Funktionelle Charakterisierung des Rum1-Proteins aus dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis*

Dissertation

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Martina Treutlein
aus Heidelberg

Marburg/Lahn 2007

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

am _____ angenommen.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Kämper

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am _____

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2001 bis Februar 2004 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen unter Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung des Rum1-Proteins aus dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfe bedient habe.

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

Marburg, den _____ _____

Martina Treutlein

Für meine Familie

Die Suche nach fremder Intelligenz ist
immer die Suche nach der eigenen.
Carl Sagan

Zusammenfassung

Ustilago maydis, der Erreger des Maisbeulenbrandes, ist ein fakultativ biotropher Basidiomyzet, dessen Lebenszyklus eine saprophytische und eine biotrophe Phase umfasst. Während der saprophytischen Phase, in der sich die haploiden Sporidien durch Knospung vermehren, liegt *U. maydis* in zwei unterschiedlichen Kreuzungsstypen vor, die sich in den *a*- und den *b*-Inkompatibilitätsloci unterscheiden. Kontrolliert durch den *a*-Locus, können Sporidien unterschiedlichen Kreuzungstyps zu einem infektiösen Dikaryon fusionieren. Nach der Fusion ist das durch den multiallelischen *b*-Locus kodierte bE-bW-Heterodimer für die Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons und die nachfolgende pathogene Entwicklung essentiell. Mit *rum1* und *hda1* konnten zwei Gene identifiziert werden, deren Deletion zur Expression b-abhängiger Gene und einer Sporogeneseblockade in der biotrophen Phase des Pilzes führt. *hda1* kodiert für ein Protein mit Ähnlichkeit zur Histondeacetylase RPD3 in *Saccharomyces cerevisiae* und Rum1 ähnelt in seiner Domänenarchitektur dem humanen Retinoblastoma-Bindeprotein 2 (RBP2). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Rum1 funktionell zu charakterisieren und dabei einen Bezug zu konservierten Domänen innerhalb des Proteins herzustellen.

Rum1 weist mehrere konservierte Domänen auf: Eine ARID (AT-rich interaction domain)- oder Dri (dead ringer domain)-Domäne, drei PHD (plant homeodomain)- oder LAP (leukemia-associated-protein)-Domänen, einen Zinkfinger des C5HC2-Typs (zf-C5HC2) und je eine JmjC- und JmjN-Domäne (JumonjiC bzw. JumonjiN). Die ARID-Domäne ist eine DNA-Bindedomäne, PHD-Domänen dienen unter anderem der Interaktion mit Histondeacetylasen und JmjC-Domänen konnte eine Funktion als Protein-Interaktionsdomäne und/oder Histondemethylase nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass sowohl die ARID-Domäne, als auch die PHD-Domänen für die Funktionalität des Rum1-Proteins entbehrlich sind. Eine essentielle Funktion konnte der JmjC-Domäne zugeordnet werden, von der bereits nachgewiesen wurde, dass sie in *U. maydis* eine Proteininteraktion vermitteln kann.

Weiterhin sollte die Hypothese überprüft werden, Rum1 und Hda1 könnten in einem gemeinsamen Repressorkomplex als Antagonist des b-Heterodimers wirken. Anhand von Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu Wildtypstämmen, bei *rum1*- bzw. *hda1*-Deletionsstämmen eine differenzielle Regulation von 286 bzw. 486 Genen vorlag, von denen über 50 % eine Koregulation in beiden Stämmen aufwiesen. Ein Vergleich der in *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen deregulierten Gene mit allen bisher bekannten b-abhängig regulierten Genen zeigte keine signifikante Überlappung der Datensätze, so dass eine global antagonistische Funktion von

b-Heterodimer und Rum1-Hda1-Repressorkomplex in der saprophytischen Phase von *U. maydis* ausgeschlossen werden kann.

Die Evidenz eines Rum1-Hda1-Komplexes wurde durch Koimmunpräzipitation verifiziert. Der Rum1-Hda1-Repressorkomplex scheint jedoch nicht der einzige Wirkungsbereich der beiden Proteine zu sein, denn eine nicht unerhebliche Anzahl deregulierter Gene in *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen weisen keine Koregulation auf. Eine Beteiligung beider Proteine an unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Multiproteinkomplexen scheint daher naheliegend. Weiterhin zeigte sich, dass Rum1- und/oder Hda1-regulierte Gene vielfach in Clustern vorliegen. Eine Transkriptionsregulation betreffender Zielgene durch eine, entsprechende genomische Bereiche umfassende, Chromatinkondensation aufgrund von Histondeacetylierung wäre somit denkbar.

Abkürzungen und Fachbegriffe

AM	Ammonium-Minimalmedium
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
C-terminal	carboxyterminal
CM	"complete medium"
cpm	"counts per minute"
Δ (Delta)	Deletion
d	Tag ("dies")
DIC	"differential interference contrast"
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Glc	Glucose
$H_20_{bid.}$	zweifach destilliertes Wasser
HD	Homeodomäne
Hda / HDAC	Histondeacetylase
HAT	Histonacetyltransferase
Hyg	Hygromycin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo-Dalton = 1000 Da
MDa	Mega-Dalton
MIPS	Munich Information center for Protein Sequences
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat
mRNA	"messenger-RNA" (=Boten-RNA)
MUMDB	MIPS *Ustilago maydis* DataBase
NMR	Kernresonanzspektroskopie ("nuclear magnetic resonance")
N-terminal	aminoterminal
NLS	"nuclear localization sequence"
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	"open reading frame"
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phenol/Chloroform
PCR	"polymerase chain reaction"
PD	"potato dextrose"
PEG	Polyethylenglycol
Phleo	Phleomycin
p. i.	nach der Infektion ("post infectionem")

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 *Ustilago maydis* - Modellorganismus für phytopathogene Pilze 1

1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis* 3

1.3 Die Paarungstyploci von *U. maydis* - Genetische Kontrolle von Dimorphismus und Pathogenität 5

1.4 Identifizierung von *rum1* und *hda1* 8

1.4.1 Rum1, ein *U. maydis*-Protein mit Ähnlichkeit zum humanen Retinoblastoma-Bindeprotein 2 (RBP2) 9

1.5 Transkriptionsregulation durch Chromatinmodifikation: Der Histoncode 12

1.5.1 Hda1, eine Histondeacetylase in *U. maydis* mit Ähnlichkeit zu RPD3 in *Saccharomyces cerevisiae* 15

1.6 Fragestellung der Arbeit 16

2 Ergebnisse 17

2.1 Rum1, ein *U. maydis*-Protein mit hoch konservierter Domänenstruktur 17

2.2 Untersuchungen zur Funktion postulierter Domänen in Rum1 19

2.2.1 Konstruktion von Domänendeletionsmutanten 19

2.2.2 Funktionalitätstests der Domänendeletionsstämme 23

2.3 Transkriptomanalyse mittels DNA-Microarrays 27

2.3.1 ARID-Domänendeletionsstämme weisen eine verschwindend geringe Anzahl deregulierter Gene auf 28

2.3.2 *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämme weisen ein überlappendes Set deregulierter Gene auf 31

2.3.3 *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämme weisen nur eine geringe Anzahl deregulierter Gene auf, die durch das b-Heterodimer reguliert werden 33

2.3.4 Transkriptionelle Regulation von Genclustern durch Rum1 und/oder Hda1 34

2.4 Proteinbiochemische Experimente zur Rum1-Komplexaufreinigung 40

2.4.1 Das TAP-Tag-Verfahren 40

2.4.2 Koimmunpräzipitation 48

3 Diskussion 53

3.1 Auswirkungen der Domänendeletionen auf die Funktionalität des Rum1-Proteins 54

3.1.1 Die ARID-Domäne ist für die Funktionalität des Rum1-Proteins entbehrlich 54

3.1.2 Die PHD-Domänen sind für die Funktion des Rum1-Proteins entbehrlich 56

3.1.3 Die JmjC-Domäne ist essentiell für die Funktionalität von Rum1 57

3.2 Rum1 und Hda1: Regulatoren eines überlappenden Gensets in der saprophytischen Lebensphase von *U. maydis.* 59

3.3 Der Rum1-Hda1-Komplex: Ausschließlich Repressor oder auch Aktivator entwicklungsspezifischer Gene? 61

3.4 Expressionsregulation von Genclustern durch Rum1 und/oder Hda1 63

3.5 In der saprophytischen Lebensphase von *Ustilago maydis* werden nur wenige b-regulierte Gene auch durch Rum1 und/oder Hda1 reguliert. 64

3.6 Optimierung des *tap*- und des *myc*-Epitops auf die bevorzugte Dikodon-Verwendung von *U. maydis* 65

3.7 Rum1 und Hda1 interagieren *in vivo* 66

3.8 Rum1 und Hda1: Obligatorisches Zusammenwirken in einem gemeinsamen Komplex oder zusätzliche, voneinander getrennte Wirkungsspektren? 67

3.9 Rum1 und RBP2: Funktionen und Spekulationen 68

3.10 Ausblick 70

4 Material und Methoden 71

4.1 Material und Bezugsquellen 71

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits 71

4.1.2 Oligonukleotide 73

4.1.3 Stämme 75

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen 77

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden 82

4.2.1 *Escherichia coli* 82

4.2.2 *Ustilago maydis* 83

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden 85

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren 85

4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren 86
4.3.4 PCR-Techniken 88
4.4 Biochemische Methoden 90
4.4.1 Isolierung von Proteinen 90
4.4.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen 91
4.4.3 Transfer von Proteinen (Western-Blot) 91
4.4.4 Nachweis von immobilisierten Proteinen 92
4.4.5 Immunpräzipitation 93
4.5 Transkriptomanalyse 94

5 Literaturverzeichnis 97

6 Anhang 111
6.1 Daten-CD 111

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis* - Modellorganismus für phytopathogene Pilze

Pilze gehören zu den erfolgreichsten Organismengruppen der Welt. Schätzungen zufolge brachte die Evolution, seit der Entstehung der Erde vor etwa 4,6 Mrd. Jahren, 1.500.000 Pilzarten hervor, die fast alle bekannten Lebensräume besiedeln. Die Überlebensstrategien der Pilze reichen von Saprotrophie, über Symbiose, bis hin zu Parasitismus. Saprophyten stellen als Zersetzer toten organischen Materials grundlegende Komponenten von Biozönosen dar, während symbiotische Pilze Lebensgemeinschaften mit Algen eingehen (Flechten) oder als Wurzel-Mykorrhiza mit Kräutern, Sträuchern und Bäumen vergesellschaftet sind. Diese Überlebensstrategien beeinflussen benachbarte oder vergesellschaftete Organismen in positivem Sinne.

Anders verhält es sich bei parasitisch lebenden Pilzen. Sie besiedeln permanent oder temporär andere Organismen, auf deren Kosten sie leben. Bereits 3.500 v. Chr. waren den Sumerern Pilzkrankheiten an Kulturpflanzen (vermutlich Rost- und Brandpilzinfektionen) bekannt, und lange Zeit glaubte man, diese entstünden aus der, die Pflanzen umgebenden, Materie. Erst 1673, mit der Erfindung des Mikroskops durch Antonie van Leeuwenhoek, konnte ein intensives Studium der Pilze beginnen. Mathieu Tillet, der 1755 in Feldversuchen bewies, dass der Weizensteinbrand (*Tilletia tritici*) sich durch Infektion des Saatgutes ausbreitet, und Targioni Tozetti, der 1767 erkannte, dass Rost eine durch Mikroorganismen hervorgerufene Pflanzenkrankheit ist, können als Väter der angewandten Mykologie und Phytopathologie angesehen werden.

