, an denen die Transkriptionsfaktoren in AD und BD aufgeteilt wurden. Schematische Darstellung von Rua1 verändert übernommen aus (Teichmann et al., 2010). **B** Western Blot, der die Expression von HA-Rua1 und HA-Ram1 und den hybriden Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle des *etef* Promotors zeigt. Für den Western Blot wurden Proben von OD₆₀₀=1 Zellen nach Inkubation in Vollmedium verwendet. Tubulin diente der Mengenkontrolle.

ein bereits charakterisierter Transkriptionsfaktor, dessen Überexpression ausreicht, um die Produktion der Ustilaginsäuren (UAs) unter Bedingungen zu induzieren, die normalerweise

se keine UA Produktion ermöglichen (Medium mit Ammonium als Stickstoffquelle (Teichmann et al., 2010)). Es wurden chimäre Transkriptionsfaktoren hergestellt, die entweder die Rua1 DNA-Bindedomäne für die Promotoren des UA-Genclusters und die Ram1-Aktivierungsdomäne enthalten oder umgekehrt aufgebaut sind. Sollte die Aktivierung von Ram1 *trans*-Aconitat abhängig sein, müsste ein Transkriptionsfaktor, der die Ram1-Aktivierungsdomäne und die Rua1-DNA-Bindedomäne enthält in einer $\Delta rua1$ -Mutante die Synthese der UAs nur dann induzieren, wenn *trans*-Aconitat im Medium enthalten ist. Falls jedoch die DNA-Bindung durch Ram1 direkt oder indirekt durch *trans*-Aconitat vermittelt würde, müsste die Verwertung von *trans*-Aconitat bzw. die Expression von Aip1-GFP *trans*-Aconitat abhängig bleiben, auch wenn die Aktivierungsdomäne von Rua1 an die DNA-Bindedomäne von Ram1 fusioniert wurde. Zunächst wurde überprüft, ob beide Hybrid-TFs fusioniert an HA in *U. maydis* vergleichbar mit HA-Ram1 exprimiert werden. Ein Western Blot zeigte eine geringere Expression der Hybrid-Transkriptionsfaktoren gegenüber den Vollängenproteinen an (siehe Abb. 2.18b).

Der Hybrid-TF1, bestehend aus Rua1-Aktivierungsdomäne und Ram1-DNA-Bindedomäne war nicht funktionsfähig und konnte den Phänotyp von $\Delta ram1$ Zellen beim Wachstum auf *trans*-Aconitat-haltigem Medium nicht komplementieren (Abb. 2.19).

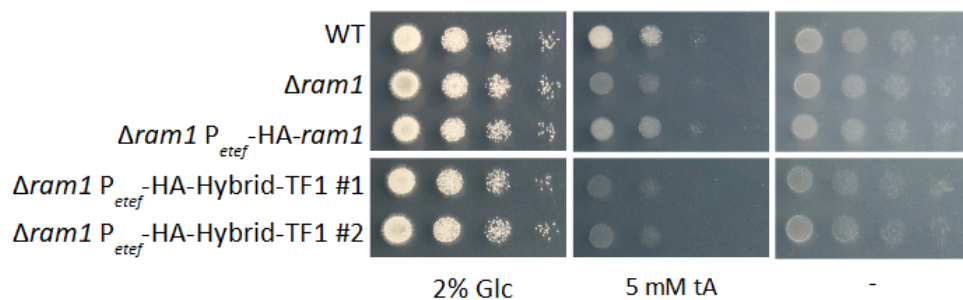


Abbildung 2.19: Hybrid-TF1 ist nicht funktional

Wachstumstest einer $\Delta ram1$ -Mutante, die zusätzlich HA-Ram1 bzw. HA-Hybrid-TF1 exprimiert. Der Stamm war nicht in der Lage vergleichbar mit einem Wildtyp *trans*-Aconitat zu verwerten.

Der Hybrid-TF2 war allerdings funktionsfähig und stimulierte die Synthese von UAs in Anwesenheit von *trans*-Aconitat in $\Delta rua1$ (siehe Abb. 2.20a). Dieses Fusionsprotein war unter den drei getesteten Inkubationsbedingungen (C-Quellen: Glucose; Glucose + *trans*-Aconitat; *trans*-Aconitat) in ähnlicher Menge vorhanden (siehe Abb. 2.20b). Außerdem war dieser chimäre Transkriptionsfaktor in der Lage, die Expression des für die UA-Synthese essentiellen Enzyms Cyp2-GFP (Teichmann et al., 2007) zu stimulieren (siehe Abb. 2.20b,c).

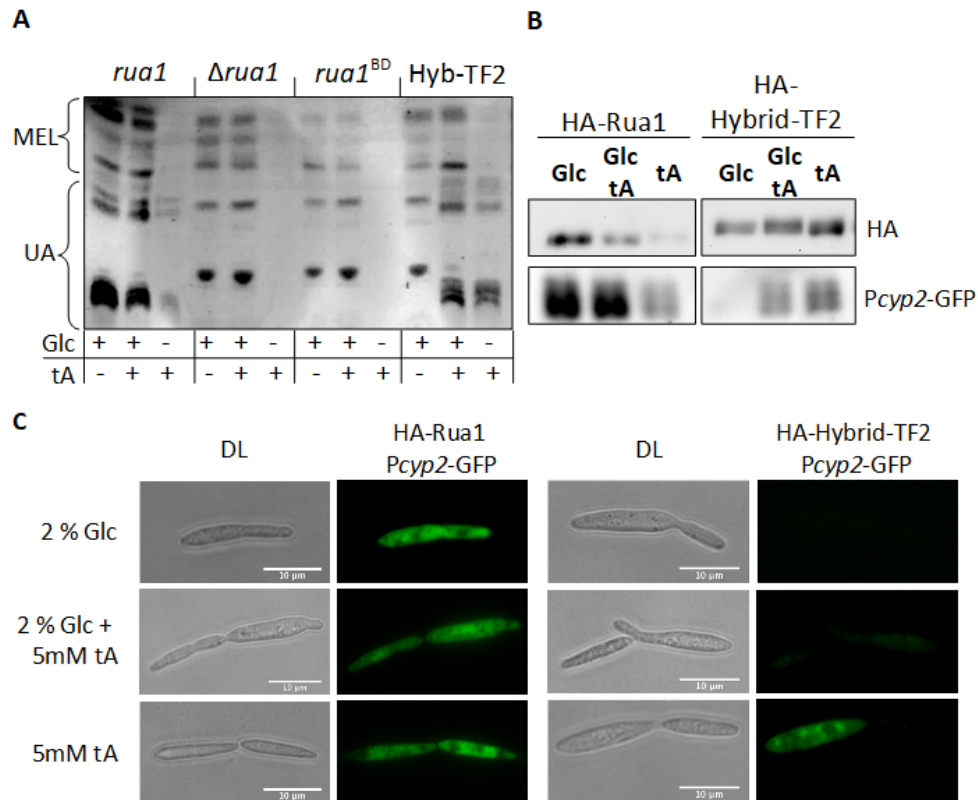


Abbildung 2.20: *Trans*-Aconitat aktiviert die Aktivierungsdomäne von Ram1

a Gezeigt ist eine Dünnschicht-Chromatographie zum Nachweis der von *U. maydis* produzierten UAs. Die gezeigten Stämme, exprimiert unter der Kontrolle des *etef*-Promotors, wurden in Glucose, Glucose mit *trans*-Aconitat und in *trans*-Aconitat als alleinige Kohlenstoffquelle inkubiert. Glycolipide wurden präpariert, auf eine Dünnschicht-Chromatographie Platte aufgetragen und sichtbar gemacht. Die Positivkontrolle war ein Stamm, der Rua1 konstitutiv exprimiert. Dieser Stamm produziert auch in Abwesenheit von *trans*-Aconitat Ustilaginsäuren (UAs). Δ *rua1* Mutanten waren nicht in der Lage UAs herzustellen. Ein Stamm, der die Rua1-Bindedomäne konstitutiv exprimiert, zeigte, dass die Bindedomäne allein die UA-Gene nicht aktiviert. Der konstitutiv exprimierte Hybrid-TF2 konnte abhängig von *trans*-Aconitat UAs synthetisieren. **b** Western Blot zur Detektion des Hybrid-TF2 in *U. maydis*-Zellextrakten und der Cyp2-GFP Expression in Abhängigkeit von Rua1 und Hybrid-TF2. Die Zellen waren zuvor in Medium mit folgenden C-Quellen inkubiert worden: Glucose (Glc), Glucose und *trans*-Aconitat (Glc + tA) und in *trans*-Aconitat (tA). **c** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Expression von Cyp2-GFP in Abhängigkeit von HA-Rua1 und HA-Hybrid-TF2.

2.2.7 Die Region zwischen 800 und 600 Basenpaaren vor dem ORF von *aip1* ist notwendig für eine Erkennung durch Ram1

Um zu untersuchen, welche Promotorbereiche in dem Ram1 regulierten Gen *aip1* potentielle Bindestellen für den Transkriptionsfaktor enthalten, wurden 1000 bp der stromaufwärts gelegenen Region vor den offenen Leserahmen für GFP inseriert. Außerdem wurden Verkürzungen dieser Sequenz mit dem gleichen System kloniert (siehe Abb. 2.21a). Die Expression dieser Konstrukte wurde im Stamm MB215 sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit von *trans*-Aconitat untersucht. Western Blot Analysen und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass potentielle Ram1 Bindestellen in einem Fragment zwischen 800 bp und 600 bp enthalten sind (siehe Abb. 2.21b und c). Eine Verkürzung von 400 bp resultierte nur noch in einem schwachen Signal. Nur bei einem getesteten Fragment von 200 bp war gar keine GFP-Fluoreszenz und kein Signal im Western Blot mehr zu detektieren (siehe Abb. 2.21b und c).

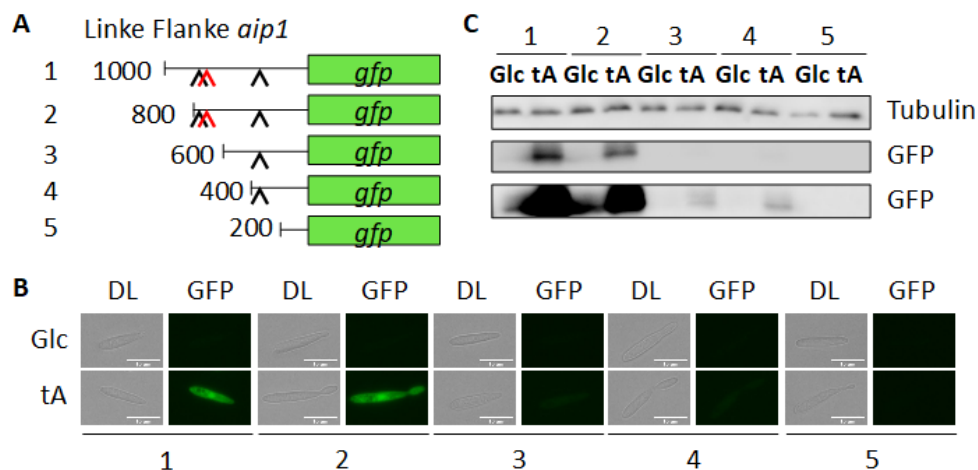


Abbildung 2.21: Eingrenzung der DNA-Bindedomäne von Ram1

A Schematische Darstellung der Konstrukte, die Verkürzungen der stromaufwärts liegenden Bereiche des *aip1* Gens enthalten (1-5). Diese Konstrukte wurden in den *ip*-Lokus des *U. maydis*-Wildtypstammes MB215 transformiert. **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die die GFP-Konstrukte 1-5 enthalten. Ab einer Verkürzung bis zu 600 Basenpaaren vor dem ORF von *aip1* war eine starke Reduktion der GFP-Fluoreszenz zu beobachten. **C** Western Blot zur Detektion der GFP-Expression von Stämmen, die die Reporterstrukture 1-5 enthalten. Die Zellen waren zuvor in Medium mit folgenden C-Quellen inkubiert worden: Glucose (Glc) und *trans*-Aconitat (tA). Tubulin diente der Ladekontrolle.

Typische DNA-Bindestellen für $Zn(II)_2-Cys_6$ Transkriptionsfaktoren bestehen aus zwei konservierten Trinukleotiden, welche meistens in symmetrischer Anordnung vorliegen und dazwischen eine variable Sequenz einer definierten Länge besitzen (Todd and Andrianopoulos, 1997; Yuan et al., 2008). Eine bioinformatische Analyse zeigte, dass sich in den getesteten Sequenzen drei mögliche DNA-Bindemotive für Ram1 befinden (siehe Abb. 2.22). Ein CCGAGACGG-Motiv ist in dem Promotorbereich zwischen *aip1* und *mtt2* zu

finden, deren offene Leserahmen in entgegengesetzter Richtung im *Adi2*-Gencluster lokalisiert sind. Ein solches Element befindet sich auch zwischen den ebenfalls entgegengesetzten Leserahmen von *adi2* und *ram1*. Das Motiv $\text{CGGN}_{11}\text{CCG}$, mit variabler Sequenz zwischen den palindromischen Trinukleotiden, konnte ebenfalls identifiziert werden.

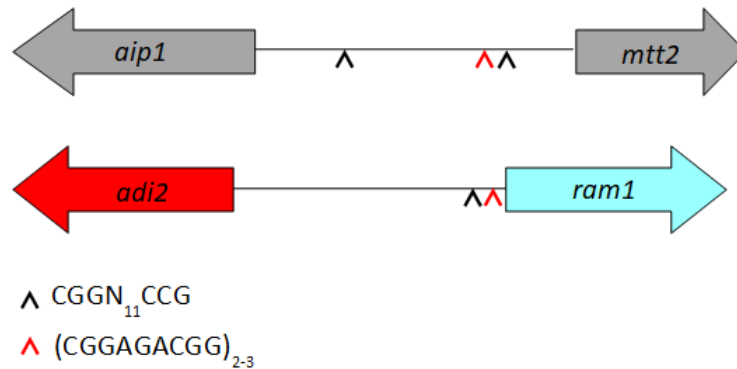


Abbildung 2.22: Potentielle DNA-Bindemotive für Ram1

Gezeigt sind die Promotorregionen zwischen *aip1* und *mtt2* und die zwischen *adi2* und *ram1*. Pfeilköpfe markieren die Stellen an denen typische DNA-Bindemotive vorliegen. Rot markiert ist ein mögliches DNA-Bindemotiv, welches in allen Promotorregionen vorkommt. Schwarz markiert sind die $\text{CGGN}_{11}\text{CCG}$ Motive.

Eine nähere Untersuchung dieser Motive, zum Beispiel durch das Einbringen von Punktmutationen, könnten bestätigen, ob es sich dabei tatsächlich um Ram1-Bindemotive handelt.

3 Diskussion

3.1 Charakterisierung eines Genclusters, der für die Aufnahme und Verstoffwechslung von *trans*-Aconitat zuständig ist

In dieser Arbeit gelang die funktionelle Charakterisierung eines Genclusters für den Katabolismus der ungesättigten Carbonsäure *trans*-Aconitat in *U. maydis*. Importiert wird *trans*-Aconitat über den Membrantransporter Aip1 (Um10608) in das Cytosol. Dort führt die Aconitat- Δ -Isomerase Adi2 (Um02807) die Isomerisierung von *trans*-Aconitat zu *cis*-Aconitat durch, welches anschließend durch den mitochondrialen Transporter Mtt2 (Um02806) in die Mitochondrien transportiert werden kann. Die Gene des Adi2-Genclusters werden durch einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor Ram1 (Um02808) reguliert, dessen Funktion als Regulator von der Anwesenheit von *trans*-Aconitat abhängig ist.