Im Laufe des 20. Jahrhunderts erfuhr die Mykologie, wie die gesamten Naturwissenschaften, einen gewaltigen Aufschwung, was sich unter anderem in einer weitgehenden Spezialisierung einzelner Disziplinen niederschlug. Eine dieser Disziplinen, die Molekularbiologie, ermöglichte es in der Folgezeit, zelluläre Prozesse und Strukturen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die für solche Zwecke benötigten Modellorganismen sollten bestimmte Eigenschaften, wie z.B. einfache Kultivierung in großem Maßstab, kurze Generationszeiten, Zugänglichkeit zum Genom mit der Möglichkeit zur Manipulation und Vorhandensein eines sexuellen Zyklus, aufweisen. Ein Modellorgansimus mit diesen Eigenschaften, der bereits 1961 für Studien zur homologen Rekombination verwendet wurde (Christensen, 1963; Holliday, 1961), ist *Ustilago maydis*.

Ustilago maydis, ein fakultativ biotropher Pflanzenparasit mit engem Wirtsspektrum (infiziert werden nur Teosinte (*Euchlena mexicana*) und dessen Zuchtform *Zea mays*), wird taxonomisch in die Klasse der fruchtkörperlosen Basidiomyzeten eingeordnet:

Reich:	Fungi (Pilze)
Stamm:	Basidiomycota
Klasse:	Ustilaginomycetes
Unterklasse:	Ustilaginomycetidae
Ordnung:	Ustilaginales
Familie:	Ustilaginaceae
Gattung:	Ustilago
Art:	*Ustilago maydis*

Durch die Verfügbarkeit molekularbiologischer Methoden zur genetischen Manipulation (Fotheringham und Holloman, 1989; Tsukuda *et al*., 1988; Wang *et al*., 1988), verschiedener Selektionsmarker (Gold *et al*., 1994; Kojic und Holloman, 2000) und konstitutiver sowie induzierbarer Promotoren (Banks *et al*., 1993; Bottin *et al*., 1996; Brachmann, 2001a; Holden *et al*., 1989; Spelling *et al*., 1996; Zarnack *et al*., 2006) ist *U. maydis* ein idealer Modellorganismus für molekulare Untersuchungen. *U. maydis,* dessen Lebenszyklus durch eine saprophytische, haploide und eine biotrophe, dikaryotische Phase gekennzeichnet ist, dient der Erforschung von Infektionsmechanismen pathogener Pilze.

Durch phytopathogene Pilze kommt es weltweit zu Ernteverlusten von bis zu 25 % (Börner, 1997; Weber, 1993) und humanpathogene Pilze stellen, vor allem für immunsupprimierte Personen, eine gesundheitliche Bedrohung dar (Guarro *et al*., 1999; Kayser *et al*., 1989). Gute Ansatzpunkte für eine Bekämpfung pilzlicher Krankheiten stellen Faktoren dar, die für eine pathogene Entwicklung dieser Pilze relevant sind. Pathogenitätsmechanismen verschiedener Pilze scheinen sich stark zu ähneln, was eine Konservierung im Laufe der Evolution impliziert. Beispielsweise kann ein Wechsel zwischen hefeartigem und filamentösem Wachstum für eine Reihe von Pilzen als Voraussetzung für deren Pathogenität angesehen werden (Borges-Walmsley und Walmsley, 2000; Herman und Calderone, 2002; Lo *et al.*, 1997; Sanchez-Martinez und Perez-Martin, 2001; Truckses *et al*., 2004). Die Möglichkeit scheint daher gegeben, Ergebnisse aus Untersuchungen von *U. maydis* auch auf andere phyto- oder humanpathogene Pilze übertragen zu können.

1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Bereits 1754 beschrieb Bonnet erstmals die Symptome des Maisbeulenbrandes (Chlorosen, Nekrosen, Anthozyanbildung und dunkle Sporen enthaltende Tumore an allen oberirdischen Pflanzenteilen), doch erst 1883 war es Brefeld (Brefeld, 1883) durch Infektionsversuche möglich, *U. maydis* eindeutig als Erreger der Krankheit zu identifizieren.

Abbildung 1: Durch *U. maydis* induzierter Tumor an einem Maiskolben. Abbildung eines, durch Infektion der weiblichen Blüte deformierten, Maiskolbens. Reife Brandsporen innerhalb der hypertrophierten, aufgeplatzten Maiskörner verleihen dem Tumor ein dunkles Aussehen. Dargestellt ist ein Wildtypisolat aus Amöneburg, Hessen.

U. maydis durchläuft während seines Lebenszyklus drei verschiedene Kernphasen. In seiner haploiden Phase liegt der Pilz in Gestalt zigarrenförmiger Einzelzellen (Sporidien) vor (Abb. 2A, Seite 4), die sich saprophytisch ernähren und hefeartig über Knospung vermehren. Sporidien unterschiedlichen Kreuzungstyps sind aufgrund von Pheromonstimuli in der Lage, Konjugationshyphen auszubilden. Einem Gradienten folgend wachsen diese jeweils auf Zellen des entgegengesetzten Kreuzungstyps zu, fusionieren an der Spitze und bilden das Dikaryon (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993a; Snetselaar und Mims, 1993b) (Abb. 2B, Seite 4).

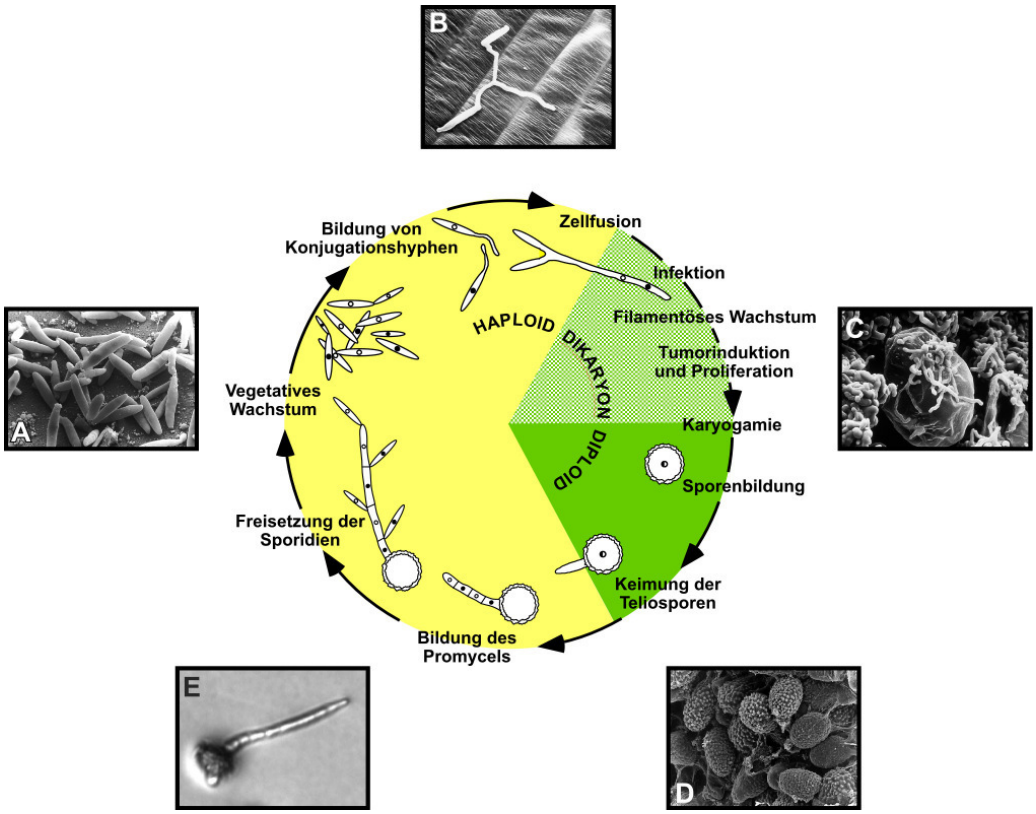

Abbildung 2: Lebenszyklus von *U. maydis*. Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis* mit entsprechenden rasterelektronen- und lichtmikroskopischen Aufnahmen der Pilzzellen. **A.** Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Sprossung. **B.** Die Fusion zweier haploider Zellen führt zur Ausbildung des filamentös wachsenden, infektiösen Dikaryons auf der Pflanzenoberfläche. **C.** Proliferation des Pilzmyzels innerhalb des pflanzlichen Tumors. **D.** Bildung von Brandsporen (Teliosporen) in sporogenen Hyphen. **E.** Keimung einer Teliospore unter Ausbildung eines Promycels. Weitere Erklärungen siehe Text. Die Abbildungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: G. Wanner, C. Quadbeck-Seeger (A, D); K. Snetselaar (B, C); S. Huber (E).

Das dikaryotische Filament auf der Oberfläche der Wirtspflanze ist im G2-Stadium arretiert (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Sgarlata und Perez-Martin, 2005) und durch Spitzenwachstum gekennzeichnet. In der Hyphenspitze werden das gesamte Zytoplasma sowie beide Kerne akkumuliert, während ältere Hyphenabschnitte durch Septen abgetrennt werden (Banuett und Herskowitz, 1994; Christensen, 1963). Ein Appressorium ermöglicht dem Pilz das Eindringen in die Pflanze, und durch intra- sowie interzelluläre Proliferation wird das Wirtsgewebe besiedelt (Banuett und Herskowitz, 1996). Im Gegensatz zum Spitzenwachstum auf der Pflanzenoberfläche liegt in dieser invasiven, biotrophen Phase des Pilzes eine echte Proliferation vor, denn die durch Septen voneinander getrennten und teilweise verzweigten Hyphenabschnitte enthalten Zytoplasma und jeweils zwei Kerne unterschiedlichen Kreuzungstyps (Banuett und Herskowitz, 1996). Über noch ungeklärte Mechanismen induziert *U. maydis* in dieser Phase eine Hypertrophie und Hyperplasie der pflanzlichen Zellen, was zur Ausbildung der für *U. maydis*-Infektionen typischen Tumore führt. In diesem Tumorgewebe werden die sogenannten sporogenen Hyphen gebildet, in denen die

Karyogamie stattfindet (Abb. 2C, Seite 4). Im Laufe der Sporenreifung werden die sporogenen Hyphen fragmentiert, so dass diploide Einzelzellen entstehen. Diese runden sich ab und bilden die dunkel pigmentierten, mit einer charakteristischen Oberflächenstruktur versehenen Sporenhüllen aus (Banuett und Herskowitz, 1996; Christensen, 1963) (Abb. 2D, Seite 4). Durch das Aufplatzen der Tumore, die an allen überirdischen Pflanzenteilen vorliegen können, werden die dunklen Brand- oder Teliosporen freigesetzt, die der Wirtspflanze das typische "verbrannte" Aussehen verleihen, das dieser Pilzinfektion den Namen „Maisbeulenbrand“ einbrachte (Abb. 1, Seite 3). Die gegenüber Umwelteinflüssen sehr resistenten Brandsporen werden durch Wind und Regen verbreitet und sind unter geeigneten Bedingungen auch noch nach Jahren in der Lage auszukeimen (Abb. 2E, Seite 4). Während des Auskeimens durchlaufen die diploiden Sporen zwei meiotische Teilungen, so dass in die auswachsende Probasidie vier haploide Kerne einwandern. Von dieser Probasidie werden nun sukzessive Sporidien abgeschnürt (Christensen, 1963), die wiederum mit kompatiblen Kreuzungspartnern fusionieren können und damit den Lebenszyklus von *U. maydis* von neuem beginnen lassen.