3.1.1 Der Abbau von *trans*-Aconitat benötigt in *U. maydis* drei Proteine

Für den ersten Schritt im Metabolismus von *trans*-Aconitat wird der Plasmamembran-Transporter Aip1 verwendet, der zur MFS-Familie gehört. Derartige Transporter können die Diffusion von Substraten durch Membranen erleichtern oder auch aktiven Transport vermitteln (Pao et al., 1998). Für das in der Plasmamembran lokalisierende Aip1 konnte gezeigt werden, dass es spezifisch den Transport von *trans*-Aconitat durch die Plasmamembran in das Cytosol ermöglicht. In seiner Abwesenheit ist Wachstum auf *trans*-Aconitat nicht möglich. Mit HPLC basierten Analysen wurde ferner nachgewiesen, dass nicht *cis*-Aconitat sondern nur der darin enthaltene *trans*-Aconitat Anteil von *U. maydis* aufgenommen wird.

Adi2, welches bereits zuvor als Aconitat- Δ -Isomerase beschrieben wurde, ist wie das Homolog Adi1 aus dem Itaconsäure-Gencluster von *U. maydis* in der Lage, *cis*-Aconitat bzw. *trans*-Aconitat zu isomerisieren (Geiser et al., 2016; Przybilla, 2014). Schon vor einigen Jahrzehnten wurde postuliert, dass die Biosynthese von *trans*-Aconitat mithilfe

einer Aconitat-Isomerase über das Citratzyklus-Intermediat *cis*-Aconitat gebildet wird (Klinman and Rose, 1971; Rao and Altekar, 1961). Im Gegensatz dazu wird das importierte *trans*-Aconitat durch Adi2 im Cytosol zu *cis*-Aconitat isomerisiert. Dieser Schritt ist ebenfalls essentiell für das Wachstum von *U. maydis*-Zellen, welche *trans*-Aconitat als alleiniger Kohlenstoffquelle ausgesetzt sind. Das durch Adi2 hergestellte *cis*-Aconitat kann in den Zellen vermutlich als Energiequelle dienen. Hierzu muss das Substrat zunächst in die Mitochondrien transportiert werden, in denen der Citratzyklus abläuft. Für den Transportvorgang ist wahrscheinlich der mitochondriale Transporter Mtt2 zuständig. Der Transportmechanismus von Mtt2 wurde bisher noch nicht untersucht. Es wurden jedoch schon Transporter charakterisiert, die das dem *trans*-Aconitat ähnliche Citrat in die Mitochondrien überführen und dabei Malat ins Cytosol freigeben (Kornacker and Ball, 1965). Ein vergleichbarer Mechanismus ist vorstellbar. Er würde zudem das Auffüllen wichtiger anaboler Stoffwechselwege wie etwa der Gluconeogenese beim Wachstum von *trans*-Aconitat als alleiniger Kohlenstoffquelle garantieren.

Die Deletion von *mtt2* führte zu einer verminderten Aufnahme von *trans*-Aconitat. Die Anhäufung von *cis*-Aconitat in den Zellen könnte zu einer Sättigung von Adi2 im Cytosol führen und damit indirekt den Import durch Aip1 inhibieren. Das Substrat müsste also durch Import in die Mitochondrien aus dem chemischen Gleichgewicht entfernt werden. Es ist sogar denkbar, dass Aip1 *trans*-Aconitat auch exportieren kann. Ob der an der Itaconsäurebiosynthese beteiligte sehr ähnliche mitochondriale Transporter Mtt1, welcher für den mitochondrialen Export von *cis*-Aconitat ins Cytosol zuständig ist (Przybilla, 2014), auch den Import dieses Substrats übernehmen kann, wurde in dieser Arbeit nicht adressiert. Dies ließe sich jedoch *in vivo* durch Komplementations-Experimente zeigen. Aus RNA-Seq-Daten wird deutlich, dass die Gene der beiden Gencluster für die Synthese von Itaconat und den Abbau von *trans*-Aconitat während des Lebenszyklus von *U. maydis* nicht zur selben Zeit exprimiert werden (Lanver et al., 2018). Daher müssten diese Komplementations-Experimente mit konstitutiven Promotoren durchgeführt werden.

3.1.2 Die biologische Funktion des Adi2-Genclusters

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle Gene des Adi2-Genclusters für das Wachstum von *U. maydis* auf *trans*-Aconitat als einziger Kohlenstoffquelle notwendig sind. Demnach bietet dieser Gencluster einen Vorteil für das Überleben, wenn *trans*-Aconitat als maßgebliche Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Bereits seit vielen Jahren ist bekannt, dass viele Pflanzen, unter anderem auch Mais, größere Mengen von *trans*-Aconitat produzieren (Brauer and Teel, 1981; Thompson et al., 1990, 1997). Der biosynthetische Ursprung und die physiologische Relevanz von *trans*-Aconitat sind allerdings noch unklar. Es wurde spekuliert, dass *trans*-Aconitat in Pflanzen alkalische Verbindungen, die von Wurzeln auf-

genommen werden, neutralisieren kann (Miller and Cantor, 1951). In der Hühnerhirse soll *trans*-Aconitat als Antifraßstoff gegen den Reispest-Grashüpfer wirken (Kim et al., 1976). Daher erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass der Maisbeulenbranderreger *U. maydis* den Gencluster für den Stoffwechsel von *trans*-Aconitat besitzt, um diesen Metaboliten als ungewöhnliche Kohlenstoffquelle in seiner typischen Umwelt der Maispflanze zu verwerten. Mikroorganismen sind in der Lage, eine große Anzahl an alternativen Rohstoffen als Nahrungsquellen zu nutzen. Filamentöse Pilze besitzen beispielsweise Stoffwechselwege, um Nährstoffe mit geringem molekularen Gewicht als Kohlenstoffquelle nutzen zu können, wie Prolin oder Ethanol. Dies ist für das Überleben unter Nährstoffmangelbedingungen besonders wichtig (Keller and Hohn, 1997). Der mit *U. maydis* verwandte Pilz *S. reilianum*, der ein homologes Gencluster zum Abbau von *trans*-Aconitat enthält, befällt ebenfalls Maispflanzen (Schirawski et al., 2010). Die Idee, dass *trans*-Aconitat als ungewöhnliche Nahrung dient, ist wahrscheinlicher als die Hypothese, dass der Cluster vornehmlich zum Schutz gegen toxisches *trans*-Aconitat evolviert ist. Mit Aip1 codiert er für ein spezifisches Transportprotein. Die Deletion des zugehörigen Gens führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *trans*-Aconitat. Das heißt, dass die Toxizität von *trans*-Aconitat für *U. maydis* zum Teil durch das Vorhandensein des Adi2-Genclusters begründet werden kann.

3.1.3 Warum wirkt *trans*-Aconitat toxisch?

Die ungesättigte Carbonsäure *trans*-Aconitat ist ein Isomer von *cis*-Aconitat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus (Altekar and Rao, 1963), welches durch die Aconitase synthetisiert wird (Saffran and Prado, 1949; Sugimoto et al., 2014). Es ist bekannt, dass *trans*-Aconitat ein starker Inhibitor der Aconitase (Lauble et al., 1994; Saffran and Prado, 1949) und der Fumarase (Rebholz and Northrop, 1994) ist. In dem Pflanzenparasiten *Meloidogyne incognita* konnte nachgewiesen werden, dass das durch den als Nematodenpathogen bekannten *Bacillus thuringiensis* produzierte *trans*-Aconitat tödlich wirkt (Du et al., 2017). Sobald *trans*-Aconitat in den Zellen akkumuliert, muss *trans*-Aconitat durch Methylierung (Cai and Clarke, 1999) oder durch Export entfernt werden, um den Ablauf des Citratzyklus zu gewährleisten. Es wurde also vermutet, dass *trans*-Aconitat seine toxische Wirkung in den Mitochondrien entfaltet, indem es den Citratzyklus inhibiert. Es war daher überraschend, dass $\Delta adi2 \Delta mtt2$ -Doppelmutanten eine mit einer $\Delta adi2$ -Mutante vergleichbare Sensitivität gegenüber *trans*-Aconitat aufwiesen. Dieses Ergebnis bedeutet, dass *trans*-Aconitat bereits im Cytosol der Doppelmutante eine toxische Wirkung zu haben scheint. Aus *Saccharomyces cerevisiae* ist bekannt, dass die Fumarase und die Aconitase neben den Mitochondrien, auch im Cytosol vorkommen und dort vom Citratzyklus abweichende Funktionen erfüllen (Regev-Rudzki et al., 2005; Sass et al., 2001; Stein et al., 1994; Yogev et al., 2010). Auch in *U. maydis* könnte sowohl die Fumarase,

als auch die Aconitase, teils im Cytosol vorliegen und dort von *trans*-Aconitat in ihrer Funktion inhibiert werden.

3.1.4 Evolution des Adi2-Genclusters

In einigen Bakterien, wie z.B. einigen *Pseudomonas*-Spezies, konnte die Produktion von *trans*-Aconitat schon vor vielen Jahren nachgewiesen werden (Klinman and Rose, 1971; Rao and Altekar, 1961). Die Anwesenheit einer hierzu benötigten Aconitat-Isomerase ermöglicht es diesen Bakterien zudem, auf *trans*-Aconitat-haltigem Medium zu wachsen (Watanabe et al., 1997; Yuhara et al., 2015). Durch eine Sequenzanalyse fanden sich im Genom von verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies ähnliche Proteine, die 16% bis 36% identische Aminosäuren zu Adi2 aufweisen und ebenfalls zur Familie der PrpF-Proteine gehören. Im Jahr 2016 wurde auf der Suche nach neuen Nematoziden zufällig entdeckt, dass *Bacillus thuringiensis* *trans*-Aconitat als Virulenzfaktor gegen Nematoden produziert (Du et al., 2017). Die Gene für die Produktion von *trans*-Aconitat sind in *B. thuringiensis*, ähnlich zu dem Adi2-Gencluster in *U. maydis*, in einem für Bakterien typischen Operon angeordnet. Es beinhaltet zum einen eine Aconitat-Isomerase, die *cis*-Aconitat aus dem Citratzyklus zu *trans*-Aconitat isomerisiert (TbrA), sowie einen Transporter, welcher *trans*-Aconitat aus den Zellen exportiert (TbrB, siehe Abb. 3.1). TbrA weist 29% Ähnlichkeit zu Adi2 auf und TbrB 14% zu Aip1. Die Aminosäureidentitäten zwischen den Proteinen aus *Pseudomonas* und *B. thuringiensis* sind im Vergleich höher: 27-42% für Isomerasen der PrpF-Familie, 24-25% für Transporter. Da es sich bei dem Membrantransporter TbrB aus *B. thuringiensis* und dessen Homolog aus *Pseudomonas aeruginosa*, nicht wie bei Aip1 um Transporter der MFS-Familie, sondern um Transporter der DMT (*Drug/Metabolite Transporter*) Familie handelt (Jack et al., 2001), ist die höhere Aminosäureidentität zwischen diesen Transportern nicht überraschend. Dennoch sind sie sich in ihrer Aufgabe, dem Transport von Metaboliten, alle ähnlich. Homologe für die am *trans*-Aconitat-Metabolismus beteiligten Gene konnten mit hoher Aminosäureidentität auch in nah verwandten Pilzarten wie *S. reilianum* und *P. hubeiensis* gefunden werden. In diesen Basidiomyceten ist zudem die Struktur als Gencluster konserviert. Aufgrund dieser Analysen scheint es wahrscheinlich, dass die Gene durch horizontalen Gentransfer von Prokaryoten auf Eukaryoten weitergegeben wurden. Es wurde spekuliert, dass das Erhalten einer Cluster-Struktur über eine lange Zeit und über verschiedene Organismen hinweg auch die Erhaltung der Gene des jeweiligen Biosyntheseweges bewirkt, was dem produzierenden Organismus einen selektiven Vorteil verschafft (Walton, 2000). In Prokaryoten zählen zu den sogenannten *selfish operons*, die nicht unbedingt einen selektiven Vorteil für den Donor Organismus bringen, aber einen starken Vorteil für den Erhalt der Gene, Operons, die für den Abbau von seltenen Kohlenstoffquellen zuständig sind, welche

nur unter spezifischen, selten auftretenden Umweltbedingungen vorkommen (Lawrence and Roth, 1996). Dies ist auch bekannt für Gencluster, die in Pilzen für den Katabolismus von selten vorkommenden Kohlenstoffquellen, wie die Chinasäure oder Shikimisäure, zuständig sind. Die Biosynthesewege dieser beiden Stoffe sind ebenfalls Glucose reprimiert und die Transkription der an der Biosynthese beteiligten Gene wird durch die Anwesenheit von drei verschiedenen, am Biosyntheseweg beteiligten, Stoffen induziert (Keller and Hohn, 1997).

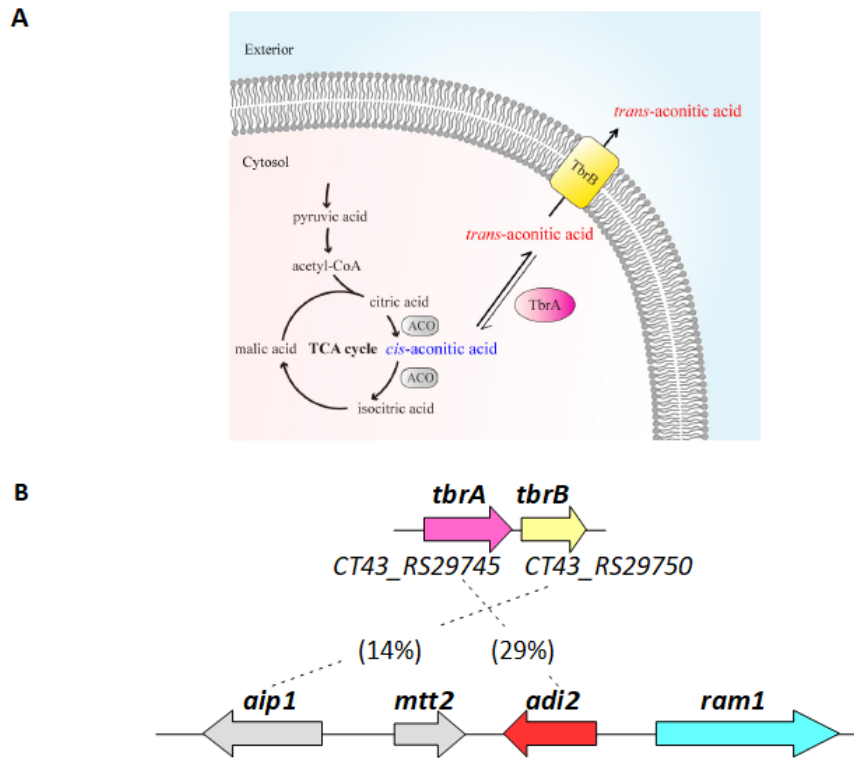


Abbildung 3.1: Modell des *trans*-Aconitat Biosyntheseweges in *B. thuringiensis*

A Das im Citratzyklus synthetisierte *cis*-Aconitat kann teilweise mithilfe der Aconitat-Isomerase TbrA zu *trans*-Aconitat isomerisiert werden. Anschließend wird *trans*-Aconitat durch den Membrantransporter TbrB aus den Zellen exportiert (nach Du et al. (2017)). **B** Dargestellt ist die Anordnung der Gene des *Adi2*-Genclusters im Genom von *U. maydis* im direkten Vergleich zu dem entsprechenden Operon in *B. thuringiensis*. Die Sequenzidentität auf Aminosäureebene zwischen den Genclustern ist angegeben.

3.2 Regulierung des *trans*-Aconitat Metabolismus durch Ram1 und *trans*-Aconitat

3.2.1 Ram1 ist ein Zn(II)₂-Cys₆ Transkriptionsfaktor

In dieser Arbeit wurde der in dem Adi2-Gencluster vorliegende Transkriptionsfaktor Ram1 und seine Abhängigkeit von dem Substrat *trans*-Aconitat genauer charakterisiert. Ram1 gehört zur Familie, die ein Zn(II)₂-Cys₆ binukleares Cluster als DNA-Bindemotiv haben, welches ausschließlich in pilzlichen Proteinen, vor allem in transkriptionellen Regulatoren, zu finden ist (Todd and Andrianopoulos, 1997). Zn(II)₂-Cys₆-Proteine sind typisch für die Regulation von Enzymen des Sekundärmetabolismus. So werden zum Beispiel Enzyme für den Aflatoxin Biosyntheseweg in *Aspergillus flavus* (Woloshuk et al., 1994) oder Enzyme für den Metabolismus von Ethanol (Felenbok et al., 1988) durch einen Zn(II)₂-Cys₆ Transkriptionsfaktor reguliert. In *U. maydis* ist Ram1 für die Regulation der am Metabolismus von *trans*-Aconitat beteiligten Enzyme notwendig. Eine Deletion von *ram1* führte dazu, dass *U. maydis* nicht mehr in der Lage war, *trans*-Aconitat als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Przybilla, 2014). Auch die HPLC-Analysen dieser Arbeit machen die essentielle Funktion deutlich. In *A. niger* ist der ähnliche Zn(II)₂-Cys₆ Transkriptionsfaktor InuR essentiell für den Stoffwechsel des Polysaccharid-Gemisches Inulin (Yuan et al., 2008). In *U. maydis* ist der Transkriptionsfaktor Rua1 erforderlich für die Biosynthese der Ustilaginsäuren (UAs) und wird innerhalb des UA-Clusters codiert (Teichmann et al., 2010). Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass der Adi2-Gencluster zu den typischen pilzlichen Genclustern gehört, die häufig einen eigenen Transkriptionsfaktoren mitbringen (Brakhaage, 2013; Kjærboelling et al., 2019). Ob Ram1 auch noch Gene außerhalb dieses Genclusters kontrolliert ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden. Dies ließe sich aber zum Beispiel durch RNA-Sequenzierung aus dem WT im Vergleich mit einer $\Delta ram1$ Deletionsmutante testen.

Das erste charakterisierte Beispiel für Zn(II)₂-Cys₆-Transkriptionsfaktoren ist das GAL4 Protein von *S. cerevisiae*, mit der Anordnung CX₂CX₆CX₆CX₂CX₆C (Gardner et al., 1991; Pan and Coleman, 1990). Die ersten und die letzten drei Cysteinreste bilden dabei jeweils eine kleine α -helikale Struktur (siehe Abb. 3.2) (Baleja et al., 1992; Kraulis et al., 1992; Marmorstein et al., 1992).

Die Anordnung der Cysteinreste ist in Zn(II)₂-Cys₆ Transkriptionsfaktoren mit dem Muster CX₂CX₆CX₅₋₁₆CX₂CX₆₋₈C konserviert (Todd and Andrianopoulos, 1997). Auch Ram1 besitzt dieses Muster in der DNA-Bindedomäne (CX₂CX₆CX₅CX₂CX₈C). Ein Sequenzvergleich zu homologen Proteinen naher verwandter Pilze zeigte, dass eine Anordnung der Cysteine vergleichbar mit Ram1 ist. Für den bereits erwähnten Transkriptionsfaktor

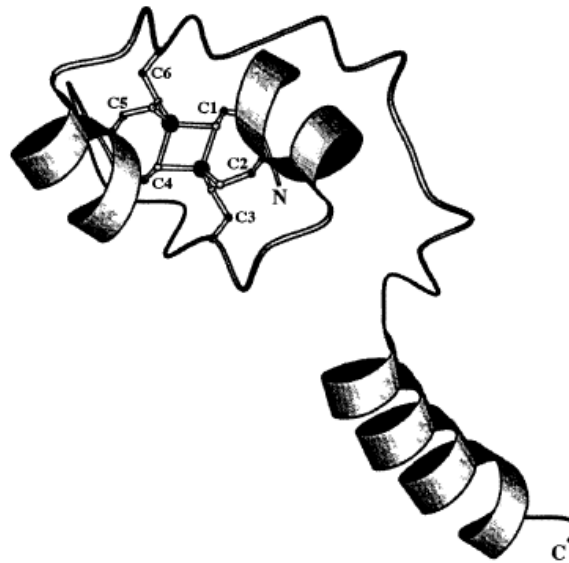


Abbildung 3.2: Modell des GAL4 Proteins als Beispiel für ein $Zn(II)_2$ -Cys₆ binukläres Cluster Protein

Gezeigt ist das Modell der prototypischen GAL4 $Zn(II)_2$ -Cys₆ Cluster DNA-Bindedomäne, welche sich immer im N-terminalen Bereich der Proteine befindet. Die sechs hoch konservierten Cysteine (C1-C6) koordinieren zwei Zinkionen (schwarze große Kreise) in der Mitte der Struktur. Die räumliche Struktur der DNA-bindenden Domäne wird dabei durch zwei kurze α -Helices gebildet, die die Zinkionen umgeben. Das carboxy- (C) und amino-(N)-terminale Ende des Proteins ist jeweils gekennzeichnet. Die Abbildung wurde übernommen aus Todd and Andrianopoulos (1997).

InuR konnte anhand von Vergleichen mit anderen ähnlichen transkriptionellen Regulatoren eine DNA-Bindestelle in den Promotorregionen der Inulin-Clustergene postuliert werden. Die postulierte DNA-Bindestelle CGGN₈CGG konnte in allen Promotorregionen der Gene für den Katabolismus von Inulin identifiziert werden. DNA-Bindestellen mit einem CGGN_xCGG Motiv sind für $Zn(II)_2$ -Cys₆ Transkriptionsfaktoren typisch (Ito et al., 2004; Todd and Andrianopoulos, 1997). Um mögliche Elemente in den Promotorregionen der *Adi2*-Clustergene zu finden, die die Bindung von Ram1 vermitteln, wurde eine *in silico* Analyse der Sequenzen 1 kb upstream der Gene durchgeführt. Die für die Bindung von Ram1 benötigte Sequenz in der Promotorregion von *aip1* konnte mithilfe von GFP-Fusionen auf die Region 600-800 Basenpaare aufwärts des offenen Leserahmens von *aip1* eingegrenzt werden. Durch eine Sequenzanalyse dieses Bereichs wurden mehrere mögliche Motive für DNA-Bindestellen von Ram1 identifiziert. Eines dieser Motive konnte zudem ebenfalls in der Promotorregion von *adi2* gefunden werden. Hierbei handelt es sich um ein sich wiederholendes Motiv von CGGAGACGG. In beiden Promotorregionen ist außerdem ein CGGN₁₁CCG Motiv zu finden, welches auch das DNA-Bindemotiv von GAL4 und LAC9 aus *S. cerevisiae* bildet (Halvorsen et al., 1991; Marmorstein et al., 1992). Da *mtt2* und *aip1* bzw. *adi2* und *ram1* gemeinsame Promotorregionen besitzen, sind

diese beiden Motive somit in allen Promotorregionen des *Adi2*-Genclusters zu finden. Gezielte Punktmutationen in diesen Motiven oder ganze Motiv-Deletionen wären nützlich, um aufzuklären, ob es sich bei diesen Elementen um DNA-Bindemotive für Ram1 handelt. Zn(II)₂-Cys₆ Regulatoren besitzen neben der meist N-terminal gelegenen DNA-Bindedomäne außerdem eine Aktivierungsdomäne (Pfeifer et al., 1989; Qui et al., 1991; Sze et al., 1993). In dieser befindet sich oft eine zweite konservierte Domäne, die als *middle homology region* (MHR) bekannt ist und der DNA-Bindedomäne, durch Verringern der Bindeaffinität zu falschen Sequenzen zwischen den CGG-Triplets, bei der DNA-Bindung helfen soll (Schjerling and Holmberg, 1996; Yuan et al., 2008). Auch eine solche Domäne konnte in Ram1 gefunden werden. Die Annahme, dass die MHR bei der DNA-Bindung unterstützend wirken soll, könnte erklären, warum ausschließlich das Ram1 Vollängenprotein, aber keine der Ram1-Verkürzungen, in der Lage war, *trans*-Aconitat als Kohlenstoffquelle zu nutzen. In GAL4 aus *S. cerevisiae* sind neben dem C6-Zinkcluster, welches das CGG Triplet bindet, und der MHR zusätzlich eine linker Region, welche die Basensequenz zwischen den CGG Triplets bestimmt, und *coiled-coils*, die für eine Dimerbildung verantwortlich sind, zu finden (Reece and Ptashne, 1993; Schjerling and Holmberg, 1996). Durch Sequenzvergleiche und Domänenvorhersagen verschiedener Proteine, konnten diese vier Domänen in einer großen Zahl von Transkriptionsfaktoren der Zn(II)₂-Cys₆-Familie identifiziert werden (Schjerling and Holmberg, 1996). Aus diesen Informationen war es möglich, ein Modell für die DNA-Bindung dieser Familie zu postulieren (siehe Abb. 3.3).

Da in Ram1 neben dem C6-Zinkcluster und der MHR keine weitere der vier Domänen bisher entdeckt wurde, konnte bisher nicht gezeigt werden, ob auch Ram1 als Dimer bindet und diese Art von DNA-Bindung ebenfalls stattfindet. Anstelle der *coiled-coils* Domäne könnte in *U. maydis* auch *trans*-Aconitat für die Dimerbildung von Ram1 unterstützend wirken. Diese Hypothese ließe sich zum Beispiel *in vitro* überprüfen. Man könnte eine mögliche Dimerbildung beispielsweise mit einer Chromatographie in Anwesenheit und Abwesenheit von *trans*-Aconitat untersuchen.

3.2.2 Regulation von Ram1

Wie Ram1 und somit auch der Mechanismus, der die Spezifität der DNA-Bindung der *Adi2*-Clustergene bestimmt, aktiviert wird, wurde anschließend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Ram1 auch in Abwesenheit von *trans*-Aconitat basal exprimiert wird. In Anwesenheit von *trans*-Aconitat war die Expression von Ram1 deutlich erhöht. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und *trans*-Aconitat war weniger Ram1 detektierbar. Da ungewöhnliche Nährstoffquellen, wie zum Beispiel auch *trans*-Aconitat nicht immer zugänglich sind, haben Pilze ein komplexes regulatorisches System entwickelt, um auf sich verändernde Umweltbedingungen zu reagieren und die unnötige

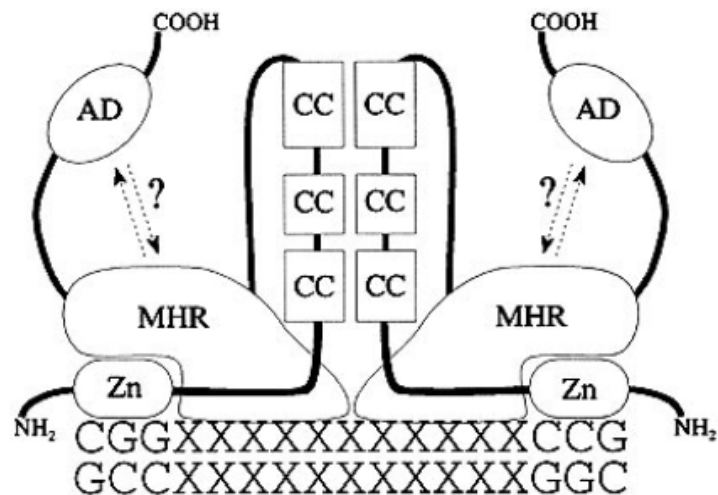


Abbildung 3.3: Modell für die DNA-Bindung von C6 Zinkcluster-Proteinen

Zu sehen, ist ein Modell, das die DNA-Bindung von C6-Zinkcluster-Proteinen zeigt. Das C6 Zinkcluster (Zn) erkennt die CGG-Triplets. Die Basensequenz zwischen den Triplets, wird durch die Linker-Region zwischen den *coiled-coils* (CC) und dem C6-Zinkcluster bestimmt. Die spezifische Struktur der CC sind Verantwortlich für die Dimerisierung. Die MHR interagiert mit dem C6-Zinkcluster und der Linker-Region, was die Bindung an falsche CGGN_xCGG-Sequenzen verhindert. Außerdem soll die MHR eine regulatorische Rolle gemeinsam mit der Aktivierungsdomäne (AD) teilen. Abbildung übernommen aus Schjerling and Holmberg (1996).

Expression von Biosynthesewegen gering zu halten. Daran beteiligt sind unter anderem Transkriptionsfaktoren, die auf bestimmte Umweltsignale reagieren, wie beispielsweise CreA (Dowzer and Kelly, 1991) auf Kohlenstoff oder AreA (Hynes, 1975) auf Stickstoff. Diese Transkriptionsfaktoren können Gencluster je nach Anwesenheit einer besseren Kohlenstoffquelle sowohl positiv als auch negativ regulieren (Keller and Hohn, 1997; Yin and Keller, 2011). So kann beispielsweise AreA in Anwesenheit von Ammonium oder Glutamin die Synthese verschiedener Enzyme des Stickstoffmetabolismus unterdrücken (Wilson and Arst, 1998). Dieses regulatorische Prinzip ermöglicht, dass Biosynthesewege zur Nutzung von Nährstoffen auf die Anforderungen des generellen, zellulären Metabolismus und auf die Anwesenheit von spezifischen Biosyntheseweg-Induktoren antworten (Keller and Hohn, 1997). Ähnlich scheint auch der *trans*-Aconitat-Metabolismus in *U. maydis* organisiert zu sein. Zum einen wird der *trans*-Aconitat-Metabolismus durch den Transkriptionsfaktoren Ram1 reguliert, zum anderen scheint die Expression der *Adi2*-Clustergene in Anwesenheit von Glucose noch zusätzlich, wenn auch nicht vollständig, reprimiert zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch bei Anwesenheit von Glucose eine geringe Menge *trans*-Aconitat aufgenommen wird und die *Adi2*-Clustergene somit auch in Anwesenheit von Glucose exprimiert werden. Dies lässt sich auch aus der erhöhten Sensitivität von *adi2*-Mutanten bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und *trans*-Aconitat ableiten. Eine geringe Aktivität des Clusters ist auch bei Glucose als primärer C-Quelle notwendig,

um die Zellen vor *trans*-Aconitat zu schützen.

Überraschenderweise war die konstitutive Expression von *ram1* unter Kontrolle des *etef*-Promotors nicht ausreichend, um die *Adi2*-Clustergene zu induzieren, sondern es musste zusätzlich *trans*-Aconitat vorhanden sein. Es ergeben sich aus dieser Beobachtung einige Szenarien, wie *trans*-Aconitat direkt oder indirekt die Expression der Clustergene stimulieren könnte (siehe Abb. 3.4).