1.3 Die Paarungstyploci von *U. maydis* - Genetische Kontrolle von Dimorphismus und Pathogenität

Mit der Infektion einer Wirtspflanze beginnt die pathogene Lebensphase von *U. maydis*. Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion ist das filamentöse Wachstum des Pilzes, das auf die Fusion zweier kompatibler Sporidien folgt.

Zell/Zell-Erkennung sowie die Fusion der haploiden Sporidien werden durch den biallelischen *a*-Inkompatibilitäts-Locus (*a1* und *a2*) reguliert, der für ein Pheromon/Pheromonrezeptorsystem kodiert (Trueheart und Herskowitz, 1992). Dabei handelt es sich um die posttranslational modifizierten Pheromonvorläufer Mfa1 bzw. Mfa2 und die zugehörigen membranständigen Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2, die eine Erkennung des jeweils kompatiblen Pheromons vermitteln (Bölker *et al.*, 1992).

Die Etablierung des Dikaryons wird durch den multiallelischen *b*-Locus reguliert. Zurzeit kennt man 19 verschiedene *b*-Allele (Kahmann *et al*., 1995; Kämper *et al*., 1995; Puhalla, 1968; Rowell und DeVay, 1954). Jedes Allel enthält die Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), die ausgehend von einem etwa 200 bp umfassenden intergenischen Bereich divergent transkribiert werden. Die Proteine bEast (bE) und bWest (bW) sind in ihrem C-terminalen Bereich zu etwa 90 % identisch, während die N-terminalen Teile der Proteine eine hohe Variabilität auf Aminosäure-Ebene aufweisen (Gillissen *et al*., 1992; Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al*., 1990). In der konstanten Region befindet sich ein

60 bis 63 Aminosäuren langes Homeodomänenmotiv, das als hoch konservierte DNA-Bindedomäne die b-Proteine als sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren kennzeichnet (Abb. 3a) (Bürglin, 1994; Gehring *et al*., 1994; Gillissen *et al*., 1992; Kronstad und Leong, 1989; Schulz *et al*., 1990).

Voraussetzung für eine erfolgreiche pathogene Entwicklung ist die Interaktion von bE- und bW-Proteinen über ihre N-Termini, was zur Ausbildung eines stabilen Heterodimers führt. Ausschließlich bE- und bW-Proteine, die von unterschiedlichen Allelen abstammen, sind in der Lage zu heterodimerisieren (Abb. 3b) (Bölker *et al.*, 1995; Gillissen *et al*., 1992; Kämper *et al*., 1995). Unter natürlichen Bedingungen ist diese Situation nach der Fusion zweier Sporidien unterschiedlichen Kreuzungstyps gegeben.

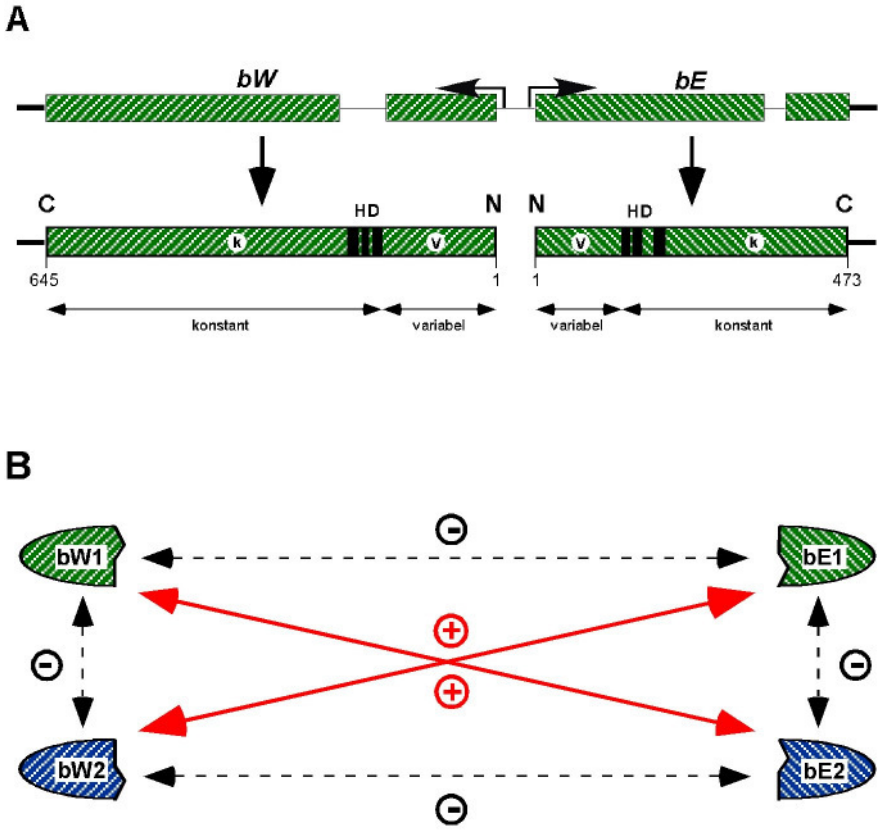

Abbildung 3: Schematische Darstellung des *b*-Locus und der Dimerisierungseigenschaften der Homeodomänenproteine bE und bW. A. Darstellung des *b*-Locus und der durch diesen kodierten Homeodomänenproteine bW und bE. Die *b*-Gene werden, ausgehend von einem intergenischen Bereich, divergent transkribiert (Pfeilrichtung). Die konstanten Regionen der b-Proteine sind mit "k" markiert, die variablen Abschnitte mit "v". "HD" kennzeichnet die Homeodomänen. Die Länge der Proteine in Aminosäuren ist an den C-Termini angegeben. **B.** Allelspezifische Dimerisierung der b-Proteine. Ein funktionelles b-Heterodimer wird nur gebildet, wenn die bE- und bW-Homeodomänenproteine von unterschiedlichen Allelen stammen.

Unter Laborbedingungen konnte durch einen Genaustausch der haploide, solopathogene Stamm CL13 generiert werden. Bedingt durch eine *bE1-bW2*-Genkombination liegt in haploiden Zellen dieses Stammes ein aktives b-Heterodimer vor (Bölker *et al*., 1995). Die zentrale Bedeutung des aktiven b-Heterodimers für die pathogene Differenzierung von *U. maydis* wird dadurch deutlich, dass solopathogene Stämme auch ohne kompatible Kreuzungspartner in der Lage sind, Wirtspflanzen zu infizieren.

Da Mutationen in den Homeodomänen der b-Proteine zu einem Verlust der Pathogenität führen (Schlesinger *et al.*, 1997) lag die Vermutung nahe, der aktive b-Komplex könnte als Transkriptionsfaktor wirken. Tatsächlich konnte mit Hilfe eines bE-bW-Fusionsproteins gezeigt werden, dass das aktive b-Heterodimer direkt an definierte Promotorsequenzen der Gene *lga2*, *frb52* und *dik6* bindet, deren Expression es reguliert (Brachmann *et al*., 2001b; Romeis *et al*., 2000; Weinzierl, 2001).

Neben b, als Schlüsselregulator der pathogenen Entwicklung, kommen einigen direkt (als Klasse I-Gene bezeichnet) oder indirekt (als Klasse II-Gene bezeichnet) durch das bE-bW-Heterodimer regulierten Genen wichtige Funktionen während der biotrophen Phase von *U. maydis* zu (Abb. 4, Seite 8): Mit *rbf1* konnte ein Klasse I-Gen identifiziert werden, das für einen C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor kodiert, der die Mehrzahl aller b-abhängigen Gene reguliert und somit eine zentrale Position in der Regulationskaskade unterhalb von b einnimmt (Scherer *et al.*, 2006). *clp1* ist ein weiteres, direkt durch b reguliertes Gen, dem offensichtlich eine Funktion bei der Zellteilungsregulation im Dikaryon zukommt. *clp1*-Deletionsmutanten sind nach Penetration der Pflanzencuticula nicht mehr in der Lage zu proliferieren, und Überexpressionsstämme weisen eine Blockade bei der Ausbildung b-abhängiger Filamente und des b-abhängigen Zellzyklus-Arrests auf (Scherer *et al.*, 2006). Ein Klasse II-Gen, das eine wichtige Rolle während der pathogenen Entwicklung spielt, ist das für ein Zinkfinger-Protein kodierende *biz1*. Das Biz1-Protein (b-induced zinc finger protein) ist an der Ausbildung von Appressorien und, durch seine Repressorfunktion für das Gen des mitotischen Cyclins *clb1*, an der Induktion des Zellzyklusarrest nach Pflanzeninfektion beteiligt (Flor-Parra *et al*., 2006).

Es muss davon ausgegangen werden, dass viele weitere direkt oder indirekt durch b regulierte Gene existieren, deren Zusammenspiel die pathogene Entwicklung des Pilzes steuert. Durch die Identifizierung dieser Gene ist ein detaillierterer Einblick und damit ein differenzierteres Bild der Pathogenitätsmechanismen von *U. maydis* zu erwarten.

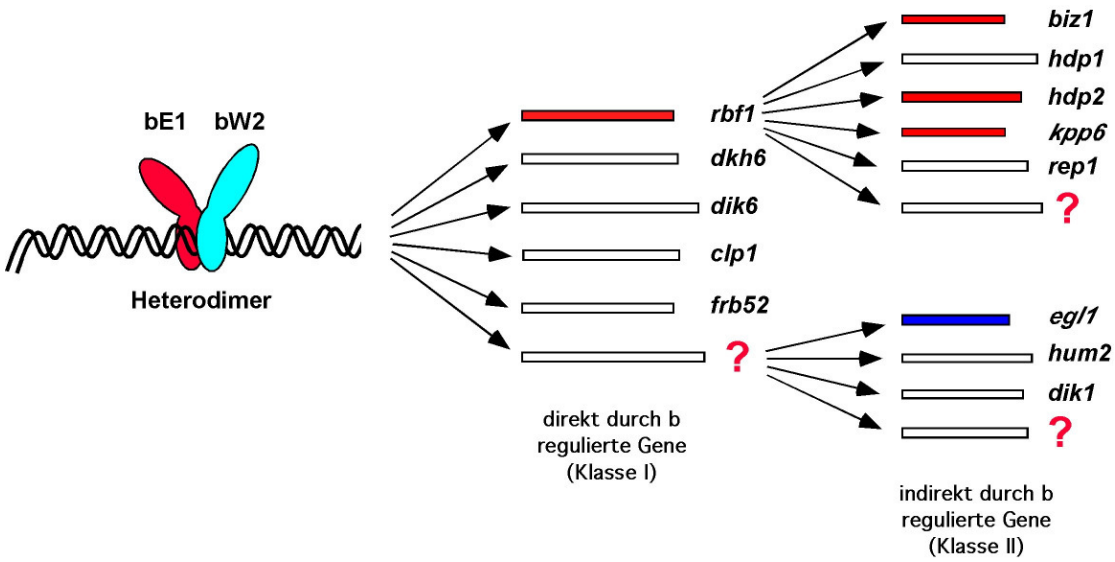

Abbildung 4: Schematische Darstellung der durch das bE-bW-Heterodimer vermittelten Regulationskaskade. Das aktive b-Heterodimer bindet an b-Bindungsstellen in Promotoren der Klasse I-Gene, deren Transkription dadurch direkt reguliert wird. Bestimmte Klasse I-Gene wiederum wirken ebenfalls als Transkriptionsregulatoren, so dass eine b-Regulationkaskade in Gang gesetzt wird. Ein zentrales Klasse I-Gen ist *rbf1* (repressor of b-dependent filamentation 1), dessen Expression zur Aktivierung mehrerer für die Pathogenität von *U. maydis* wichtiger Gene führt. Gene, deren Deletion zu reduzierter Pathogenität führt, sind rot gekennzeichnet. Die Transkription der Klasse II-Gene wird indirekt durch b reguliert. Zu den Klasse II-Genen gehört unter anderem auch *egl1* (blau dargestellt).

1.4 Identifizierung von *rum1* und *hda1*

Das aktive b-Heterodimer ist ein zentraler Regulator der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Als Transkriptionsfaktor ist es unter anderem für die direkte und indirekte transkriptionelle Regulation von Genen verantwortlich, die maßgeblich an der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* beteiligt sind. Um Gene zu identifizieren, die in der postulierten Signalkaskade zwischen b- und indirekt durch b-regulierten Genen liegen, wurde eine UV-Mutagenese durchgeführt, bei der *egl1* als Reporter diente (Quadbeck-Seeger *et al.*, 2000; Reichmann, 2002). *egl1* ist ein b-abhängig exprimiertes Gen, das für die von *U. maydis* sekretierte Endoglukanase Eg1 kodiert, deren Aktivität leicht auf Carboxymethylzellulose-haltigem Medium (CMC-Medium) nachgewiesen werden kann (CMC-Test) (Abb. 5).

Abbildung 5: Nachweis von Endoglukanasesekretion auf Carboxymethylzellulose-haltigem Festmedium (CMC-Test). Durch eine Färbung mit Kongorot und eine anschließende Entfärbungsprozedur kann die Sekretion von Endoglukanase auf CMC-haltigem Festmedium nachgewiesen werden. Bereiche, in denen Endoglukanase sekretiert wurde, zeichnen sich durch Halobildung aus.

Nach UV-Mutagenese konnten zwei haploide Mutanten isoliert werden, die *egl1* unabhängig von der Präsenz eines aktiven bE-bW-Heterodimers exprimieren. Durch Komplementation der Mutanten konnten *hda1,* das für eine Histondeacetylase kodiert (Reichmann *et al*., 2002), und *rum1* (regulator of *Ustilago maydis 1*) (Quadbeck-Seeger *et al*., 2000) identifiziert werden.

1.4.1 Rum1, ein *U. maydis*-Protein mit Ähnlichkeit zum humanen Retinoblastoma-Bindeprotein 2 (RBP2)

Haploide *rum1*-Deletionsstämme wurden untersucht, um einen Eindruck von der Funktion des Rum1-Proteins zu erhalten. Neben *egl1* konnten weitere Gene (*rep1, frb52, dik1, hum2, lga2*) identifiziert werden, die in diesen Stämmen unabhängig von einem aktiven b-Heterodimer exprimiert werden. Die Funktion von Rum1 ist jedoch nicht nur auf das haploide Stadium des Pilzes beschränkt. Das Dikaryon von Δ*rum1*-Stämmen leitet zwar die Tumorbildung ein, eine Differenzierung erfolgt jedoch nur bis zu den wurmartigen Präsporulationshyphen. Die weitere Sporogenese ist blockiert und eine Bildung von reifen, keimungsfähigen Sporen findet nicht statt (Quadbeck-Seeger *et al*., 2000).

rum1 besitzt einen offenen Leserahmen von 6.867 bp, der keine Intron-Sequenzen enthält. Domänenzusammensetzung und -architektur des Rum1-Proteins ähneln stark dem des humanen RBP2-Proteins. Folgende potentielle Domänen wurden identifiziert (Quadbeck-Seeger *et al*., 2000): eine ARID (AT-rich interaction domain)- oder Dri (dead ringer domain)-Domäne (Gregory *et al*., 1996; Iwahara und Clubb, 1999; Kortschak *et al*., 2000), drei PHD (plant homeodomain)- oder LAP (leukemia-associated-protein)-Domänen (Aasland *et al*., 1995; Saha *et al*., 1995), ein Zinkfinger des C5HC2-Typs (zf-C5HC2) und je eine JmjC- und JmjN-Domäne (JumonjiC bzw. JumonjiN) (Balciunas und Ronne, 2000; Clissold und Ponting, 2001). Struktur und Funktion einiger dieser Domänen wurden bereits in verschiedenen Proteinen anderer Spezies untersucht:

ARID-Domäne

Die ARID-Domäne ist eine etwa 100 Aminosäuren umfassende, Helix-Schleife-Helix (helix-turn-helix) basierende DNA-Bindedomäne, die in allen Eukaryoten konserviert ist. ARID-Proteine scheinen eine wichtige Rolle während Entwicklungsprozessen, gewebespezifischer Genexpression und Zellwachstumsregulation zu spielen (Kortschak *et al*., 2000; Wilsker *et al*., 2002). Obwohl die ersten identifizierten ARID-Proteine Bright (Herrscher *et al*., 1995) und Dead ringer (Gregory *et al*., 1996) präferenziell an AT-reiche Bereiche in der DNA binden, scheint die Bindespezifität nicht auf der Funktion der ARID-Domäne zu beruhen (Collins *et al*., 1999; Dallas *et al*., 2000), denn die Mehrheit der ARID-Domänen-Proteine (darunter auch die Rum1-ähnlichen Proteine RBP2, PLU-1

und XE169) bindet ohne erkennbare Sequenzspezifität an DNA (Patsialou *et al*., 2005). Die DNA-Bindung wird durch eine Interaktion der ARID-Domäne mit der großen und der kleinen Furche vermittelt (Abb. 6).

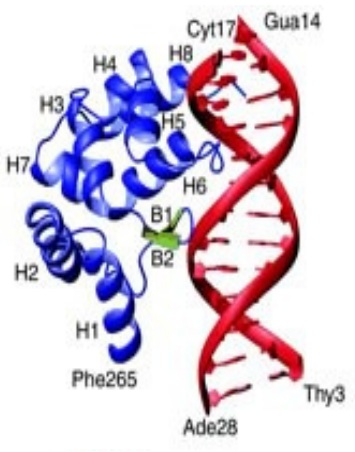

Abbildung 6: Schematische Darstellung der 3D Struktur eines ARID-DNA Komplexes (Iwahara und Clubb, 1999). Das Protein ist blau, die DNA rot dargestellt.

JmjC- und JmjN-Domäne

Die JmjC-Domäne wurde erstmals aufgrund von Sequenzähnlichkeiten der Proteine Jumonji (auch als Jarid2 bezeichnet), Xe169 (auch als Jarid1C bezeichnet) und RBP2 (auch als Jarid1A bezeichnet) identifiziert (Balciunas und Ronne, 2000; Clissold und Ponting, 2001; Takeuchi *et al*., 1995). JmjC-Domänen verschiedener Proteine weisen unterschiedliche Funktionen auf. Im humanen PLU-1 und in EPE1 aus *Schizosaccharomyces pombe* dient sie als Protein-Interaktionsdomäne (Tan *et al*., 2003; Zofall und Grewal, 2006), während sie bei Proteinen der JHDM-Gruppe (JmjC domain containing histone demethylase) (JHDM2A (Yamane *et al*., 2006), JHDM1A, JHDM1B (Tsukada *et al*., 2006), JHDM3A, JMJD2B (Fodor *et al*., 2006; Klose *et al*., 2006b; Whetstine *et al*., 2006)) die enzymatische Aktivität einer Histondemethylase besitzt. Das aktive Zentrum der JmjC-Domäne wird durch acht β-Stränge gebildet, die ein zweiwertiges Eisenatom (Fe(II)) und Alpha-Ketoglutarat (αKG) koordinieren (Chen *et al*., 2006; Dann *et al*., 2002; Elkins *et al*., 2003; Lee *et al*., 2003). Drei Aminosäurereste binden den Fe(II)-Kofaktor und zwei weitere Aminosäurereste sind für die Bindung von αKG verantwortlich (Abb. 7, Seite 11).

Das Vorkommen von JmjN-Domänen ist strikt an die Präsenz von JmjC-Domänen gekoppelt, viele Proteine besitzen jedoch eine JmjC-Domäne ohne eine JmjN-Domäne zu beinhalten (Clissold und Ponting, 2001). Bei den humanen JHDM3/JMJD2-Histondemethylasen bilden JmjC- und JmjN-Domäne eine funktionelle Einheit, die als Voraussetzung für die enzymatische Aktivität der

Proteine angesehen werden kann (Chen *et al*., 2006; Fodor *et al*., 2006; Klose *et al*., 2006b; Whetstine *et al*., 2006).

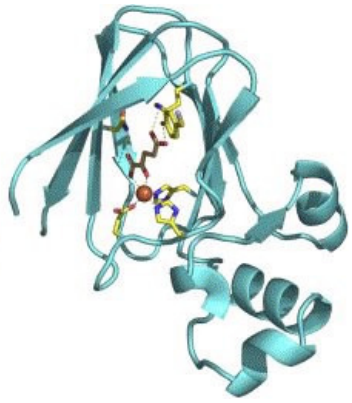

Abbildung 7: Schematische Darstellung einer 3D-Struktur der JmjC-Domäne aus JMJD2A (Chen *et al*., 2006). Das Protein ist blau, αKG und Fe(II) rot dargestellt.

PHD-Domäne

Die PHD-Domäne, ein Motiv, das durch sieben Cysteine (C) und ein Histidin (H) charakterisiert ist, zeigt einen C4HC3-Konsensus mit Zwischensequenzen unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung (Aasland *et al*., 1995). PHD-Domänen werden vorwiegend bei Proteinen gefunden, deren Funktion in der Transkriptionsregulation durch Modifikation der Chromatinstruktur liegt (Aasland *et al*., 1995). Mehrere unabhängige Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass es sich bei der PHD-Domäne um eine durchschnittlich 51 Aminosäuren lange, autonom faltende, globuläre Domäne handelt, die zwei Zinkatome (Zn) über Kreuz bindet. Dabei ist die Bindung der beiden Zinkatome unentbehrlich für die korrekte Faltung der Domäne. Die strukturgebende Komponente der PHD-Domäne scheint das Schema der Zinkbindung zu sein, wobei die Aminosäuren C1, C2, H und C5 das erste und C3, C4, C6 und C7 das zweite Zinkatom binden (Abb. 8, Seite 12) (Capili *et al*., 2001; Pascual *et al*., 2000). Die PHD-Domäne ist in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen, unter anderem auch mit Histondeacetylasen, einzugehen (Fair *et al*., 2001; O´Connell *et al*., 2001; Schultz *et al*., 2001; Zhang *et al*., 1998).

Die wichtige Rolle von PHD-Domänen zeigt sich durch die Existenz pathologischer PHD-Domänen-Mutationen, die Ursache verschiedener menschlicher Krankheiten wie z.B. des ATRX-Syndroms, des Williams-Beuren-Syndroms, des Rubinstein-Taybi-Syndroms und der Myeloiden Leukämien sind (Capili *et al*., 2001; Bjorses *et al*., 2000; Gibbons *et al*., 1997).