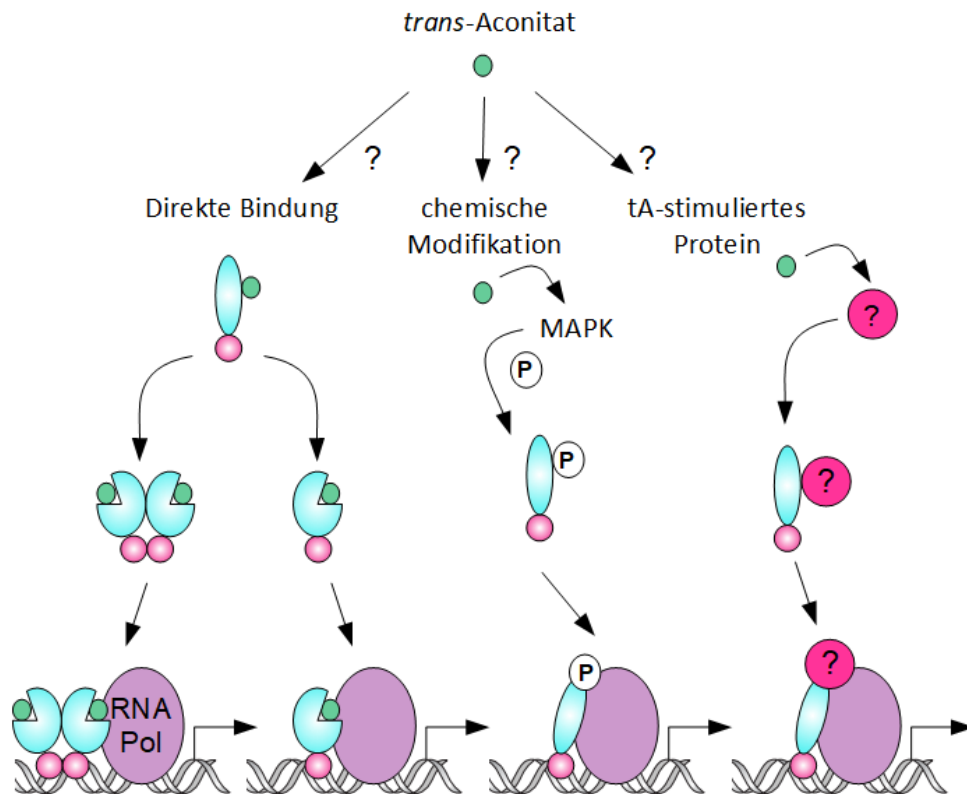


Abbildung 3.4: *trans*-Aconitat beeinflusst die Modifikation von Ram1

Gezeigt sind verschiedene Möglichkeiten, wie die Transkriptionsfaktoraktivität von Ram1 abhängig von *trans*-Aconitat verwirklicht sein könnte. Direkte Bindung könnte zur Dimerisierung zweier Ram1-Moleküle führen, wodurch das für $Zn(II)_2$ -Cys₆ typische CGGN₁₁CCG Motiv in der Promotorregion gebunden werden kann. Es könnte sich jedoch auch nur die Konformation ändern, um die Rekrutierung der Polymerase zu erlauben. Ferner könnte durch chemische Modifikation, wie beispielsweise durch eine Phosphorylierung von Ram1, oder durch ein noch nicht identifiziertes durch *trans*-Aconitat stimuliertes Protein die Transkriptionsfaktoraktivität von Ram1 modifiziert werden.

Es ist möglich, dass es einen bisher nicht identifizierten Faktor rekrutiert oder reguliert, der dann aber nicht im Cluster codiert ist. Diese Möglichkeit ist daher als eher unwahrscheinlich zu erachten, da es sich beim Abbau von *trans*-Aconitat um einen sehr spezifischen Stoffwechselweg handelt, der vermutlich keine außerhalb des Clusters befindlichen Faktoren benötigt; auszuschließen ist die Idee jedoch nicht grundsätzlich. Wahrscheinlicher wäre, dass der Transkriptionsfaktor Ram1 selbst entweder direkt an *trans*-Aconitat bindet oder durch die Anwesenheit von *trans*-Aconitat modifiziert (z. B. phosphoryliert) wird.

Eine hypothetische Phosphorylierung würde wiederum ein zusätzliches *trans*-Aconitat abhängiges modifizierendes Enzym benötigen. Direkte Bindung von Ram1 an *trans*-Aconitat wurde in dieser Arbeit nicht formal gezeigt. Jedoch lieferten Experimente mit chimären Transkriptionsfaktoren wichtige Hinweise für diese Idee. Der Transkriptionsfaktor Rua1 induziert die Bildung von UAs unabhängig von einem zusätzlichen Stimulus, wenn er konstitutiv exprimiert wird (Teichmann et al., 2010). Fusion der Ram1 Aktivierungsdomäne an die DNA-Bindedomäne von Rua1 führte zu einem künstlichen Transkriptionsfaktor, der die Synthese von UAs nur noch in Anwesenheit von *trans*-Aconitat erlaubte. Dies schließt aus, dass die Bindung von Ram1 an die DNA *trans*-Aconitat abhängig verläuft. Viel wahrscheinlicher wird mit diesem Experiment, dass die Aktivierungsdomäne von Ram1 durch Bindung an *trans*-Aconitat aktiv wird. Durch Übertragung des Transkriptionsfaktors auf einen ganz anderen Gencluster, werden hiermit auch zusätzliche Faktoren ausgeschlossen, die zum Beispiel *trans*-Aconitat abhängig an den Adi2-Gencluster binden könnten. Die Aktivierung eines Stoffwechselweges durch Bindung eines Metaboliten wurde auch für den Zn(II)₂-Cys₆ Transkriptionsfaktor Put3p aus *S. cerevisiae* beschrieben. Put3b bindet im inaktiven Zustand, in Abwesenheit von Prolin, an die Promotorregion seiner Targetgene und durchläuft durch Bindung von Prolin eine Konformationsänderung, um die Transkription von Genen zur Nutzung von Prolin, in Abwesenheit von anderen Stickstoffquellen, zu aktivieren (Sellick and Reece, 2005).

Wie der molekulare Mechanismus funktioniert, mit dem *trans*-Aconitat Ram1 aktiviert muss noch genauer untersucht werden. Denkbar ist eine Konformationsänderung, möglicherweise mit dem Resultat der bereits erwähnten Dimerisierung. Da fluoreszenzmikroskopische Analysen gezeigt haben, dass Ram1 in An- und Abwesenheit von *trans*-Aconitat im Kern lokalisiert und die Bindung von Ram1 an die DNA *trans*-Aconitat unabhängig verläuft, könnte ein ähnlicher Mechanismus, wie für Put3p, welcher auch im inaktiven Zustand die DNA bindet, beispielsweise durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP), untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien mit Bezugsquellen

4.1.1 Allgemeine Materialien

Material	Bezugsquelle
Blottingpapier	Roth (Karlsruhe)
Cryo-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Glaspipetten	Brand (Wertheim)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
MobiSpin Columns	MoBiTec (Göttingen)
Nylon-Membran	Roth (Karlsruhe)
Petrischalen	Greiner, Sarstedt (Nümbrecht)
Phosphoimager-Kassetten	Amersham
Pipettenspitzen	Biozym, Sarstedt (Nümbrecht)
PVDF-Membran	Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
Schottflaschen	Schott (Mainz)
Skalpellklingen	Roth(Karlsruhe)
Sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
0,1 ml Mikroeingang (28 x 5 mm) mit Polymerfuß	VWR
Silikon Schraubkappen	VWR
1,5 ml KGW-Flasche	VWR
96-Well Mikrotiterplatte, steril	Greiner

4.1.2 Kits

Zur Präparation von Plasmiden in kleinem Maßstab wurde das ZR-Plasmid Miniprep Kit verwendet. DNA aus Agarose Gelen wurde mit dem Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit präpariert. Labeling von DNA fand mit dem Megaprime Labeling Kit statt. Proteinsignale wurden mit dem SuperSignal West Femto Kit oder mit dem Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate detektiert.

Name des Kits	Bezugsquelle
ZR Plasmid Miniprep-Classic	Zymo Research
Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit	Geneaid
Megaprime Labeling Kit	Amersham (Braunschweig)
SuperSignal West Femto	Thermo Scientific
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific

4.1.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden vornehmlich von Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und waren von der Qualität überwiegend p.a..

4.1.4 Antikörper und Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas/Thermo Scientific (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB, Schwalbach) bezogen. Zur Amplifikation von DNA wurde eine Phusion-DNA-Polymerase aus eigener Laborpräparation verwendet. Dephosphorylierung von DNA erfolgte mit der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) von Fermentas/Thermo Scientific. Das Auffüllen von einzelsträngiger DNA wurde mit dem Klenow-Fragment (NEB) durchgeführt. Der Ligation von DNA-Fragmenten diente die T4-DNA-Ligase von Roche (Mannheim). Bakterielle bzw. pilzliche Zellwände wurden mit Lysozym (Roche) oder Lysing enzymes aus *Trichoderma harzianum* (Sigma Aldrich) degradiert. Der Antikörper α -Tubulin wurde von Calbiochem/Merck (Darmstadt), der HA-Antikörper von abcam und der GFP Antikörper von Torrey Pines Biolabs. Sekundäre Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) bezogen.

4.1.5 Puffer und Lösungen

Für bestimmte Methoden direkt benötigte Puffer sind unter der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt. Andere verwendete Standardlösungen und Puffer wurden nach

Ausubel FM (1987) und (Sambrook, 1989) hergestellt. Wenn nötig wurden die verwendeten Puffer und Lösungen vor ihrer Verwendung für 20 min bei 121°C autoklaviert oder alternativ mit einem Sterilfilter sterilisiert.

4.1.6 Geräte

Geräte, die direkt für bestimmte Methoden verwendet wurden, sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt. Der Zentrifugation von Reaktionsgefäßen (1,5 und 2 ml) diente eine Heraeus Biofuge pico und der Zentrifugation größerer Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) eine Heraeus Multiufuge. Der Erwärmung von Reaktionsgefäßen auf eine definierte Temperatur dienten Thermomixer von Eppendorf (Hamburg).

4.2 Kultivierung von Mikroorganismen

Alle verwendeten Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert.

4.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in dYT-Medium schüttelnd bei 200 Upm bzw. auf dYT-Festmedium bei 37°C. Als Antibiotikum zur Selektion auf Plasmide wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Dauerkulturen wurden nach Zugabe von 50% dYT-Flüssigmedium mit Glycerin bei -80°C gelagert.

dYT-Flüssigmedium

1,6 % (w/v) Trypton-Pepton

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) NaCl

Aqua_[dest.]

(Festmedium: 2 % (w/v) Bactoagar)

dYT-Flüssigmedium mit Glycerin

1,6 % (w/v) Trypton-Pepton

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) NaCl

69,6 % (w/v) Glycerin

Aqua_[dest.]

4.2.2 Kultivierung von *U. maydis*

Flüssigkulturen von *Ustilago maydis* wurden in der Regel in YEPS_{light} Medium angezogen. In den Fällen, in denen die Anwesenheit bzw. die Abwesenheit einer Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle im Medium erforderlich war, wurde YNB-Medium verwendet, dem der entsprechende Stoff zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen bei 30°C und 180 Upm inkubiert. Für die Anzucht auf Festmedium wurde meist Potato-Dextrose(PD)-Agar verwendet, dem bei Bedarf Fungizide, wie Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml) oder Nourseothricin (150 µg/ml) zugesetzt wurden. In besonderen Fällen wurde, aus oben beschriebenen Gründen, YNB-Agar verwendet. Zur Herstellung von *U. maydis* Dauerkulturen wurden Übernachtkulturen im Verhältnis 1:1 mit NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80°C eingefroren. Für fast alle Experimente wurden Kulturen aus der logarithmischen Wachstumsphase mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 1 verwendet. Die Ausnahme bilden hier die Kulturen für die Extraktion von Glykolipiden. Hier wurden Kulturen verwendet, die für drei Tage in YNB-Medium (pH 4,5) mit Kohlenstoffquelle, aber ohne Stickstoffquelle gezogen waren.

YEPS-Flüssigmedium

1,0 % (w/v) Hefeextrakt
2 % (w/v) Pepton
2 % (w/v) Saccharose
Aqua_[dest.]

YNB-Flüssigmedium

0,17 % (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat
als Kohlenstoffquelle wurden verwendet: 2 % Glucose, 5 mM *cis*- bzw. *trans*-Aconitat
Aqua_[dest.]
(Festmedium: 2 % (w/v) Bactoagar)

PD-Festmedium

2,4 % (w/v) Potato Dextrose Broth
2 % (w/v) Bactoagar
Aqua_[dest.]

NSY-Glycerin

0,8 % (w/v) Nutrient Broth
0,1 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) Saccharose

69,9 % (v/v) Glycerin

Aqua_[dest.]

4.2.3 Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Kulturen

Die optische Dichte von Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) oder 550 nm (OD_{550}) bestimmt. Dabei wurden Kulturen über einer OD_{600} bzw. OD_{550} von 1 verdünnt, um einen in etwa linearen Zusammenhang von OD zur Zellzahl sicherzustellen. Als Referenz diente ein nicht bewachsenes Kulturmedium.

4.3 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

4.3.1 *Escherichia coli* - Stämme

Für Klonierungen wurde der Stamm Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem folgenden Genotyp verwendet: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG.

4.3.2 *Ustilago maydis* - Stämme

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten *U. maydis* Stämme aufgeführt. Einige der Stämme stammen aus Zusammenarbeiten mit Sarah-Maria-Wege* und Kevin Korba** (aus von mir betreuten Masterarbeiten und HIWI-Arbeiten). Von den Deletionsmutanten wurden in den meisten Fällen drei, aber mindestens zwei unabhängige Mutanten phänotypisch charakterisiert. Bei Stämmen mit *ip*-Locus Integrationen oder am Genlocus eingebrachte Integrationen, wurde, wenn im Text bemerkt, mit Southern Blot Analyse die Häufigkeit der Integration bestimmt.

Tabelle 4.1: Verwendete *U. maydis*-Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz	Referenz
MB215	<i>a2 b13</i>	/	(Hewald et al., 2005)
MB215 Δ <i>ram1</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>ram1</i>	Hyg ^R	(Przybilla, 2014)
MB215 Δ <i>aip1</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>aip1</i>	Hyg ^R	(Przybilla, 2014)
MB215 Δ <i>adi2</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>adi2</i>	Hyg ^R	(Przybilla, 2014)
MB215 Δ <i>adi2</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>adi2</i>	Gen ^R	Diese Arbeit
MB215 Δ <i>mtt2</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>mtt2</i>	Hyg ^R	(Przybilla, 2014)
MB215 Δ <i>adi2</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>adi2</i>	Gen ^R	Diese Arbeit
MB215 Δ <i>aip1</i> Δ <i>adi2</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>aip1</i> Δ <i>adi2</i>	Hyg ^R , Gen ^R	(Wege, 2018)*
MB215 Δ <i>mtt2</i> Δ <i>adi2</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>mtt2</i> Δ <i>adi2</i>	Hyg ^R , Gen ^R	(Wege, 2018)*
MB215 Δ <i>rua1</i>	<i>a2 b13</i> Δ <i>rua1</i>	Hyg ^R	(Teichmann, 2005)
MB215 Δ <i>mtt2</i> Mtt2-GFP	<i>a2 b13</i> Δ <i>mtt2</i> <i>ip</i> ^R [P _{etef} :: <i>mtt2-gfp</i>] <i>ip</i> ^S	Hyg ^R , Cbx ^R	Sandra Hartmann persönliche Mitteilung
MB215 Δ <i>ram1</i> Pram1-Ram1	<i>a2 b13</i> Δ <i>ram1</i> <i>ip</i> ^R [P _{ram1} :: <i>strep-ram1</i>] <i>ip</i> ^S	Hyg ^R , Cbx ^R	(Wege, 2018)*