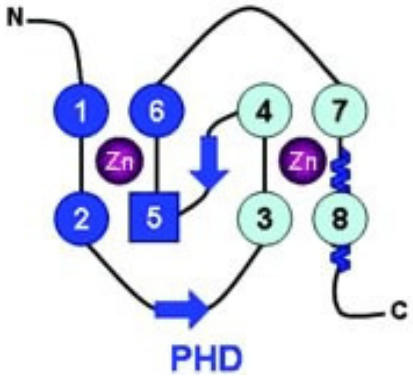

Abbildung 8: Schematische Darstellung der über Kreuz gebundenen Zinkatome bei PHD-Domänen (Bottomley *et al*., 2005)

1.5 Transkriptionsregulation durch Chromatinmodifikation: Der Histoncode

DNA in eukaryotischen Zellen ist in Form von Chromatin organisiert. Nukleosomen, die Grundbausteine des Chromatins, bestehen jeweils aus einem Oktamer der vier Kernhistonproteine H2a, H2b, H3 und H4, um das 147 bp der DNA gewunden sind (Kornberg, 1999). Die Interaktion der DNA mit Histonproteinen resultiert in einer Komprimierung, die in verschiedenen Chromatinbereichen unterschiedliche Ausmaße annimmt. Im Gegensatz zum Heterochromatin, in dem sich im Allgemeinen inaktive Gene befinden, weisen die klassischerweise als Euchromatin bezeichneten, transkriptionell aktiven Regionen einen vergleichsweise geringen Komprimierungsgrad auf. Die Struktur des Chromatins wird von Histonmodifikationen wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung beeinflusst, die außerdem eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Genregulation spielen (Grunstein, 1997; Spencer und Davie, 1999; Turner, 2000).

Das als Histoncode bezeichnete geordnete Zusammenwirken von Art, Ausmaß und Ort der Chromatinmodifikationen erweitert das informative und regulatorische Potential des Genoms immens und ermöglicht eine spezifische Transkriptionsregulation (Berger, 2002; Jenuwein und Allis, 2001; Spotswood und Turner, 2002; Yamagoe *et al*., 2003).

Einen wesentlichen Beitrag zur Tanskriptionsregulation durch Chromatinmodifikation liefern Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs). Durch die Acetylierung N-terminal exponierter Lysinreste der Kernhistone H3 und H4 wird die positive Ladung der Histone reduziert und infolgedessen die Bindungsstärke zwischen negativ geladener DNA und Histonen vermindert. Eine Deacetylierung der Lysinreste hingegen resultiert in einer verstärkten Histon-Histon-Wechselwirkung zwischen benachbarten Nucleosomen, was zur Ausbildung einer kompakten Chromatinstruktur führt (Gregory *et al*., 2001; Kurdistani und Grunstein, 2003). Lange Zeit ging man davon aus, dass die durch eine Acetylierung bedingte "offene" Chromatinstruktur die DNA für

eine Bindung von Transkriptionsfaktoren zugänglich macht und somit die Grundvoraussetzung für eine Transkription betroffener Gene darstellt. Eine Deacetylierung hingegen wurde mit einer Repression und transkriptionell inaktiven Genen in Verbindung gebracht (Davie und Chadee, 1998; Grant *et al*., 1999; Gregory *et al*., 2001; Kurdistani und Grunstein, 2003; Turner, 2000).

Erkenntnisse der letzten Jahre lassen jedoch einen weitaus komplexeren Regulationsmechanismus durch HATs und HDACs vermuten. Es konnte gezeigt werden, dass über Lysinacetylierung von Histonen neue Bindungsstellen für die Bromodomänen verschiedener Proteine geschaffen werden (Dyson *et al.*, 2001; Loyola und Almouzni, 2004; Yang, 2004; Zeng und Zhou, 2002). Dabei ist nicht der Acetylierungsgrad des Histons, sondern die Position des acetylierten Lysinrests relevant (Clayton *et al*., 2006). Eine Deacetylierung spezifischer Histone sollte folglich zu einer Maskierung potentieller Proteinbindestellen führen.

Es existieren zwei verschiedene Modelle, wie HATs und HDACs an die Promotoren ihrer Zielgene gelangen. Dabei ist eine zeitgleiche Realisierung beider Modelle durchaus denkbar. Beim genspezifischen, sequenzabhängigen Modell werden HATs und/oder HDACs, basierend auf einer direkten oder indirekten Affinität zu definierten DNA-Sequenzen, in entsprechenden Genbereichen positioniert. Dies scheint der Hauptmechanismus regionaler Histonacetylierung und -deacetylierung zu sein (Kouzarides, 1999). Im zweiten Modell wird die Rekrutierung von HATs und/oder HDACs auf bereits bestehende Histonmodifikationen zurückgeführt. So führt eine H3K4-Methylierung (Methylierung des Lysins K4 am Kernhiston H3), ungeachtet ihrer genomischen Lokalisation, zu einer Rekrutierung von HATs und HDACs, die an dieser Position einen hohen Acetylierungs-Umsatz (Turnover) bewirken (Bernstein *et al*., 2005; Liang *et al*., 2004; Schubeler *et al*., 2004). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass nicht der Acetylierungsstatus, sondern der Acetylierungs-Turnover für eine effiziente Induzierung von Genen ausschlaggebend ist (Forsberg *et al.*, 2000; Hazzalin und Mahadevan, 2005; Sakamoto *et al*., 2004; Spencer und Davie, 2001). Eine Genaktivierung würde in diesem Fall nicht zwingend mit einer Hyperacetylierung der Histone in Verbindung gebracht werden, sondern mit einem definierten Acetylierungs-Turnover sowie einem bestimmten Gleichgewichtszustand (Steady-State Level) der Acetylierung (Clayton *et al*., 2006; Hazzalin und Mahadevan, 2005).

Die Methylierung von Arginin- (R) und Lysinresten (K) der Kernhistone stellt eine andere wichtige Chromatinmodifikation dar, die an der Regulation vieler Prozesse einschließlich Genaktivität, Chromatinstruktur, Dosiskompensation und epigenetischem Gedächtnis beteiligt ist (Martin und Zhang, 2005). Im Allgemeinen findet man in transkriptionell inaktiven Regionen des Chromatins Methylierungen an H3K9, H3K27 und H4K20 (Methylierung der Lysine K9 und K27 am Kernhiston H3 und Methylierung des Lysins K20 am Kernhiston H4), während Methylierungen an H3K4,

H3K36 und H3K79 (Methylierung der Lysine K4, K36 und K79 am Kernhiston H3) in transkriptionell aktiven Regionen gefunden werden (Martin und Zhang, 2005; Sims *et al*., 2003). Doch scheint dies keine Regel zu sein, denn eine Methylierung von H3K9 konnte auch an transkriptionell aktiven Genen festgestellt werden (Vakoc *et al*., 2005) und die Methylierung von H3K36 ist offensichtlich in der Lage, eine intragenische Transkriptionsinitiation zu reprimieren (Carrozza *et al.*, 2005). Die Funktionalität des Histonmethylierungssystems beruht vermutlich auf Proteinen, die definierte Methylierungszeichen erkennen und nach DNA-Bindung ihre Funktion auf das umgebende Chromatin ausüben (Bannister *et al*., 2001; Lachner *et al*., 2001). Dabei ist nicht nur die Lokalisierung, sondern auch der Methylierungsstatus (Mono-, Di- oder Trimethylierung) ausschlaggebend (Wysocka *et al*., 2006).

Bislang konnten drei verschiedene Enzymklassen charakterisiert werden, die in der Lage sind, Histonmethylierungen zu revidieren:

1. Histondemethyliminasen (z.B. PAD4/PADI4) setzen Methyl-Arginin in Citrullin um (Cuthbert *et al*., 2004; Wang *et al*., 2004).
2. Lysin-spezifische Demethylasen (z.B. BHC110/LSD1) spalten durch eine oxidative Reaktion, bei der Flavin als Cofaktor beteiligt ist, Methylgruppen der Lysinreste H3K4 oder H3K9 ab (Metzger *et al*., 2005; Shi *et al*., 2004).
3. JHDMs (JmjC-domain containing histone demethylases), Histondemethylasen die eine JmjC-Domäne enthalten, stellen die umfangreichste Gruppe dar. Diese Enzyme katalysieren oxidative Demethylierungsreaktionen von Lysinresten. Für einige dieser Histondemethylasen wurde eine Abhängigkeit von den Kofaktoren Fe(II) und αKG beschrieben, die für eine enzymatische Reaktion essentiell zu sein scheint (Tsukada *et al*., 2006; Whetstine *et al*., 2006; Yamane *et al*., 2006).

Die Tatsache, dass Methylierung an H3K4 und Acetylierung an H3K9 in identischen chromosomalen Regionen detektiert werden konnten (Bernstein *et al*., 2005; Liang *et al*., 2004; Schubeler *et al*., 2004), führte zur Hypothese der gekoppelten Histonmodifikationen: Ein spezifisches Methylierungsmuster bedingt die Bindung anderer Proteine, die ihre Funktion auf den umliegenden Chromatinbereich ausüben (Bannister *et al*., 2001; Lachner *et al.*, 2001). Im Fall eines HDAC und/oder HAT enthaltenden Komplexes würde sich der Gleichgewichtszustand (Steady-State Level) der Acetylierung und/oder der Acetylierungs-Umsatz (Turnover) im betroffenen Chromatinbereich ändern (Bernstein *et al*., 2005; Liang *et al*., 2004; Schubeler *et al.*, 2004), was wiederum die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotoren der entsprechenden Zielgene beeinflussen könnte. Doch

auch ein definiertes Acetylierungsmuster oder aber der hypoacetylierte Zustand eines Nukleosoms kann eine Demethylierung entsprechender Histone induzieren (Forneris *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Shi *et al*., 2005), so dass eine Kopplung von Histondemethylierung und Histondeacetylierung auch in umgekehrter Richtung möglich scheint.

1.5.1 Hda1, eine Histondeacetylase in *U. maydis* mit Ähnlichkeit zu RPD3 in *Saccharomyces cerevisiae*

Eine Deletion des *rpd3*-Gens in Hefe führt zur Deregulation einer distinkten Gruppe von Genen. Darunter sind Gene, die in meiotischen, zelltypspezifischen und metabolischen Prozessen involviert sind (Kadosh und Struhl, 1998). Hda1 in *U. maydis* kodiert für eine Histondeacetylase des RPD3-Typs. Ebenso wie bei Δ*rpd3*-Stämmen in Hefe führt eine Deletion von *hda1* in *U. maydis* zu keiner generellen und unspezifischen Deregulation von Genen. Viele der als Hda1-abhängig exprimiert identifizierten Gene fallen in die Gruppe der b-regulierten und entwicklungsspezifisch exprimierten Gene (Huber *et al*., 2002; Torreblanca *et al*., 2003). Auffällig ist der sich stark ähnelnde Phänotyp von Δ*hda1*- und Δ*rum1*-Stämmen (Reichmann *et al*., 2002). Im Laufe der Infektion einer Wirtspflanze kommt es, nach der Fragmentierung sporogener Hyphen, zu einer Entwicklungsblockade. Ebenso wie bei Δ*rum1*-Stämmen wird eine nur unvollständige Sporogenese beobachtet, die sich durch die Unfähigkeit, reifes Sporenmaterial zu bilden, auszeichnet (Reichmann *et al*., 2002). Hda1 liegt in einem Komplex von etwa 2 MDa vor (Reichmann *et al*., 2002), so dass die Vermutung nahe lag, Rum1 (252 kDa) und Hda1 (70 kDa) könnten Teil eines Multiproteinkomplexes darstellen, der eine definierte Gruppe von Zielgenen reguliert. Eine direkte oder indirekte Interaktion von Rum1 und Hda1 konnte jedoch bislang nicht nachgewiesen werden.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Neben dem b-Heterodimer, das eine zentrale Position während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* einnimmt, konnten *rum1* und *hda1* identifiziert werden, deren Deletion zu einer Sporogeneseblockade sowie zur Expression b-regulierter Gene in der saprophytischen Lebensphase von *U. maydis* führt. *hda1* kodiert für eine Histondeacetylase (Jamnischek, 2003; Reichmann *et al*., 2002; Reichmann, 2002) und *rum1* für ein Protein mit Ähnlichkeit zum humanen Retinoblastoma-Bindeprotein 2 (RBP2) (Quadbeck-Seeger, 1998; Quadbeck-Seeger *et al.*, 2000). Während es bereits Hinweise darauf gibt, dass Hda1 mittels Chromatinmodifikation eine transkriptionelle Repressorfunktion übernimmt, ist die Wirkungsweise des Rum1-Proteins bislang weitgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, Rum1 funktionell zu charakterisieren und dabei einen Bezug zu konservierten Domänen innerhalb des Proteins herzustellen. Untersucht werden sollten die ARID-, die JmjC- und die PHD-Domänen. Weiterhin sollte die Hypothese überprüft werden, dass Rum1 und Hda1 als Komponenten eines gemeinsamen Multiproteinkomplexes die Transkription eines definierten Gensets kontrollieren. Ob der putative Rum1-Hda1-Repressorkomplex eine zum b-Heterodimer antagonistische Funktion aufweist und auf diese Weise die pathogene Entwicklung von *U. maydis* beeinflusst, sollte anhand von Transkriptom-Analysen untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Rum1, ein *U. maydis*-Protein mit hoch konservierter Domänenstruktur

Eine Deletion des 6.867 bp umfassenden, intronfreien *rum1* führt in der saprophytischen Phase des Pilzes zur Expression b-regulierter Gene. Für das Rum1-Protein werden mehrere Domänen vorhergesagt, von denen angenommen wurde, dass sie bestimmte Funktionen innerhalb des Proteins übernehmen (Quadbeck-Seeger *et al*., 2000):

Es konnten eine ARID-Domäne (Gregory *et al*., 1996; Iwahara und Clubb, 1999; Kortschak *et al*., 2000), als potentielle DNA-Bindestruktur (Gregory *et al*., 1996; Herrscher *et al*., 1995; Yuan *et al*., 1998), drei PHD-Domänen (Aasland *et al*., 1995; Saha *et al*., 1995), als potentielle Protein-Interaktionsmotive mit Histondeacetylasen, ein Zinkfinger des C5HC2-Typs (zf-C5HC2), eine JmjC- und eine JmjN-Domäne (Balciunas und Ronne, 2000) identifiziert werden. Die JmjC-Domäne im humanen RBP2 dient der Interaktion mit entwicklungsspezifischen Transkriptionsrepressoren (Balciunas und Ronne, 2000; Clissold und Ponting, 2001; Lu *et al*., 1999; Takeuchi *et al*., 1995; Tan *et al*., 2003), während sie in bestimmten Histondemethylasen essentiell für deren enzymatische Aktivität ist (Klose *et al*., 2006a; Klose *et al*., 2006b; Tsukada *et al*., 2006). Eine Kernlokalisationssequenz von Aminosäure 1.069 bis 1.085 (AS 1.069-1.085) lässt auf die Präsenz von Rum1 im Zellkern schließen (PENCE Proteome Analyst for Subcellular Localization p=1,00).

Unter Zuhilfenahme von Sequenzdatenbanken wurde eine Homologiesuche durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Reihe von Organismen, darunter auch viele Pilze, Proteine besitzen, die in Hinblick auf Vorkommen und Anordnung der Domänen eine starke Ähnlichkeit zu Rum1 in *U. maydis* aufweisen (Abb. 9, Seite 18).

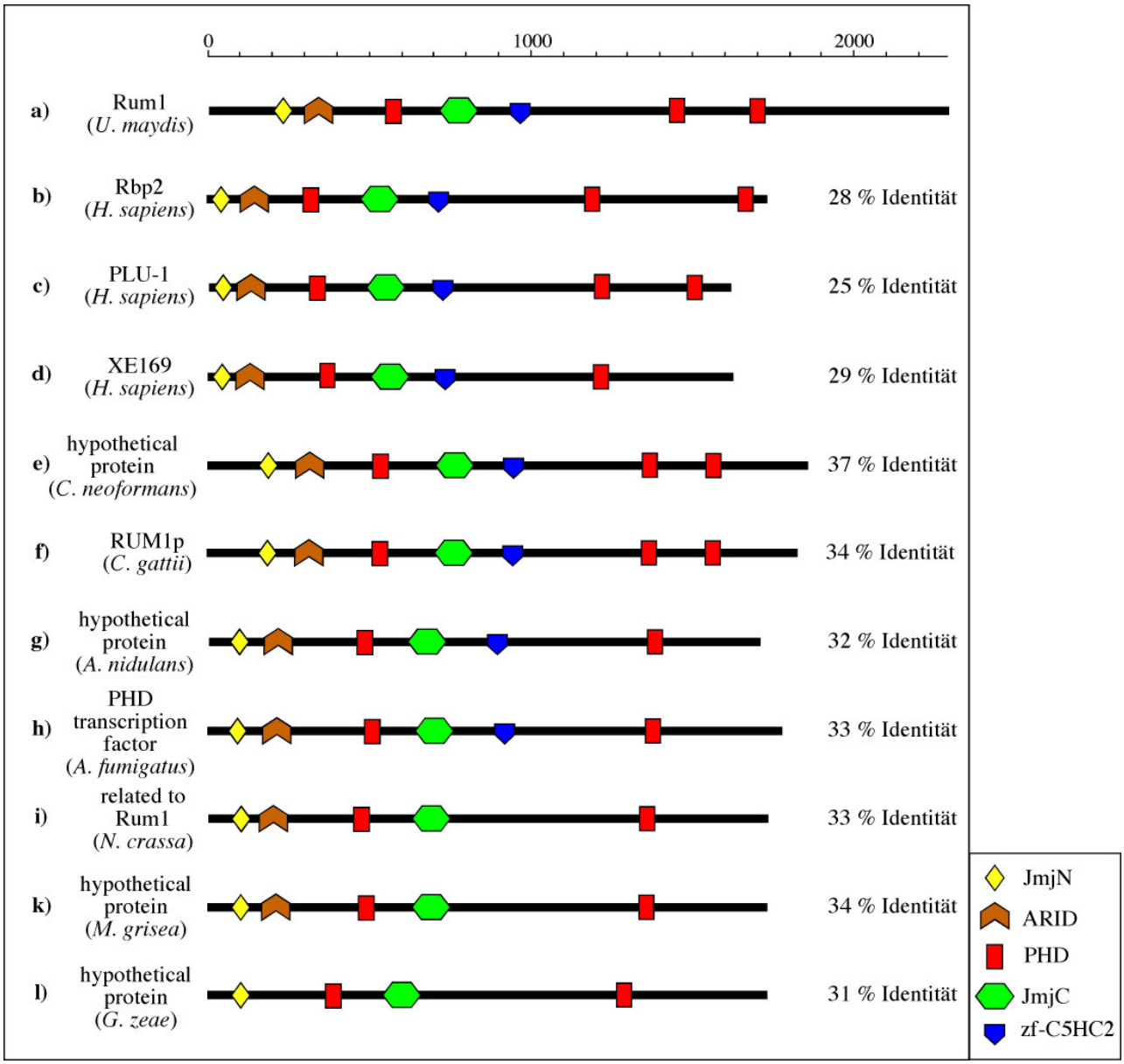

Abbildung 9: Die postulierte Domänenstruktur von Rum1 und homologen Proteinen anderer Organismen. Proteine und Domänen sind wie folgt dargestellt: Proteinrückgrat: schwarz; JmjN-Domäne: gelb; ARID-Domäne: braun; PHD-Domänen: rot; JmjC-Domäne: grün; Zinkfinger des zf-C5HC2-Typs: blau. Der Zahlenstrahl ermöglicht eine Abschätzung der jeweiligen Proteingröße in Aminosäuren (AS). **a) Rum1**, 2.289 AS, *Ustilago maydis*, Accession: AAG02418. **b) RBP2**, 1.722 AS, *Homo sapiens*, Accession: AAB28544. **c) PLU-1**, 1.544 AS, *H. sapiens*, Accession: NP_006609. **d) XE169**, 1.560 AS, *H. sapiens*, Accession: CAI39836. **e) hypothetical protein Rum1**, 1.863 AS, *Cryptococcus neoformans*, Accession: AAN75611. **f) RUM1p**, 1.847 AS, *Cryptococcus gattii*, Accession: AAV28756. **g) hypothetical protein**, 1.717 AS, *Aspergillus nidulans*, Accession: XP_681480. **h) PHD transcription factor**, 1.748 AS, *Aspergillus fumigatus*, Accession: EAL85962. **i) related to Rum1**, 1.736 AS, *Neurospora crassa*, Accession: CAC28652. **k) hypothetical protein**, 1.755 AS, *Magnaporthe grisea*, Accession: XP_359899. **l) hypothetical protein**, 1.656 AS, *Giberella zeae*, Accession: EAA74350. (Stand 7/2006)

2.2 Untersuchungen zur Funktion postulierter Domänen in Rum1

2.2.1 Konstruktion von Domänendeletionsmutanten

Untersuchungen zur Funktion verschiedener Domänen in Rum1 setzen die Verfügbarkeit von Domänendeletionsstämmen voraus. Zu diesem Zweck wurden *U. maydis*-Stämme generiert, in deren Rum1-Protein eine oder mehrere der postulierten Domänen ganz oder teilweise fehlen. Position und Ausdehnung der Domänen bzw. der Kernlokalisationssequenz wurden mit Hilfe der Domänensuchprogramme INTERPRO, SMART, PFAM und PredictNLS bestimmt. Die Deletionen wurden so gewählt, dass die komplette oder zumindest ein Großteil der Domäne aus *rum1* entfernt wurde, ohne eine Verschiebung des Leserahmens hervorzurufen. Tabelle 1 fasst die entsprechenden Deletionen zusammen.

Tabelle 1: Übersicht über Ausdehnung, Lokalisation und Deletionsumfang bzw. Mutationslokalisation der postulierten Domänen in Rum1

Domänenumfang und -lokalisation	Domänenbezeichnung	Deletionsumfang bzw. Mutationslokalisation
AS: 223-268	JmjN-Domäne	-
AS: 294-387	ARID-Domäne	AS: 299-352
AS: 541-587	PHD-Domäne (PHD1)	AS: 538-589
AS: 704-870	JmjC-Domäne	AS: 709-836
AS: 941-994	zf-C5HC2	-
AS:1069-1085	NLS	-
AS: 1424-1475	PHD-Domäne (PHD2)	AS 1443: Austausch von Cystein gegen Serin
AS: 1671-1716	PHD-Domäne (PHD3)	AS: 1668-1694

Dreidimensionale Domänenstrukturen sowie Deletionen und/oder Mutationen in Domänen anderer Proteine geben Hinweise darauf, welche Bereiche für die Funktionalität der entsprechenden Domänen essentiell zu sein scheinen:

ARID-Domänen verschiedener Proteine weisen unterschiedliche dreidimensionale Strukturen auf (Iwahara *et al*., 1999), doch deuten alle bisherigen Studien darauf hin, dass ein Kontakt sowohl mit der großen als auch mit der kleinen Furche der DNA durch Aminosäuren in Schleife (Loop) 2 und/oder Helix 5 hergestellt wird (Patsialou *et al*., 2005). Bei den bisher durch NMR (Kernresonanzspektroskopie) identifizierten Domänenstrukturen befindet sich Schleife 2 zwischen der vierten und fünften invarianten Aminosäure und Helix 5 erstreckt sich von Schleife 2 bis wenige Aminosäuren nach der fünften invarianten Aminosäure. Funktionsanalysen des humanen ARID-Domänen-Proteins p270 zeigten, dass bereits eine Deletion der ersten 23 Aminosäuren der ARID-Domäne, was etwa dem ersten Viertel der Domäne entspricht, ausreicht, um die DNA-Bindung

vollständig zu unterbinden. Der Austausch jeweils der vierten und fünften invarianten Aminosäure innerhalb der ARID-Sequenz führte zu einer verringerten DNA-Bindekapazität der Domäne (Dallas *et al*., 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die DNA-Bindekapazität in p270 von der Präsenz des vollständigen ARID-Konsensus abhängig ist.