MB215 $\Delta ram1$ Pram1-Ram1 ^{AD}	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $ip^R[P_{ram1}::\Delta BD_{strep-ram1}]ip^S$	Hyg ^R , Cbx ^R	(Wege, 2018)*
MB215 $\Delta ram1$ Pram1-Ram1 ^{BD}	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $ip^R[P_{ram1}::\Delta AD_{strep-ram1}]ip^S$	Hyg ^R , Cbx ^R	(Wege, 2018)*
MB215 $\Delta ram1$ Pram1-Ram1 ^{N1-650}	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $ip^R[P_{ram1}::strep-ram1^{N1-650}]ip^S$	Hyg ^R , Cbx ^R	(Wege, 2018)*
MB215 $\Delta ram1$ Pram1-HA ₂ -Ram1	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $ip^R[P_{ram1}::ha_2-ram1]ip^S$	Hyg ^R , Cbx ^R	(Wege, 2018)*
MB215 Paip1-aip1-GFP	<i>a2 b13</i> $P_{aip1}::aip1-egfp$	Nat ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta ram1$ Petef-GFP-Ram1	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $ip^R[P_{etef}::egfp-ram1]ip^S$	Hyg ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta ram1$ Petef-Ram1-GFP	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $ip^R[P_{etef}::ram1-egfp]ip^S$	Hyg ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta ram1$ Petef-HA-Ram1	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $ip^R[P_{etef}::ha-ram1]ip^S$	Hyg ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta ram1$ Paip1-aip1-GFP	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $P_{aip1}::aip1-egfp$	Hyg ^R , Nat ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta ram1$ Paip1-aip1-GFP Petef-HA-ram1	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $P_{aip1}::aip1-egfp$ $ip^R[P_{etef}::ha-ram1]ip^S$	Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta ram1$ Paip1-aip1-GFP Petef-HA-Hybrid-TF1	<i>a2 b13</i> $\Delta ram1$ $P_{aip1}::aip1-egfp$ $ip^R[P_{etef}::ha-\Delta BD_{rua1}\Delta AD_{ram1}]ip^S$	Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
MB215 P _{cyp2} -GFP	<i>a2 b13</i> $P_{cyp2}::egfp$	Gent ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta rua1$ P _{cyp2} -GFP	<i>a2 b13</i> $\Delta rua1$ $P_{cyp2}::egfp$	Hyg ^R , Gent ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta rua1$ P _{cyp2} -GFP Petef-HA-Rua1	<i>a2 b13</i> $\Delta rua1$ $P_{cyp2}::egfp$ $ip^R[P_{etef}::ha-rua1]ip^S$	Hyg ^R , Gent ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
MB215 $\Delta rua1$ P _{cyp2} -GFP Petef-HA-Hybrid-TF2	<i>a2 b13</i> $\Delta rua1$ $P_{cyp2}::egfp$ $ip^R[P_{etef}::ha-\Delta AD_{rua1}\Delta BD_{ram1}]ip^S$	Hyg ^R , Gent ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit

MB215 $\Delta rua1$ Pcyp2-GFP Petef-HA-BDrual	<i>a2 b13</i> $\Delta rua1$ P _{cyp2} :: <i>egfp</i> <i>ip</i> ^R [P _{etef} :: <i>ha-AD_{rua1}</i>] <i>ip</i> ^S	Hyg ^R , Gent ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
MB215 Paip1 ₍₁₀₀₀₎ -GFP	<i>a2 b13</i> <i>ip</i> ^R [P _{aip1(1000)} :: <i>egfp</i>] <i>ip</i> ^S	Cbx ^R	Diese Arbeit**
MB215 Paip1 ₍₈₀₀₎ -GFP	<i>a2 b13</i> <i>ip</i> ^R [P _{aip1(800)} :: <i>egfp</i>] <i>ip</i> ^S	Cbx ^R	Diese Arbeit**
MB215 Paip1 ₍₆₀₀₎ -GFP	<i>a2 b13</i> <i>ip</i> ^R [P _{aip1(600)} :: <i>egfp</i>] <i>ip</i> ^S	Cbx ^R	Diese Arbeit**
MB215 Paip1 ₍₄₀₀₎ -GFP	<i>a2 b13</i> <i>ip</i> ^R [P _{aip1(400)} :: <i>egfp</i>] <i>ip</i> ^S	Cbx ^R	Diese Arbeit**
MB215 Paip1 ₍₂₀₀₎ -GFP	<i>a2 b13</i> <i>ip</i> ^R [P _{aip1(200)} :: <i>egfp</i>] <i>ip</i> ^S	Cbx ^R	Diese Arbeit**

4.3.3 Plasmide

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide dargestellt und zugehörige Referenzen angegeben.

Tabelle 4.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pJet2.1	Amp	Fermentas
pJET2.1-LF+3xGFP-Hyg+RF	Amp, Hyg	(Büttner, 2017)
pRS426	Amp, Ura3	(Sikorski and Hieter, 1989)
pRS426-Genitacin-02808	Amp, Gen	(Przybilla, 2014)
pETEF-GFP-Ala6-MMXN (1742)	Amp, Cbx	Laborsammlung
pMF5-1n	Amp, Nat	(Brachmann et al., 2004)
pMF1-G	Amp, Gen	(Baumann et al., 2012)
pETEF-HA/HA ₂ -GFP-Ala6-MMXN	Amp, Cbx	Julia Ast, persönliche Mitteilung
pCRG-02808-Cbx	Amp, Cbx	Sandra Przybilla, persönliche Mitteilung
pTEF-GFP-MMXN-si (single integration)	Amp, Cbx	Thorsten Stehlik, persönliche Mitteilung

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide mit verwendeten Oligonukleotiden und Klonierungsstrategien beschrieben. Oligonukleotide sind immer in 5'-3' Richtung angegeben. Primer von Sandra K. Hartmann wurden mit SKP bezeichnet. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Die Teile der Oligonukleotide, die direkt der Amplifikation auf der ersten Matrize dienen, sind in Großbuchstaben und Überhänge in Kleinbuchstaben gezeigt. Einige Plasmide wurden über Gibson-Assembly hergestellt. In diesem Fall sind Gensequenzen groß geschrieben und Plasmidsequenzen klein. Plasmide wurden vor der Verwendung sequenziert.

pJET2.1-LF02807-Gen-RF02807

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *02807* (*adi2*). Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *02807* gegen eine Genitacin-Resistenzkassette ersetzt.

Konstruktion

MF422 fwd (forward) gcaatattcttgccacgacgcgatagg

MF425 rev (reverse) gcaatattgtggcgctgagggccttg

Zur Generierung dieses Plasmids wurde mit dem Primerpaar MF422 und MF425 von einem Δ *adi2*-Stamm das Konstrukt LF*adi2*-Hyg-RF*adi2* amplifiziert. Dieses Konstrukt wurde in pJET2.1 kloniert und dann mit *Sfi*I verdaut. Aus pMF1-G wurde über einen *Sfi*I-Verdau die Geneticin-Kassette gewonnen, welche anschließend in den zuvor mit *Sfi*I verdauten pJET2.1 ligiert wurde und die Hyg-Kassette ersetzte. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt.

Petef-Ram1

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um02808* (*ram1*).

Konstruktion

MJ776 fwd cccccgggctgcaggaattcgatccATGAGGTGGAAA

MJ777 rev gccgggcggccgctCTAGATGGCCATCATAGCGAGAG

Der ORF von *ram1* wurde mit dem Primerpaar MJ776 und MJ777 vom Plasmid pCRG-02808-Cbx amplifiziert. Über Gibson-Assembly wurde das Fragment in das Plasmid 1742, welches zuvor mit *Xba*I und *Nco*I geschnitten wurde, kloniert. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt.

Petef-GFP-Ram1

Dieses Plasmid diente zur N-Terminalen GFP-Fusion von *ram1*, um die Lokalisierung von Ram1 zu ermitteln.

Konstruktion

MJ778 fwd gtacaaggccgcgccagccgcccgaAGGTGGAAACAAGTACACGCT

MJ779 rev CTCTCGCTATGAtggccatctagagcggccgcccggc

Der ORF von *ram1* wurde mit dem Primerpaar MJ778 und MJ779 vom Plasmid pCRG-02808-Cbx amplifiziert. Über Gibson-Assembly wurde das Fragment in das Plasmid 1742, welches zuvor mit *Mlu*I geschnitten wurde, kloniert. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt.

Petef-Ram1-GFP

Dieses Plasmid diente zur C-Terminalen GFP-Fusion von *ram1*, um die Lokalisierung von Ram1 zu ermitteln.

Konstruktion

MJ780 fwd cccccgggctgcaggaattcgatccATGAGGTGGAAA

MJ781 rev tgaacagctcctcgcccttgetcacTAGCGAGAGGGCAGAGGGTGC

Der ORF von *ram1* wurde mit dem Primerpaar MJ780 und MJ781 vom Plasmid pCRG-02808-Cbx amplifiziert. Über Gibson-Assembly wurde das Fragment in das Plasmid 1742, welches zuvor mit *NcoI* geschnitten wurde, kloniert. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt.

Petef-HA-Ram1

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *ram1* mit HA-Tag.

Konstruktion

MJ922 fwd gatcccatggcgAGGTGGAAACAAGTACACGCTG

SKP34 rev cgggcgccgcTCATAGCGAGAGGGCAGAGGGTGCATC

Der ORF von *ram1* ohne endogenes ATG wurde mit dem Primerpaar MJ922 und SKP34 vom Plasmid pCRG-02808-Cbx amplifiziert. Das Fragment wurde mit *NcoI* und *NotI* geschnitten und in pETEF-HA-GFP-Ala6-MMXN kloniert, welches zuvor mit *NcoI* und *NotI* geschnitten wurde. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt.

Petef-HA₂-Ram1

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *ram1* mit HA₂-Tag.

Konstruktion

MJ780 fwd gatcccatggcgAGGTGGAAACAAGTACACGCTG

MJ781 rev cgggcgccgcTCATAGCGAGAGGGCAGAGGGTGCATC

Der ORF von *ram1* ohne endogenes ATG wurde mit dem Primerpaar MJ922 und SKP34 vom Plasmid pCRG-02808-Cbx amplifiziert. Das Fragment wurde mit *NcoI* und *NotI* geschnitten und in pETEF-HA₂-GFP-Ala6-MMXN kloniert, welches zuvor mit *NcoI* und *NotI* geschnitten wurde. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt.

pJET2.1-1000bp-aip+GFP-Nat+RFaip1

Dieses Plasmid diente zur endogenen GFP-Fusion von um10608 (*aip1*), um die Lokalisierung von Aip1 zu ermitteln.

Konstruktion

Das Plasmid pMF-1N wurde mit *SfiI* geschnitten, um das Fragment GFP-Nat zu erhalten. pJET2.1-LF+3xGFP-Hyg+RF wurde mit *SfiI* geschnitten, um das Backbone zu erhalten und 3xGFP-Hyg herauszuschneiden. Anschließend wurde GFP-Nat in das Backbone durch Ligation kloniert. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt.

Paip1-GFP-MMXN-si

Dieses Plasmid diente zur Expression von GFP unter dem endogenen Promotor von *aip1*.

Konstruktion

MK147 fwd gcataagcttGGCGAATCGTGGTTCTTGG

MK148 rev atatggatccGGTTGCAGCCTTTGTTGTTCTAGG

1177bp stromaufwärts von *aip1* bis zum Beginn des ORF von *aip1*, in welcher der Promotor von *aip1* vermutet wird, wurden mit den Primerpaaren MK147 und MK148 vom Genom von MB215 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *HindIII* und *BamHI* geschnitten und in pTEF-GFP-MMXN-si kloniert, aus welchem der pTEF-Promotor über *HindIII* und *BamHI* entfernt wurde. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt.

Paip1_{1000/800/600/400/200}-GFP-MMXN-si

Dieses Plasmid diente zur Expression von GFP unter dem endogenen Promotor von *aip1* und zur Identifikation der Ram1-DNA-Bindestelle.

Konstruktion

MK359 fwd gcataagcttCTCTGTCTAACACATAAGCGCG

MK358 fwd gcataagcttCTCGGTAAAAACAACCTCCGCATG

MK357 fwd gcataagcttGGCCAAGATGGCTCGAGG

MK356 fwd gcataagcttGTCCATTTCGGCACGCCTTAC

MK355 rev gcataagcttCACTAGTTTGGTTGGTACGAAACATG

MK148 rev atatggatccGGTTGCAGCCTTTGTTGTTCTAGG

Verkürzungen der Region stromaufwärts von *aip1* sollten die Ram1-DNA-Bindestelle finden. 1000bp stromaufwärts von *aip1* wurden mit den Primerpaaren MK359 und MK148 von Paip1-GFP-MMXN-si amplifiziert. 800bp stromaufwärts von *aip1* wurden mit den Primerpaaren MK358 und MK148 von Paip1-GFP-MMXN-si amplifiziert. 600bp stromaufwärts von *aip1* wurden mit den Primerpaaren MK357 und MK148 von Paip1-GFP-MMXN-si amplifiziert. 400bp stromaufwärts von *aip1* wurden mit den Primerpaaren MK356 und MK148 von Paip1-GFP-MMXN-si amplifiziert. 200bp stromaufwärts von *aip1* wurden mit den Primerpaaren MK355 und MK148 von Paip1-GFP-MMXN-si amplifiziert. Die Fragmente wurden mit *HindIII* und *BamHI* geschnitten und in Paip1-GFP-MMXN-si kloniert, aus welchem Paip1 über *HindIII* und *BamHI* entfernt wurde. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit den zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukten.

Petef-HA-Rua1

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *06458* (*rua1*) mit HA-Tag.

Konstruktion

MK251 fwd gatcccatggcgATGCCGATCTCTGCTACCATAG

MK252 rev tgcgggccgcCTATATGGGACAGCCCGTGTC

Der ORF von *rua1* wurde mit dem Primerpaar MK251 und MK252 vom Genom von MB215 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *NcoI* und *NotI* geschnitten und in pETEF-HA-GFP-Ala6-MMXN anstelle des GFP kloniert. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Da der ORF von *rua1* durch *NcoI* halbiert wird, wurden beide Teile im Nachhinein zusammengesetzt.

Petef-HA-BDrua1

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression der Bindedomäne von *rua1* mit HA-Tag.

Konstruktion

MK315 fwd ACcccgggctgcaggaattcgatcccatggcgAGCGGTATCGGCAACGC-GAGCGGAT

MK323 rev aaatgtttgaacgatctgcagccggggcgccgcTCATATGGGACAGCC-CGTGTCATCACGA

Die Bindedomäne (BD) von *rua1* wurde mit dem Primerpaar MK315 und MK323 vom Genom von MB215 amplifiziert. Über Gibson Assembly konnten die Fragmente in pETEF-HA-GFP-Ala6-MMXN anstelle des GFP kloniert werden. Dafür wurde das Plasmid mit *NcoI* und *NotI* verdaut. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt.

Petef-HA-BDrua1ADram1

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression der Bindedomäne von *rua1* und der Aktivierungsdomäne von *ram1* in einem Chimären-Konstrukt mit HA-Tag.

Konstruktion

MK315 fwd ACcccgggctgcaggaattcgatcccatggcgAGCGGTATCGGCAACGC-GAGCGGAT

MK316 rev TCGCGGAAAGCTGACCAACACGGGCTATGGGACAGCC-CGTGTCATCACGA

MK317 fwd TCGTGATGACACGGGCTGTCCCATAGCCCGTGTTGGT-CAGCTTTCCGCGA

MK318 rev aaatgtttgaacgatctgcagccggggcgccgcTCATAGCGAGAGGGCA-GAGGGTGCA

Die Bindedomäne (BD) von *rua1* wurde mit dem Primerpaar MK315 und MK316 vom Genom von MB215 amplifiziert. Die Aktivierungsdomäne (AD) von *ram1* wurde mit dem Primerpaar MK317 und MK318 vom Genom von MB215 amplifiziert. Über Gibson Assembly konnten die Fragmente in pETEF-HA-GFP-Ala6-MMXN anstelle des GFP kloniert werden. Dafür wurde das Plasmid mit *NcoI* und *NotI* verdaut. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt.

Petef-HA-ADrua1BDram1

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression der Bindedomäne von *ram1* und der Aktivierungsdomäne von *rua1* in einem Chimeren-Konstrukt mit HA-Tag.

Konstruktion

MK319 fwd	ACcccgggctgcaggaattcgatcccatggcgCCGATCTCTGCTACCA-TAGACTCCA
MK320 rev	CAGCGTGTACTTGTTCACCTCATGCTTGCACTGCTCG-GACCGCTGATG
MK321 fwd	CATCAGCGGTCCGAGCAGTGCAAGCATGAGGTGGAAA-CAAGTACACGCTG
MK322 rev	aaatgtttgaacgatctgcagccgggcccgcTCAGATCTCGAGCTC-GAGCTCGAGCTCG

Die Aktivierungsdomäne (AD) von *rua1* wurde mit dem Primerpaar MK319 und MK320 vom Genom von MB215 amplifiziert. Die Bindedomäne (BD) von *ram1* wurde mit dem Primerpaar MK321 und MK322 vom Genom von MB215 amplifiziert. Über Gibson Assembly konnten die Fragmente in pETEF-HA-GFP-Ala6-MMXN anstelle des GFP kloniert werden. Dafür wurde das Plasmid mit *NcoI* und *NotI* verdaut. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt.

pMF1-G+Pcyp2-GFP

Dieses Plasmid diente zur random Integration einer C-terminalen GFP-Fusion der Promotorregion von *cyp2*.

Konstruktion

MK402 fwd	CACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACGCAAGAAGTT-GCTTCTCTCA
MK403 rev	CTTGGCGGCGGAGGGTGG
MK404 fwd	CAACGCTCCACCCTCCGCCGCAAGATGGTGAGCAAGG-GCGAG
MK405 rev	CATCTAGGCCTCGAGGGGGGGCCCGCTAGATGGCCACG-CGTGC

Die Promotorregion von *cyp2* wurde mit dem Primerpaar MK402 und MK403 vom Genom von MB215 amplifiziert. Mit dem Primerpaar MK404 und MK405 wurde GFP von dem Plasmid pTEF-GFP-MMXN-si amplifiziert. Das Plasmid pMF1-G wurde mit *KpnI* linearisiert und über Gibson Assembly wurden die beiden amplifizierten Fragmente in pMF1-G kloniert. Transformation der *Ustilago maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Das Konstrukt wurde zufällig in den Locus von *U. maydis* integriert.

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation des *E. coli*-Stammes Top10 wurde die Calcium-Mangan-Methode nach Hanahan et al. (1991) verwendet. Hierzu wurden die Zellen zunächst in SOB-Medium bis zu einer OD₅₅₀ von 0,4 angezogen. Wenn die Kultur diese Zelldichte erreicht hatte, wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (10 min, 4000 Upm, 4°C) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in einem Drittel des Ausgangsvolumens in eiskaltem CCMB80-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationschritt (10 min, 4000 Upm, 4°C) wurden die sedimentierten Zellen in einem Zwölftel des Ausgangsvolumens mit CCMB80-Puffer resuspendiert, in jeweils 75 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

CCMB80-Puffer

10 mM KOAc pH 7,0
80 mM CaCl₂ *2H₂O
20 mM MnCl₂ *4H₂O
10 mM MgCl₂ *6H₂O
10 % (v/v) Glycerin
in Aqua_[dest.] pH 6,4

Zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA wurden die Zellen für etwa 5 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend 1 µl der Plasmid-DNA (bei Ligationen 5-10 µl) mit 75 µl chemisch kompetenten Zellen gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der gesamte Ansatz für 90 sec auf 42°C erhitzt und anschließend auf Selektionsplatten (dYT-Festmedium mit Ampicillin) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

4.4.2 Transformation von *U. maydis*

Die Transformation von *U. maydis* erfolgte gemäß eines modifizierten Protokolls nach Schulz et al. (1990). 50 ml einer in YEPS angezogenen *U. maydis*-Kultur mit einer optischen Dichte von 0,8 - 1,0 wurde zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT) und das Zellsediment wurde in 25 ml SCS-Lösung einmal gewaschen. Dann wurde das Sediment in 2 ml SCS-Lysing-Enzyme-Lösung (20 mg/ml Lysing enzymes) aufgenommen und die Protoplastierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Bei einer Verkuglung der Zellen von ca. 80% wurde die Reaktion durch Zugabe von 10ml eiskalter SCS-Lösung gestoppt und die

Protoplasten pelletiert (2300 rpm, 10 min, 4°C). Das Sediment wurde noch zweimal mit 10 ml SCS-Lösung und einmal mit 10 ml eiskalter STC-Lösung gewaschen und dann in 500 µl eiskalter STC-Lösung aufgenommen. Die Protoplasten wurden in Volumina von 50 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren oder direkt transformiert.

SCS-Lösung

1 M Sorbitol
in 20 mM Na-Citrat
pH 5,8; sterilfiltriert

STC-Lösung

100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol in 10 mM Tris-HCl
pH 7,5; sterilfiltriert

STC/PEG-Lösung

40% PEG400 in STC; sterilfiltriert

Regenerations-Agar

Top: 1M Sorbitol in YEPS
1,5 % (w/v) Bactoagar
Bottom: wie Top, zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

Zur Transformation wurden 50 µl *U. maydis*-Protoplasten auf Eis aufgetaut und mit maximal 10 µl (bis ca. 500 ng) der zu transformierenden DNA vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl STC/PEG zugegeben und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von PEG wurden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel. Der Ansatz wurde auf Regenerationsagar gegeben und vorsichtig verteilt. Der Regenerationsagar wurde kurz vor der Transformation in zwei Schichten gegossen, von denen die untere das zur Selektion benötigte Antibiotikum in zweifacher Konzentration enthielt (Hygromycin: 400 µg/ml, Carboxin 4 µg/ml, Nourseothricin: 300 µg/ml). Die obere Schicht war frei von Antibiotika. Durch das Konzentrationsgefälle wurde gewährleistet, dass sich erst nach und nach die zur Selektion benötigte Antibiotikakonzentration durch Diffusion einstellte. Die Platten wurden für 3-7 Tage bei 30°C oder bei Raumtemperatur inkubiert. Einzelkolonien wurden dann auf Selektionsmedium vereinzelt und danach mit PCR und/oder Southern-Analyse untersucht.

4.4.3 Wachstumstests auf Festmedium

Für die Untersuchung von Wachstumsphänotypen wurden *U. maydis*-Kulturen einer OD₆₀₀ von 1 verwendet, die in YEPS-Medium kultiviert waren. Zur Untersuchung des Wachstums auf Fest-Medium wurden die Kulturen mit YNB-Medium gewaschen und in serieller Verdünnung ausgehend von einer OD₆₀₀ von 1 auf Festmedien mit den jeweiligen Zusätzen und einem Volumen von 5 µl getropft.

4.5 Genetische Methoden

4.5.1 Deletion von Genen oder Genfragmenten mittels homologer Rekombination

U. maydis besitzt ein hoch effizientes Rekombinationssystem. Dieses kann man nutzen, um mittels homologer Rekombination das Genom von *U. maydis* zu modifizieren. Zur Deletion von Genen wurde eine Strategie nach Kämper (2004) verwendet. 1000 bp flankierende, homologe Regionen dienen in *U. maydis* der zielgerichteten Integration von DNA (z.B. Resistenzkassetten) an einen bestimmten Ort ins Genom durch homologe Rekombination, vorausgesetzt man kann auf dieses relativ seltene Ereignis selektieren. Um Gene oder Genfragmente zu entfernen wurden Konstrukte hergestellt, die eine Resistenzkassette enthielten und links und rechts von genau der Sequenz eingerahmt waren, die den zu deletierenden Bereich im Genom von *U. maydis* flankiert. Wurden nur Teile eines ORFs deletiert, wurde ein neues Stopp-Codon eingefügt. Resistenzkassette und flankierende Sequenzen wurden mittels SfiI geschnitten (Bestandteil der Oligonukleotide) und direktional ligiert. Diese Ligationsprodukte wurden mit PCR amplifiziert und entweder direkt transformiert oder aber in den pJET2.1 (Fermentas) inseriert und vor der Transformation sequenziert. Alle verwendeten Kassetten finden sich in Brachmann et al. (2004) und enthalten flankierende SfiI-Schnittstellen.

4.5.2 Integration von Konstrukten in den *ip*-Locus von *U. maydis*

Die Aminosäuresubstitution Histidin zu Leucin an der Position 257 der Succinatdehydrogenase (Sdh1; Um1172) führt in *U. maydis* zur Ausprägung einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin (Broomfield and Hargreaves, 1992). Diese Mutation kann genutzt werden, um gezielt Konstrukte in den *sdh1*-Locus zu integrieren (*ip*-Locus). Linearisiert man ein Plasmid, das *sdh1* in mutierter Version beinhaltet und transformiert dieses Plasmid in Anwesenheit von Carboxin in *U. maydis* so erhält man Stämme mit einem integrierten Plasmid, das von einer mutierten Version von *sdh1* (*ip^r*) und einer

nativen Version von *sdh1* (*ip^s*) flankiert wird. Diese Strategie erlaubt folglich die ortsspezifische Integration beliebiger DNA; allerdings integrieren die Konstrukte häufig mehrfach hintereinander. Mittels Southern Analyse kann anschließend die Integrationshäufigkeit ermittelt werden.

4.6 Molekularbiologische Techniken

4.6.1 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Zur restriktionsenzymatischen Spaltung von DNA wurden Enzyme und korrespondierende Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Thermo Scientific verwendet. Die jeweiligen Pufferbedingungen wurden nach den Herstellerangaben gewählt. Bei Doppelverdauen wurde auf die Puffer-Kompatibilitätstabellen der jeweiligen Hersteller zurückgegriffen. Dabei wurde DNA zwischen 10 min und 14 Stunden nach Herstellerangaben geschnitten. Dabei wurden zwischen 0,2 und 5 μg DNA eingesetzt. Für Klonierungen wurden häufig Vektorfragmente noch für etwa eine Stunde bei 37°C dephosphoryliert und die Phosphatase bei 70°C für 15 min deaktiviert.

4.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte für zwei Stunde bei RT oder über Nacht bei 16°C. DNA-Fragmente wurden mittels des Enzyms T4-DNA-Ligase (Roche) ligiert. Bei der Insertion von DNA-Fragmenten in geöffnete Vektoren wurde ein mindestens zweifacher molarer Überschuss der jeweiligen Fragmente eingesetzt. Falls die Vektoren mit stumpfen Enden vorlagen, wurde ein mindestens fünffacher Überschuss der zu inserierenden DNA-Fragmente verwendet. Für die Ligation von drei Fragmenten wurden alle drei Fragmente in äquimolarer Konzentration verwendet. Ligationen erfolgten in einem Endvolumen von 20 μl und es wurden zwischen 50 ng und 5 μg DNA eingesetzt. Der Vektor und das zu ligierende Fragment wurden im Verhältnis 1:10 eingesetzt. Es wurden zusätzlich 2 μl Ligationspuffer und 1 μl T4-DNA-Ligase sowie steriles Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 μl eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit 10 μl des Ligationsansatzes.

4.6.3 Gibson-Assembly von DNA-Fragmenten

Das Gibson-Assembly ermöglicht die Fusion von mehreren DNA-Fragmenten, unabhängig von der Sequenz oder Fragmentlänge. Die Reaktion findet isothermal in einem einzigen Reaktionsgefäß statt (Gibson, 2011; Gibson et al., 2010, 2009). Grundlegend finden drei

enzymatische Vorgänge statt, die zusammen in einem Puffer ausgeführt werden: Im ersten Schritt verdaut die T5-Exonuklease die DNA-Fragmente und führt zu einzelsträngigen 3'-Überhängen. Diese ermöglichen das Annealing von Fragmenten mit komplementären Sequenzbereichen. Im zweiten Schritt füllt die Phusion-DNA-Polymerase die Lücken zwischen den zusammengefügt Fragmenten auf. Im dritten und letzten Schritt verbindet die Taq-DNA-Ligase die freien 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen der einzelnen Basen und fügt so die Fragmente zusammen.

Für eine Gibson-Assembly-Reaktion wurden die entsprechenden Produkte in äquimolaren Mengen einem Ansatz von 5 μl zusammengefügt und mit 15 μl des 1,33x-konzentrierten Gibson-Assembly-Mastermix zusammen pipettiert.

Der Gibson-Assembly-Mastermix wurde von der AG Waldminghaus bezogen.

Gibson-Assembly-Mastermix

5x Isothermaler Reaktionspuffer

10U/ μl T5 Exonuklease

2U/ μl Phusion-DNA-Polymerase

40 U/ μl Taq-DNA-Ligase

H₂O ad 1,2 ml

Ansatz für eine Reaktion

15 μl Gibson-Assembly-Mix (1,33x)

1-4 μl zu inserierendes DNA-Fragment, bei Bedarf mehrere unterschiedliche Fragmente

1 μl mit Restriktionsenzymen verdautes Ausgangsplasmid

H₂O ad 20 μl

4.6.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) bei der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg. Die Reaktionszusammensetzungen wurden den Herstellerangaben folgend gewählt: etwa 1 μg Plasmid-DNA wurden mit jeweils 20 μM Primer in einem gesamt-Ansatz von 17 μl gemischt.

4.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Sharp et al., 1973) ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde eine Suspension von 0,8 - 2 % Agarose in Elektrophoresepuffer (Tris-Acetat-EDTA (TAE)) bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und anschließend bis auf $\approx 60^\circ\text{C}$ abgekühlt. Diese Lösung wurde bis zu einer Endkonzentration von 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mit Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten mit einem eingesteckten Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren

des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Die DNA wurde vor Beladen mit 10x Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Als Größenstandard diente der kommerziell erhältliche Größenstandard Generuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V. Nach erfolgter Auftrennung wurde das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

50x TAE-Puffer

2 M Tris-Base

2 M Acetat

50 mM Na₂-EDTA

in Aqua_[dest.]

10x DNA-Auftragspuffer

0,2% (w/v) Orange G

50% (w/v) Saccharose

1 mM Na₂-EDTA

in Aqua_[dest.]

Um spezifische DNA-Fragmente zu isolieren, wurde diese zunächst mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=360$ nm) ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel/PCR DNA Fragments Extraktion Kit der Firma AidGene nach Herstellerangaben eluiert.

4.6.6 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Die PCR-Reaktion (Bell, 1989; Mullis et al., 1986; White et al., 1989) dient der Amplifikation von spezifischen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten und wurden mit Hilfe eines TPersonel Thermocyclers (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Durch eine thermostabile Polymerase werden mit Hilfe von Primern und dNTPs spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten oder zur Überprüfung von Mutanten wurde die Phusion Polymerase (2000 bp/min) verwendet. Die PCR-Reaktion läuft in 4 charakteristischen Schritten ab. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94°C denaturiert und so in einzelsträngige DNA überführt. Bei einer Temperatur zwischen 50-72°C (abhängig von der Nukleotid-Zusammensetzung der Oligonukleotidprimer) binden die PCR-Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing). Die thermostabile

Polymerase synthetisiert anschließend ausgehend von den Primern einen komplementären DNA-Strang (Elongation), hierbei wird die Temperatur und die Geschwindigkeit dem Optimum der jeweiligen Polymerase angepasst. Durch eine erneute Denaturierung bei 94°C beginnt der Zyklus erneut.

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 50 μ l wie folgt durchgeführt:

- 10 μ l 5x GC-Puffer (Finnzymes)
- 1,5 μ l DMSO
- 1 μ l dNTPs (10 mM)
- 1 μ l 5'Primer (10 mM)
- 1 μ l 3'Primer (10 mM)
- 1 μ l Matrizen-DNA (\approx 100ng)
- 0,5 μ l Phusion DNA-Polymerase (0,5 U)
- H₂O ad 50 μ l

Standardprotokoll

1. 98°C 5 min
2. 98°C 1 min
3. 50-72°C 30 s
4. 72°C x min
5. 72°C 5 min
6. 14°C Abkühlen

Die Schritte 2 bis 4 wurden 34x wiederholt.

4.6.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid DNA, die für Sequenzierungen verwendet werden sollte bzw. in großem Maßstab benötigt wurde, wurde das ZR-Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) verwendet. Ansonsten wurde eine Variante der "kochenden Lyse" verwendet (Sambrook, 1989). Hierbei wurden zunächst 1,5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 50 μ l Destroyer-Lysis-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für etwa 1 min bei 99°C inkubiert und anschließend direkt für 5 min auf Eis gestellt. Nach 10 minütiger Zentrifugation (13.000 Upm) wurden 5 μ l des Überstandes in eine Testrestriktion eingesetzt.