Die mit *U. maydis* generierten *rum1*ΔARID-Stämme weisen eine Deletion auf, welche etwa die erste Hälfte der vorhergesagten ARID-Domäne umfasst (Abb. 10a, Seite 21). In diesem Bereich befinden sich vier der fünf invarianten Aminosäuren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der gewählte Deletionsumfang ausreicht, um einen Funktionsverlust der Domäne zu bewirken.

Die dreidimensionale Struktur der PHD-Domäne, bedingt durch die Bindung zweier Zinkatome, ist essentiell für die Funktion der Domäne (Bottomley, 2005). Mutationen der zinkbindenden Aminosäuren C1, C2 und H (Bindung des erstes Zinkatoms) sowie C4 und C6 (Bindung des zweites Zinkatoms) führen zum Funktionsverlust des Transkriptions-Korepressors KAP-1 (Capili *et al*., 2001).

Bei *U. maydis*-Stämmen die der Untersuchung der PHD-Domänen dienten liegen folgende Modifikationen vor: Die PHD1-Domäne in Rum1 wurde komplett deletiert (Abb. 10b, Seite 21) und der deletierte Bereich der dritten PHD-Domäne schließt vier der sieben Aminosäuren mit ein, die für eine Bindung der Zinkatome benötigt werden (Abb. 10d, Seite 21). Bei der PHD2-Domäne von Rum1 liegt ein Austausch des dritten konservierten Cysteins (AS 1443) gegen ein Serin vor (Abb. 10c, Seite 21). Geht man davon aus, dass dieses Cystein für eine Zinkatom-Bindung notwendig ist, sollte diese Mutation einen Funktionsverlust der Domäne bewirken. Einen Hinweis darauf liefert die Beobachtung, dass es bei einer Mutation des dritten konservierten Cysteins in AIRE1-PHD1 (erste PHD-Domäne im Autoimmune Regulator Protein 1) zum Ausbruch der Krankheit "autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy" (APECED) kommt (Bottomley *et al*., 2005).

JmjC-Domänen der JHDM-Gruppe bilden, durch die mit den Kofaktoren Fe(II) und αKG interagierenden acht β-Stränge, das für die Histondemethylaseaktivität verantwortliche aktive Zentrum (Chen *et al*., 2006; Dann *et al.*, 2002; Elkins *et al*., 2003; Klose *et al*., 2006a; Lee *et al*., 2003). Konservierte Reste innerhalb der Fe(II)- und αKG-Bindestelle sind essentiell für die enzymatische Aktivität der JmjC-Domäne (Klose *et al*., 2006a). Ein Beispiel dafür ist die Mutation eines für die Fe(II)-Bindung benötigten, hoch konservierten Histidins in JHDM1 (H305A) von *S. cerevisiae* und JHDM1A (H212A) des Menschen, die zum Verlust der Demethylaseaktivität dieser Proteine führt (Tsukada *et al*., 2006). In JmjC-Domänenproteinen, die keine Histondemethylase-Aktivität aufweisen, scheinen konservierte Aminosäuren ebenfalls eine wichtige Rolle für die Funktionalität der Domäne zu spielen. In EPE1 aus *S. pombe* bewirkt die Mutation eines hoch konservierten Tyrosins (Y307A) einen Funktionsverlust des Proteins, der sich durch eine Destabilisierung der Zentromere

und der Paarungstyp-Loci manifestiert. Intressanterweise wird dieser Phänotyp von einer Modifikation des Methylierungsmusters von H3K4 begleitet (Ayoub *et al.*, 2003), obwohl EPE1 selber keine Histondemethylase-Aktivität aufweist (Tsukada *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Deletion der JmjC-Domäne in Rum1 umfasst einen Bereich, in dem vier der fünf hoch konservierten Aminosäuren liegen, die für eine Bindung von Fe(II) und αKG benötigt werden. In diesem Bereich liegt ausserdem das entsprechende, hoch konservierte Tyrosin, dessen Mutation zu einem Funktionsverlust von EPE1 führt.

a)

adaRASQNYQEQLQKFHAQQGRKRVSVPVIDGRSVDLYQLKLVISSLGGYDAVCRARKWS
DATRKIGYSDKESGQLSTQVKAAYTRIILPFEEFLAKake

b)

qaqeeqMCEICLRGEDGPNMLLCDECNRGYHMYCLQPALTSIPKSQWFCPPCLvgtgh

c)

rNCICRSSMPIAIPSSSGAECSRCRVQYHLSCIKVRSSEVSRAEGGWVCPFCPw

d)

yrdrqpiYCLCHEPESGRMIACDKCMLWFHTNCVRLDDPPNLGNEPWICPMCCi

e)

sLYSRDKWNLNNLPILPGSLLQYIKSDISGMTVPWIYVGMIFSTFCWHNEDHYTYSINYQH
WGETKTWYGIPGEDAEKFENAMRKAAPDLFETLPDLLFHLTTMMSPEKLKKEGVRVVAC
DQRANEFVVTFPKAYHSGFNHGLNLNEAVNFALPDWIFDDLESVRRYQr

f)

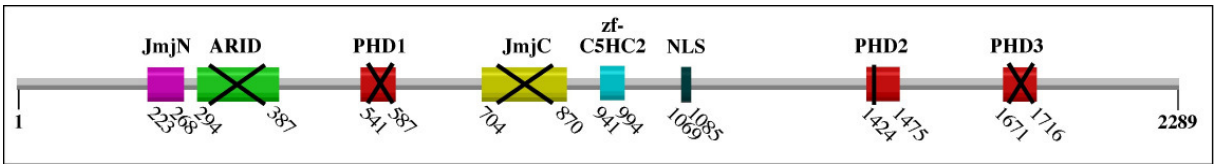

Abbildung 10: Aminosäuresequenzen der deletierten Domänen in Rum1. Domänen sind in großen Buchstaben dargestellt, deletierte Bereiche sind grau unterlegt. **a) Aminosäuresequenz der ARID-Domäne:** AS 294-387. Die fünf invarianten Aminosäuren der ARID-Domäne (Patsialou *et al.*, 2005) sind rot dargestellt und gelb unterlegt. **b) Aminosäuresequenz der PHD1-Domäne:** AS 541-587. In rot dargestellt und gelb unterlegt ist das C4HC3-Motiv der PHD-Domäne. **c) Aminosäuresequenz der PHD2-Domäne:** AS 1.424-1.475. In rot dargestellt und gelb unterlegt ist das C4HC3-Motiv der PHD-Domäne. Das in *rum1*mut.PHD2-Stämmen zu Serin mutierte Cystein ist blau unterlegt. **d) Aminosäuresequenz der PHD3-Domäne:** AS 1.671-1.716. In rot dargestellt und gelb unterlegt ist das C4HC3-Motiv der PHD-Domäne. **e) Aminosäuresequenz der JmjC-Domäne:** AS 704-870. Invariante Aminosäuren in JmjC-Domänen Rum1-ähnlicher Proteine (JARID1-Gruppe) sind rot dargestellt (Klose *et al.*, 2006a). Konservierte Aminosäuren, die eine Bindung von Fe(II) vermitteln, sind gelb, solche, die für eine αKG-Bindung benötigt werden, blau unterlegt. **f) Schematische Darstellung der in Domänendeletionsstämmen vorliegenden Deletionen bzw. -mutationen in Rum1.** Deletierte Domänen sind durch schwarze Kreuze gekennzeichnet, die Mutation durch einen senkrechten, schwarzen Strich. JmjN-Domäne (rosa); ARID-Domäne (grün); PHD1-, PHD2- und PHD3-Domäne (rot); JmjC-Domäne (gelb); Zinkfinger des zf-C5HC2-Typs (blau); NLS (dunkelgrün).

Um Einflüsse eventuell vorhandener, unbekannter Aktivierungssequenzen und eine veränderte Expressionsregulation durch Chromatinstrukturveränderungen an anderer genomischer Stelle zu vermeiden, wurde eine homologe Integration in den Ursprungs-Locus von *rum1* gewählt. Zu diesem Zweck wurden Plasmide konstruiert, die ein 8.926 bp großes Fragment enthalten, auf dem der komplette offene Leserahmen (ORF) von *rum1* lokalisiert ist. Ein 1.881 bp umfassender genomischer 5´-Bereich diente als Rekombinationsflanke. Im 3´-Bereich folgte eine Phleomycin-Kassette sowie ein 2.175 bp großer, ebenfalls als Rekombinationsflanke dienender, genomischer Bereich (vergleiche Kapitel 4). Die verschiedenen Integrationsplasmide besitzen den kompletten, unveränderten ORF von *rum1* oder weisen eine Deletion und/oder Mutation jeweils einer oder mehrerer in Rum1 postulierter Domänen auf.

Mit den linearisierten Integrationsplasmiden wurden Stämme von *U. maydis* (FB1Δ*rum1*, QSΔ*rum1*) transformiert, bei denen nahezu der komplette ORF von *rum1* durch eine Hygromycin-Kassette ersetzt ist (Quadbeck-Seeger *et al*., 2000). Eine homologe Rekombination der Konstrukte am Ursprungs-Locus von *rum1* führte somit zum Austausch der Resistenzkassetten. Klone, bei denen eine korrekte Integration vorlag, waren Hygromycin-sensitiv und resistent gegenüber Phleomycin. Stämme mit dem genetischen Hintergrund *a1 b1*, bei denen alle PHD-Domänen in Rum1 deletiert bzw. mutiert waren, wurden durch Segregationsanalysen identifiziert. Anhand von Southern-Analysen wurde die korrekte Integration der Konstrukte (Daten nicht gezeigt) und durch Northern-Analysen die Expression der verkürzten *rum1*-Transkripte nachgewiesen (Abb. 11).