Destroyer Lysis-Puffer

- 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)

50% (w/v) Saccharose
2 mg/ml Lysozym
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A

4.6.8 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Hoffman and Winston (1987). Zur Gewinnung von chromosomaler DNA aus *U. maydis* wurden 2 ml einer dicht gewachsenen YEPS-Übernachtskultur abgenommen und in einem entsprechenden Reaktionsgefäß zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Das Sediment wurde in 500 μl Lysis-Puffer resuspendiert und mit 0,3 g Glasperlen und 500 μl Phenol/Chloroform versetzt. Die Zellen wurden durch 15 minütiges Schütteln auf dem Vibrax-VXR Schüttler (IKA,Staufen) aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Die obere, klare Phase (ca. 400 μl) wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 ml 96 %igem Ethanol gemischt und für 10 Minuten auf -20°C gestellt. Danach wurden die Ansätze zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Der Niederschlag wurde mit 500 μl 70 %igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet für 5 min bei 65°C vollständig getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 50 μl TE mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA aufgenommen. Die Langzeitlagerung der präparierten DNA erfolgte bei -20°C .

Ustilago-Lysepuffer

100 mM Tris/HCl pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM EDTA
1 % (w/v) SDS
2 % (w/v) Triton X-100

Phenol/Chloroform

50 % (v/v) Phenol
50 % (v/v) Chloroform

4.6.9 Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Zur Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten definierter Größe und Sequenz wurde die Southern Blotting Methode (Southern, 1975) durchgeführt. Dabei wurden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen. Chromosomale DNA wurde

mit geeigneten Restriktionsenzymen (um z.B. die DNA von Mutanten und Wildtypstämmen zu unterscheiden) verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Das Gel wurde erst für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und danach für 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Die Übertragung der DNA auf die Nylonmembran (Hybond-N⁺, Roth) erfolgte über Kapillarkräfte. Aus einem Tank mit 0,4 M NaOH wurde mit Whatman-Papier und Papierhandtüchern ein Sog durch Gel und Membran erzeugt. Der Transfer erfolgte für mindestens vier Stunden, meistens aber über Nacht. Die Membran wurde nach dem Blotten getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm²) im Stratalinker 2400 (Stratagene) fixiert. Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert (Church and Gilbert, 1984). Geeignete Sonden wurden mit Hilfe des Amersham Megaprime DNA Labeling Systems (GE-Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben synthetisiert. Dazu wurden 5 μ l α -³²P-dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig). Zunächst wurde die Membran 20 min bei 65°C in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert und hinzugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Es wurde über Nacht bei 65°C inkubiert und die Membran anschließend in 2x 15 ml Southern-Waschpuffer 20 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und für mindestens zwei Stunden in einer Phosphoimager Kassette (Amersham) exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, Amersham).

Southern-Hybridisierungspuffer

7 % (w/v) SDS

500 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0

Southern-Waschpuffer

1 % (w/v) SDS

100 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0

4.7 Biochemische Methoden

4.7.1 Isolierung von denaturierten Proteinen aus *U. maydis*

U. maydis Zellen wurden in YEPS bis zu einer optischen Dichte von 1 angezogen und 10 ml dieser Kultur pelletiert (3.500 Upm, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in 500 μ l Thorner-Puffer aufgenommen, resuspendiert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Proben für 5 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach erneutem Erhitzen (5 min, 95°C)

wurden die Proben abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min) und 5 – 20 μl des Überstandes für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Alternativ wurden die Präparationen bei -20°C eingefroren und vor der Verwendung erneut erhitzt (5 min, 95°C) und abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min).

Thorner-Puffer

8 M Urea
5 % (w/v) SDS
0,1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$
0,01 % (w/v) Bromphenolblau
50 mM Dithiothreitol (kurz vor Verwendung)
in 100 mM Tris-HCl, pH 6,8

4.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976), allerdings in einer modifizierten Form mit Biorad-Reagenz (Biorad). 1 μl Proteinlösung wurde mit 1 ml der um den Faktor 1:5 verdünnten Biorad-Lösung gemischt. Der Nachweis erfolgte sofort im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zur Standardisierung wurden BSA-Verdünnungsreihen mit definierten Konzentrationen eingesetzt.

4.7.3 Elektrophorese von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) angewendet. Proteine erhalten durch Bindung an SDS eine negative Ladung, was die Auftrennung in einem elektrischen Feld erlaubt. Es wurden Gelkammern (Mini Protean System; Bio-Rad) mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Gele setzten sich aus Sammelgel und Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel. Im Trenngel werden die Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein Proteinstandardgemisch (15 - 170 kD; Prestained Page Ruler; Fermentas) bestimmt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA.

SDS-Laufpuffer

200 mM Glycin
0,2% (w/v) SDS
in 25 mM Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgel

5% (v/v) Acrylamid
0,1% (w/v) SDS
in 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,05% (v/v) TEMED

Trenngel

8 - 12% (v/v) Acrylamid
0,1% (w/v) SDS
in 375 mM Tris-HCl, pH 8,8
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,05% (v/v) TEMED

4.7.4 Transfer und Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran durch Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für den Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF (Polyvinyliden-fluorid)-Membran (Roth) wurde das Trans-Blot TurboxTM Transfer System von Biorad verwendet. Der Blot wurde auf die Anodenplatte der Blotapparatur aufgeschichtet. Die durch Benetzen mit Methanol aktivierte und in Transferpuffer equilibrierte PVDF-Membran wurde auf einen Stapel mit 4 in Western-Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren gelegt. Das Trenngel wurde auf die Membran aufgelegt und mit 4 Lagen in Transferpuffer getränkten Blotting-Papieren überschichtet. Die Kathodenplatte wurde aufgesetzt und das Gel für 2 Stunden auf Standard-Programm bei 0,75 A geblottet.

Western-Transfer-Puffer

200 mM Glycin
20% (v/v) Methanol
in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4

Die auf die PVDF-Membran überführten Proteine wurden mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Zunächst wurde die Membran in TBS-T (5% Milchpulver) 30 min schwenkend inkubiert. Anschließend wurden 10 ml eines verdünnten primären Antikörpers in TBS-T (5% Milchpulver) zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Dann wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBS-T gewaschen und anschließend mit einem verdünnten sekundären Antikörper gegen den primären Antikörper 45 min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Zum Nachweis

der Proteine durch Chemilumineszenz wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBS-T gewaschen und abgetropft. 0,5 ml der Detektionslösung 1 wurden mit 0,5 ml der Detektionslösung 2 (Amersham) gemischt, auf die Membran aufgetropft und eine Minute lang darin geschwenkt. Danach wurde die Membran auf eine Auflage, zugehörig zur Chemocam, gelegt und überschüssige Lösung wurde nach Auflegen einer Folie zu den Seiten hin hinausgestrichen. Die Signale auf der Membran wurden anschließend mit Hilfe des Chemocam Imaging Systems (Intas; Göttingen) aufgenommen und mit ImageJ ausgewertet (Abràmoff et al., 2004).

TBS-T

0,1% (v/v) Tween 20 in TBS

4.7.5 Isolierung von Glykolipiden aus *U. maydis*

Zur Präparation des Glykolipids Ustilaginsäure aus *U. maydis* wurden drei Tage alte Kulturen verwendet. Von diesen Kulturen wurden 0,5 ml abgenommen und mit 0,5 ml Ethylacetat vermischt. Diese Ansätze wurden 10 Minuten auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (13000 Upm, 10 Minuten) wurde der Überstand abgenommen und die Flüssigkeit bei 70°C und 600 Upm eingedampft. Die isolierten Lipide wurden schließlich in 15 μ l Methanol aufgenommen.

4.7.6 Auftrennung und Nachweis der Glykolipide mit Dünnschichtchromatographie (DC)

10 μ l Glykolipidlösung wurden auf eine DC-Aluminium-Platte mit Kieselgel als Trägermaterial (Merck) getropft und 5 Minuten bei RT getrocknet. Anschließend wurden die enthaltenen Glykolipide mit Hilfe eines Laufmittels aus Chloroform:Methanol:H₂O (65:25:4) aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte für ungefähr 25 Minuten bzw. bis die Lauffront das Ende der Platte erreichte. Die Platte wurde für ca. 10 min an der Luft getrocknet. Zur Detektion der Glykolipide wurde die DC-Platte mit einem Gemisch aus Eisessig: Schwefelsäure:Anisaldehyd (50:1:0,5) besprüht. Nach 15 min Trocknen an der Luft wurde die DC-Platte für 2 min bei 150°C erhitzt, bis Glykolipide als Banden sichtbar wurden.

4.7.7 Analyse von Substratveränderungen im Überstand von *U. maydis*-Kulturen durch High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC)

Die quantitative Bestimmung der *cis*- und *trans*-Aconitat Aufnahme durch *U. maydis* wurde mit Hilfe eines HPLC-Chromatogramms durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden *U. maydis*-Stämme bis zu einer optischen Dichte von 1 in YEPSL angezogen. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (3000 Upm, 5 min, RT) und mit 0,5 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen und im entsprechenden Volumen mit einer Endkonzentration von 5 mM *cis*- bzw. *trans*-Aconitat bei 30°C inkubiert. Es wurden nach 0, 1, 2, 4 und 6 Stunden Proben (1 ml der Kultur) entnommen und für die Messungen bei -20°C gelagert. Die entnommenen Proben wurden pelletiert (13.000 Upm, 2 min) und 100 µl des Überstandes in einen Mikroeinsatz mit Polymerfuß überführt und für die HPLC-Analyse verwendet. 5 µl der Proben wurden dann in das HPLC-System (1260 Infinity Series, Agilent Technologies) injiziert und analysiert.

Laufmittel: 2,5 mM Schwefelsäure

Säule: Rezex-ROA-Organic Acid H+ (8%), 7,6 mm x 250 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)

Flussrate: 0,8 ml/min (ca. 65 bar)

Temperatur: 40°C

Detektor: VWD 1260 (1260 Infinity Series, Agilent Technologies)

Wellenlänge 210 nm

Datenanalyse: OpenLab CDS Version ChemStation

Organische Säure Retentionszeit

cis-Aconitat 8.2

trans-Aconitat 11.2

4.8 Mikroskopie

Zur Mikroskopie von *U. maydis* Zellen wurde ein Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M mit einem Ludel Piezo Drive (Zeiss; Göttingen) verwendet. Als Fluorophore wurden eGFP (Excitation: 488 nm; Emission: 509 nm) und Mitotracker Rhod B (Excitation: 570 nm; Emission: 620 nm) DAPI (Excitation: 365 nm; Emission: 460 nm) verwendet. Die Zellen wurden in einem Volumen von 2-5 µl auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wassera-

garschicht bedeckten Objektträger getropft. Anschließend wurde ein Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente der Fixierung der Zellen an ihrer Position, um unscharfe Bilder zu vermeiden. Zur Anregung der Fluorophore wurden die zur Wellenlänge passenden Filter benutzt. Vergleichsfotos wurden im Differentialkontrast aufgenommen. Der Dokumentation dienten eine Kamera des Typs ORCA (Hamamatsu; Japan) und die Software Volocity 5.0. Die Bilder wurden mit ImageJ bearbeitet (Abràmoff et al., 2004).

4.9 Bioinformatik

Für die Suche und den Vergleich von Sequenzen wurden folgende Datenbanken verwendet: National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov), Pedant Ustilago maydis Data Base (Pedant; http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_t237631_Ust_maydi_v2GB), EnsemblFungi (<http://fungi.ensembl.org/index.html>). Die Analyse von Kernlokalisierungssequenzen erfolgte mit dem cNLS-Mapper (Kosugi et al., 2009)). Die Bestimmung von Proteindomänen erfolgte ebenfalls über NCBI.

Literaturverzeichnis

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., and Ram, S. J. (2004). Image processing with imagej. *Biophotonics international*, 11(7):36–42.
- Altekar, W. and Rao, M. R. (1963). Microbiological dissimilation of tricarballylate and trans-aconitate. *Journal of bacteriology*, 85(3):604–613.
- Ambler, J. and Roberts, E. (1948). The effect of ph on the stability of cis-aconitic acid in dilute solution. *The Journal of organic chemistry*, 13(3):399–402.
- Ausubel FM, Brent R, K. R. M. D. S. J. S. J. . S. K. (1987). Current protocols in molecular biology.
- Baleja, J. D., Marmorstein, R., Harrison, S. C., and Wagner, G. (1992). Solution structure of the dna-binding domain of cd2-gal4 from *s. cerevisiae*. *Nature*, 356(6368):450.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994). Morphological transitions in the life cycle of *ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. *Experimental Mycology*, 18(3):247–266.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *ustilago maydis*. *Development*, 122(10):2965–2976.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 37(2):149–170.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., and Feldbrügge, M. (2012). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mrnps and endosomes. *J Cell Sci*, 125(11):2740–2752.
- Baup, S. (1837). Ueber eine neue Pyrogen-Citronensäure und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt. *Ann. Chim. Phys.*, 19:29–38.
- Bell, J. (1989). The polymerase chain reaction. *Immunol Today*, 10(10):351–5. 0167-5699 Journal Article Review Review, Tutorial.

- Bohman, V., Lesperance, A., Harding, G., and Grunes, D. (1969). Induction of experimental tetany in cattle. *Journal of animal science*, 29(1):99–102.
- Bölker, M., Basse, C. W., and Schirawski, J. (2008). Ustilago maydis secondary metabolism-from genomics to biochemistry. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 45 Suppl 1:S88–93.
- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R. (1992). The a mating type locus of u. maydis specifies cell signaling components. *Cell*, 68(3):441–450.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., and Feldbrügge, M. (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in ustilago maydis. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(2):216–226.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- Brakhage, A. a. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews. Microbiology*, 11(1):21–32.
- Brauer, D. and Teel, M. R. (1981). Metabolism of trans-aconitic acid in maize: I. purification of two molecular forms of citrate dehydrase. *Plant physiology*, 68(6):1406–1408.
- Broomfield, P. E. and Hargreaves, J. A. (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in ustilago maydis. *Current genetics*, 22(2):117–121.
- Burau, R. and Stout, P. (1965). Trans-aconitic acid in range grasses in early spring. *Science*, 150(3697):766–767.
- Büttner, S. J. (2017). Charakterisierung und lokalisierung des potentiellen trans-aconitat importproteins aip1 in ustilago maydis. Master’s thesis, Philipps-Universität Marburg.
- Cai, H. and Clarke, S. (1999). A novel methyltransferase catalyzes the methyl esterification of trans-aconitate in escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19):13470–13479.
- Church, G. M. and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(7):1991–1995.
- Desai, J. D. and Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1):47–64.

- Dowzer, C. and Kelly, J. M. (1991). Analysis of the *crea* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*, 11(11):5701–5709.
- Drew, S. W. and Wallis, D. A. (1983). Regulation of secondary metabolism and keys to its manipulation. *Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi*, 5:35–54.
- Du, C., Cao, S., Shi, X., Nie, X., Zheng, J., Deng, Y., Ruan, L., Peng, D., and Sun, M. (2017). Genetic and biochemical characterization of a gene operon for trans-aconitic acid, a novel nematicide from *bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 292(8):3517–3530.
- Felenbok, B., Sequeval, D., Mathieu, M., Sibley, S., Gwynne, D. I., and Davies, R. W. (1988). The ethanol regulon in *aspergillus nidulans*: characterization and sequence of the positive regulatory gene *alcr*. *Gene*, 73(2):385–396.
- Friedrich, A. (2013). Transkriptionelle regulation des itaconsäuregenclusters im phytopathogenen pilz *ustilago maydis*. Master’s thesis, Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.
- Gardner, K. H., Pan, T., Narula, S., Rivera, E., and Coleman, J. E. (1991). Structure of the binuclear metal-binding site in the *gal4* transcription factor. *Biochemistry*, 30(47):11292–11302.
- Garvey, G. S., Rocco, C. J., Escalante-Semerena, J. C., and Rayment, I. (2007). The three-dimensional crystal structure of the PrpF protein of *Shewanella oneidensis* complexed with trans-aconitate: insights into its biological function. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 16(7):1274–84.
- Geiser, E., Przybilla, S. K., Friedrich, A., Buckel, W., Wierckx, N., Blank, L. M., and Bölker, M. (2016). *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate trans-aconitate. *Microbial biotechnology*, 9(1):116–126.
- Gibson, D. G. (2011). Enzymatic assembly of overlapping dna fragments. In *Methods in enzymology*, volume 498, pages 349–361. Elsevier.
- Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R.-Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., et al. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *science*, 329(5987):52–56.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A., and Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of dna molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5):343.

- Halvorsen, Y., Nandabalan, K., and Dickson, R. C. (1991). Identification of base and backbone contacts used for dna sequence recognition and high-affinity binding by lac9, a transcription activator containing a c6 zinc finger. *Molecular and cellular biology*, 11(4):1777–1784.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of escherichia coli and other bacteria. *Methods Enzymol*, 204:63–113. 0076-6879 (Print) Journal Article Review.
- Haskins, R. (1950). Biochemistry of the ustilaginales: I. preliminary cultural studies of ustilago zae. *Canadian Journal of Research*, 28(2):213–223.
- Haskins, R., Thorn, J., and Boothroyd, B. (1955). Biochemistry of the Ustilaginales: XI. Metabolic products of Ustilago zae in submerged culture. *Can J Microbiol*, 1:749–756.
- Hewald, S. (2005). Identifizierung und charakterisierung zweier für die produktion extrazellulärer glykolipide verantwortlichen gencluster in u. maydis.
- Hewald, S., Josephs, K., and Bölker, M. (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in ustilago maydis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6):3033–3040.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. A., Kämper, J., and Bölker, M. (2006). Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus ustilago maydis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(8):5469–5477.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). A ten-minute dna preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformiaon of escherichia coli. *Gene*, 57(2-3):267–272.
- Hoffmeister, D. and Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural product reports*, 24(2):393–416.
- Hynes, M. (1975). Studies on the role of the are a gene in the regulation of nitrogen catabolism in aspergillus nidulans. *Australian journal of biological sciences*, 28(3):301–314.
- Ito, T., Tani, S., Itoh, T., Tsukagoshi, N., Kato, M., and Kobayashi, T. (2004). Mode of amyr binding to the cgg8agg sequence in the aspergillus oryzae taag2 promoter. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(9):1906–1911.
- Jack, D. L., Yang, N. M., and Saier, M. H. (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *European Journal of Biochemistry*, 268(13):3620–3639.

- Kämper, J. (2004). A pcr-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *ustilago maydis*. *Molecular genetics and genomics*, 271(1):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(7115):97–101.
- Keller, N. P. and Hohn, T. M. (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 21(1):17–29.
- Keller, N. P., Turner, G., and Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature reviews. Microbiology*, 3(12):937–47.
- Kim, M., Koh, H.-S., Obata, T., Fukami, H., and Ishii, S. (1976). Isolation and identification of trans-aconitic acid as the antifeedant in barnyard grass against the brown planthopper, *nilaparvata lugens* (stal)(homoptera: Delphacidae). *Applied Entomology and Zoology*, 11(1):53–57.
- Kin, R., Sai, T., and So, S. (1998). Itaconate copolymer with quadratic nonlinear optical characteristic. *JP Patent*.
- Kinoshita, K. (1932). Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz *Aspergillus itaconicus*. *Acta Phytochim.*
- Kjærboelling, I., Mortensen, U. H., Vesth, T., and Andersen, M. R. (2019). Strategies to establish the link between biosynthetic gene clusters and secondary metabolites. *Fungal Genetics and Biology*.
- Klinman, J. P. and Rose, I. A. (1971). Purification and kinetic properties of aconitate isomerase from *pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 10(12):2253–2259.
- Kornacker, M. S. and Ball, E. G. (1965). Citrate cleavage in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(3):899.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25):10171–10176.
- Kraulis, P. J., Raine, A. R., Gadhavi, P. L., and Laue, E. D. (1992). Structure of the dna-binding domain of zinc gal4. *Nature*, 356(6368):448.
- Laemmli, U. (1970). Denaturing (sds) discontinuous gel electrophoresis. *Nature*, 227:680–685.

- Lanver, D., Müller, A. N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F. B., Franitza, M., Pellegrin, C., Reissmann, S., Altmüller, J., Rensing, S. A., et al. (2018). The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by rna-seq analysis. *The Plant Cell*, 30(2):300–323.
- Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Stout, C. D. (1994). Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound. *Journal of molecular biology*, 237(4):437–451.
- Lawrence, J. G. and Roth, J. R. (1996). Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics*, 143(4):1843–1860.
- Levinson, W. E., Kurtzman, C. P., and Kuo, T. M. (2006). Production of itaconic acid by *Pseudozyma antarctica* nr1 y-7808 under nitrogen-limited growth conditions. *Enzyme and microbial technology*, 39(4):824–827.
- Liu, L. (2007). *Untersuchungen zur stickstoffabhängigen Regulation der Glykolipidsynthese in Ustilago maydis*. PhD thesis, Diplomarbeit.
- MacLennan, D. H. and Beevers, H. (1964). Trans-aconitate in plant tissues. *Phytochemistry*, 3(1):109–113.
- Malachowski, R. and Maslowski, M. (1928). Untersuchungen über aconitsäuren, i.: Stereochemie der aconitsäuren. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 61(11):2521–2525.
- Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., and Harrison, S. C. (1992). Dna recognition by gal4: structure of a protein-dna complex. *Nature*, 356(6368):408.
- Miller, R. E. and Cantor, S. M. (1951). Aconitic acid, a by-product in the manufacture of sugar. In *Advances in carbohydrate chemistry*, volume 6, pages 231–249. Elsevier.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51:263–73. 0091-7451 Journal Article.
- Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Rogozin, I. B., and Koonin, E. V. (2003). Evolution of mosaic operons by horizontal gene transfer and gene displacement in situ. *Genome biology*, 4(9):R55.
- Palmieri, F. and Pierri, C. L. (2010). Mitochondrial metabolite transport. *Essays in biochemistry*, 47:37–52.

- Pan, T. and Coleman, J. E. (1990). Gal4 transcription factor is not a zinc finger but forms a zinc (ii) 2cys6 binuclear cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(6):2077–2081.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., and Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(1):1–34.
- Pfeifer, K., Kim, K.-S., Kogan, S., and Guarente, L. (1989). Functional dissection and sequence of yeast hap1 activator. *Cell*, 56(2):291–301.
- Przybilla, S. K. (2014). Genetische und biochemische charakterisierung der itaconsäurebiosynthese in *Ustilago maydis*.
- Qui, H., Dubois, E., and Messenguy, F. (1991). Dissection of the bifunctional argR protein involved in the regulation of arginine anabolic and catabolic pathways. *Molecular and cellular biology*, 11(4):2169–2179.
- Rao, M. R. and Altekar, W. (1961). Aconitate isomerase. *Biochemical and biophysical research communications*, 4(2):101–105.
- Rebholz, K. L. and Northrop, D. B. (1994). Kinetics of enzymes with iso-mechanisms: dead-end inhibition of fumarase and carbonic anhydrase ii. *Archives of biochemistry and biophysics*, 312(1):227–233.
- Reece, R. J. and Ptashne, M. (1993). Determinants of binding-site specificity among yeast c6 zinc cluster proteins. *Science*, 261(5123):909–911.
- Regev-Rudzki, N., Karniely, S., Ben-Haim, N. N., and Pines, O. (2005). Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. *Molecular biology of the cell*, 16(9):4163–4171.
- Saffran, M. and Prado, J. L. (1949). Inhibition of aconitase by trans-aconitate. *J Biol Chem*, 180(30):1301–1309.
- Sambrook, H. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–5467.
- Sass, E., Blachinsky, E., Karniely, S., and Pines, O. (2001). Mitochondrial and cytosolic isoforms of yeast fumarase are derivatives of a single translation product and have identical amino termini. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49):46111–46117.

- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M., Rössel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D., et al. (2010). Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science*, 330(6010):1546–1548.
- Schjerling, P. and Holmberg, S. (1996). Comparative amino acid sequence analysis of the c6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic acids research*, 24(23):4599–4607.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R. (1990). The b alleles of u. maydis, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, 60(2):295–306.
- Sellick, C. A. and Reece, R. J. (2005). Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends in biochemical sciences*, 30(7):405–412.
- Sharp, P. A., Sugden, B., and Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in haemophilus parainfluenzae using analytical agarose–ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, 12(16):3055–63. 0006-2960 Journal Article.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of dna in saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 122(1):19–27.
- Snetselaar, K. M., Bölker, M., and Kahmann, R. (1996). Ustilago maydis mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal genetics and biology*, 20(4):299–312.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among dna fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3):503–517.
- Stein, I., Peleg, Y., Even-Ram, S., and Pines, O. (1994). The single translation product of the fum1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology*, 14(7):4770–4778.
- Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2008). Ustilago maydis, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol*, 18(2):61–67.
- Sugimoto, T., Kato, T., and Park, E. Y. (2014). Functional analysis of cis-aconitate decarboxylase and trans-aconitate metabolism in riboflavin-producing filamentous ashbya gossypii. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(5):563–568.

- Sze, J. Y., Remboutsika, E., and Kohlhaw, G. B. (1993). Transcriptional regulator leu3 of *saccharomyces cerevisiae*: separation of activator and repressor functions. *Molecular and cellular biology*, 13(9):5702–5709.
- Tabuchi, T., Sugisawa, T., Ishidori, T., Nakahara, T., and Sugiyama, J. (1981). Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *candida*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(2):475–479.
- Teichmann, B. (2005). *Identifizierung der für die Ustilaginsäureproduktion zuständigen Cytochrom P450 Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 in Ustilago maydis*. PhD thesis, Philipps-Universität Marburg.
- Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M. A., and Bölker, M. (2007). A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 66(2):525–533.
- Teichmann, B., Liu, L., Schink, K. O., and Bölker, M. (2010). Activation of the ustilagic acid biosynthesis gene cluster in *ustilago maydis* by the c2h2 zinc finger transcription factor *rua1*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(8):2633–2640.
- Thompson, J. F., Schaefer, S. C., and Madison, J. T. (1990). Determination of aconitate isomerase in plants. *Analytical biochemistry*, 184(1):39–47.
- Thompson, J. F., Schaefer, S. C., and Madison, J. T. (1997). Role of aconitate isomerase in trans-aconitate accumulation in plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(9):3684–3688.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D., Espeso, E., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M., and Arst, H. (1995). The *aspergillus pacc* zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient ph. *The EMBO Journal*, 14(4):779–790.
- Todd, R. B. and Andrianopoulos, A. (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the zn (ii) 2cys6 binuclear cluster dna binding motif. *Fungal Genetics and Biology*, 21(3):388–405.
- Walton, J. D. (2000). Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 30(3):167–71.
- Watanabe, K., Katsuhara, M., Nakao, H., and Sato, M. (1997). Detection and molecular analysis of plant-and insect-associated bacteria harboring aconitate isomerase involved

- in biosynthesis of trans-aconitic acid as antifeedant in brown planthoppers. *Current microbiology*, 35(2):97–102.
- Wege, S.-M. (2018). Der trans-aconitat metabolismus in *ustilago maydis*. Master’s thesis, Philipps-Universität Marburg.
- Wheeler, K. A. and Hawkins, A. R. (1996). Control of metabolic flux through the quinate pathway in *aspergillus nidulans*. *Biochemical Journal*, 315(1):195–205.
- White, T. J., Arnheim, N., and Erlich, H. A. (1989). The polymerase chain reaction. *Trends Genet*, 5(6):185–9. 0168-9525 Journal Article Review Review, Tutorial.
- Whittington, H. A., Grant, S., Roberts, C. F., Lamb, H., and Hawkins, A. R. (1987). Identification and isolation of a putative permease gene in the quinic acid utilization (qut) gene cluster of *aspergillus nidulans*. *Current genetics*, 12(2):135–139.
- Willke, T. and Vorlop, K.-D. (2001). Biotechnological production of itaconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56:289–295.
- Wilson, R. A. and Arst, H. N. (1998). Mutational analysis of area, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *aspergillus nidulans* and a member of the “streetwise” gata family of transcription factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3):586–596.
- Woloshuk, C., Foutz, K., Brewer, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T., and Payne, G. (1994). Molecular characterization of aflr, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(7):2408–2414.
- Yim, G., Wang, H. H., and Davies, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1483):1195–200.
- Yin, W. and Keller, N. P. (2011). Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *The Journal of Microbiology*, 49(3):329–339.
- Yogev, O., Yogev, O., Singer, E., Shaulian, E., Goldberg, M., Fox, T. D., and Pines, O. (2010). Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the dna damage response. *PLoS biology*, 8(3):e1000328.
- Yuan, X.-L., Roubos, J. A., Van Den Hondel, C. A., and Ram, A. F. (2008). Identification of inur, a new zn (ii) 2cys6 transcriptional activator involved in the regulation of inulinolytic genes in *aspergillus niger*. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(1):11–26.

Yuhara, K., Yonehara, H., Hattori, T., Kobayashi, K., and Kirimura, K. (2015). Enzymatic characterization and gene identification of aconitate isomerase, an enzyme involved in assimilation of trans-aconitic acid, from pseudomonas sp. wu-0701. *The FEBS journal*, 282(22):4257–4267.

Danksagungen

Ich bedanke mich besonders bei Michael Bölker für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen und für all die Unterstützung während der letzten Jahre.

Außerdem geht mein Dank an Christof Taxis für das Erstellen eines Zweitgutachtens für diese Arbeit. Zudem danke ich Alfred Batschauer und Uwe Maier für ihre Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

Ich danke allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Bölker, AG Mösch und AG Taxis. Danke für eure Unterstützung und das super Arbeitsklima und die tolle Zeit, die wir in den letzten Jahren zusammen hatten. Mein besonderer Dank gilt meinen Bachelor-, Master- bzw. Hiwi-Studenten Sarah-Maria, Sandra und Kevin für die tolle Zusammenarbeit. Ihr habt mir in den letzten Jahren viel Arbeit abgenommen und ohne euch wäre die Zeit nicht das gewesen, was sie war. Dank geht auch an Sandra H., die auch nach ihrer Zeit bei uns im Labor immer ein offenes Ohr für mich hatte und mit Ideen und Rat zu meiner Arbeit beigesteuert hat. Besonderer Dank geht auch an Johannes. Du hast immer etwas positives in meiner Arbeit gesehen und mit Experimentiervorschlägen viel zu meiner Doktorarbeit beigetragen. Vielen Dank für die Zeit, die du dir dafür genommen hast und für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Danke auch an Thorsten und Björn dafür, dass ich mit Fragen immer zu euch kommen durfte.

Marisa möchte ich für ihr Organisationstalent danken und dafür, dass sie immer so fürsorglich um alle bemüht ist, für die vielen Gespräche und die schöne Zeit zusammen. Vielen Dank auch an Silke. Es war eine schöne, gesprächige Zeit, auch als deine Nachbarin. Vielen Dank auch an Govert und Isolde, die mir täglich ein Lächeln aufs Gesicht zauberten. Birgit Niedziella danke ich für all die Hilfe und Unterstützung bei allen administrativen Herausforderungen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich all die Jahre in meinem Vorhaben unterstützt haben. Außerdem danke ich meinem Mann Martin, der mein Leben in den letzten Jahren komplett verändert hat. Du hast immer mehr in mir gesehen, als ich das je konnte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Linda Büttner, geboren am 21.05.1990 in Frankfurt am Main, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel **Charakterisierung des *trans*-Aconitat-Metabolismus und dessen Regulierung in *Ustilago maydis*** selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Doktorarbeit wurde weder in ihrer jetzigen, noch in abgeänderter Form an einer anderen Universität oder Hochschule eingereicht.

Marburg/Lahn

Linda Büttner