Die als richtig verifizierten Transformanten und Segreganten wurden wie folgt bezeichnet:

- FB1*rum1*ΔARID
- QS*rum1*ΔARID
- FB1*rum1*ΔJmjC
- QS*rum1*ΔJmjC
- FB1*rum1*ΔPHD1
- QS*rum1*ΔPHD1
- FB1*rum1*mut.PHD2
- QS*rum1*mut.PHD2
- FB1*rum1*ΔPHD3
- QS*rum1*ΔPHD3
- MT*rum1*ΔPHD1mut.PHD2ΔPHD3
- QS*rum1*ΔPHD1mut.PHD2ΔPHD3
- FB1Δ*rum1*+*rum1*
- QSΔ*rum1*+*rum1*

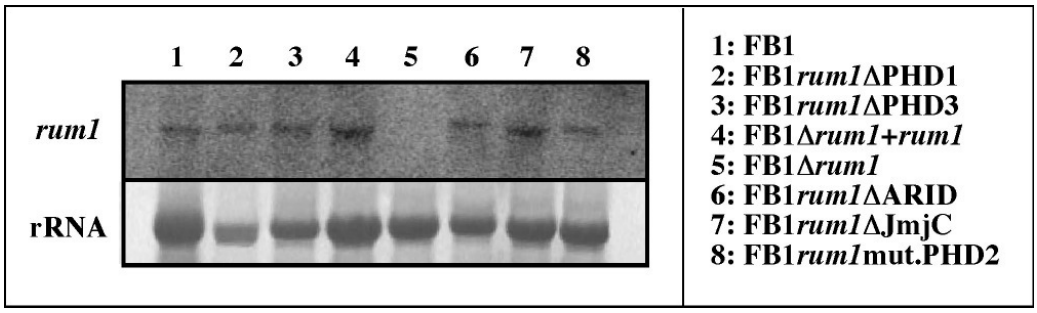

Abbildung 11: Northern-Analysen von Domänendeletionsstämmen. *U. maydis*-Kulturen wurden in CM-Flüssigmedium bis zu einer $OD_{600} \approx 0{,}5$ inkubiert. RNA wurde isoliert, über ein Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einer radioaktiven, *rum1*-spezifischen Sonde hybridisiert. Aufgetragen wurden jeweils 15 µg RNA. Als Ladekontrolle diente eine Methylenblaufärbung der rRNA. Northern-Analysen wurden bei Domänendeletionsstämmen mit den genetischen Hintergründen FB1 und QS durchgeführt. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse der Stämme mit FB1-Hintergrund.

2.2.2 Funktionalitätstests der Domänendeletionsstämme

egl1 ist ein durch das b-Heterodimer indirekt reguliertes Gen, das für die Endoglukanase Eg1 kodiert, deren Expression auf die biotrophe Lebensphase von *U. maydis* beschränkt ist (Schauwecker *et al*., 1995). Die Expression von *egl1* wird in der haploiden Phase des Pilzes durch Rum1 reprimiert. Die Funktionalität von Rum1 in Domänendeletionsstämmen kann folglich mittels eines CMC-Tests überprüft werden, bei dem die Sekretion von Endoglukanase nachgewiesen wird (siehe Kapitel 1 und 4). Im Gegensatz zu den Mutanten, *rum1*mut.PHD2, *rum1*ΔPHD1mut.PHD2ΔPHD3 und *rum1*ΔJmjC sekretierten Stämme, bei denen die ARID-Domäne bzw. die PHD3-Domäne in Rum1 fehlt, nur wenig Endoglukanase (durch die Ausbildung eines Halo im CMC-Test detektierbar). Stämme mit einer PHD1-Domänendeletion zeigten keine Endoglukanasesekretion (Abb. 12, Seite 24).

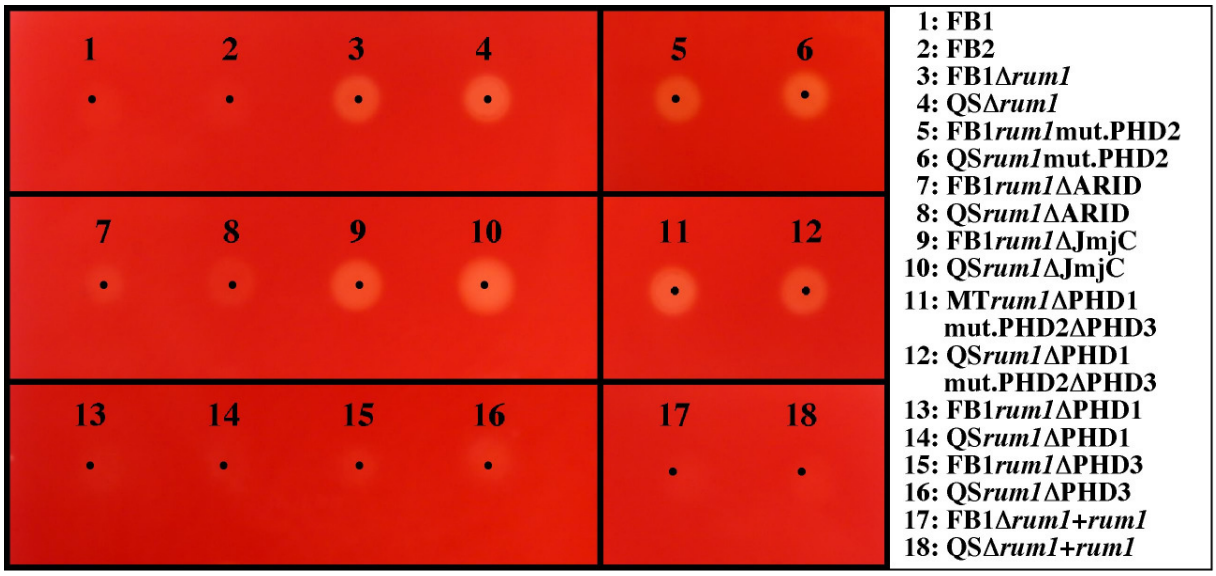

Abbildung 12: Test der Rum1-Domänendeletionsstämme auf Endoglukanasesekretion (CMC-Test). Jeweils 3 µl Übernachtkultur wurde auf CMC-haltige Agarplatten getropft und für 20 Stunden bei 28 °C inkubiert. Stellen, an denen eine Endoglukanase-sekretierende Pilzkolonie wuchs, sind als entfärbte Bereiche zu erkennen. Die Wildtypstämme FB1 und FB2 wurden als Negativkontrolle verwendet, während die Stämme FB1Δ*rum1* und QSΔ*rum1* als Positivkontrolle der Endoglukanasesekretion dienten.

Der CMC-Test liefert, je nach Wachstumsdauer und Kulturbedingungen, oft unzureichend interpretierbare Ergebnisse und erlaubt keine quantitative Abschätzung der Expression. Die Expression von *egl1* sowie anderen durch Rum1 regulierten Genen (*dik1*, *b*, *lga2*, *rep1*, *frb52*, *hum2*) wurde in Northern-Analysen untersucht (Abb. 13, Seite 25). Die Analysen zeigten, dass, vergleichbar mit der Deletion des *rum1*-ORFs, eine Deletion der JmjC-Domäne zu einer starken Expression von *egl1* in Sporidien führte. Keine andere Modifikation des Rum1-Proteins induzierte eine vergleichbar starke *egl1*-Transkription in den betroffenen Zellen. Lediglich bei FB1*rum1*mut.PHD2 konnte eine verschwindend geringe *egl1*-Transkription detektiert werden. Ähnlich verhielt es sich bei der Expression anderer Rum1-regulierter Gene. *U. maydis*-Stämme, bei denen die JmjC-Domäne deletiert ist, zeigten eine Expression aller bekannten, durch Rum1 reprimierten Gene. Dabei war die Expressionsstärke vergleichbar mit der durch eine Deletion des *rum1*-ORFs hervorgerufenen. Bei den Stämmen FB1*rum1*mut.PHD2 und FB1*rum1*ΔPHD3 konnten lediglich Transkripte für die Gene *rep1*, *b* und *lga2* nachgewiesen werden. Die Transkriptmengen sind jedoch deutlich geringer als bei Rum1-defizienten und JmjC-Domänendeletionsstämmen. Alle weiteren Stämme verhielten sich hinsichtlich der Transkription bekannter Rum1-regulierter Gene wie Wildtypstämme.

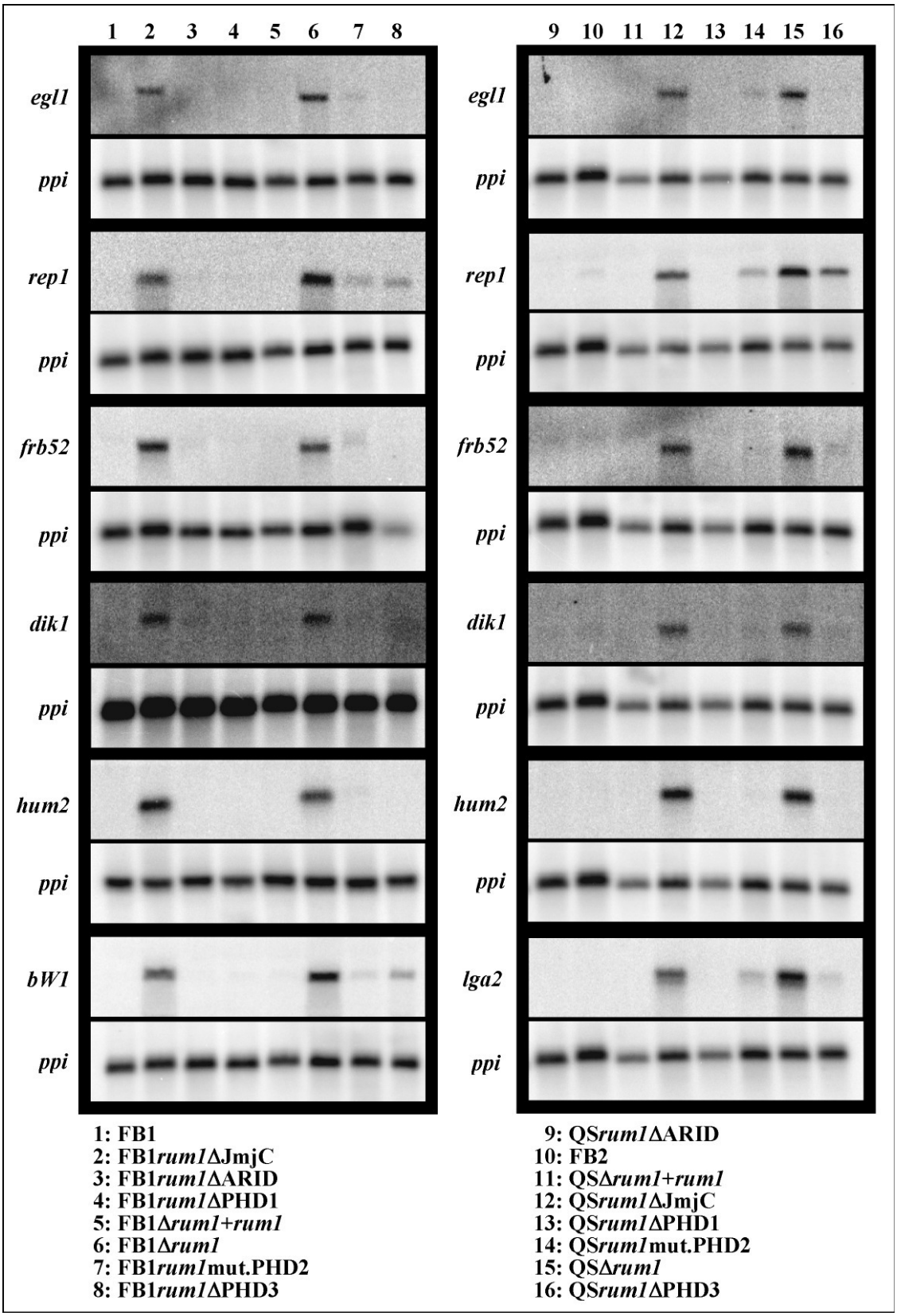

Abbildung 13: Expressionsanalyse Rum1-regulierter Gene in Domänendeletionsstämmen. *U. maydis*-Kulturen wurden in CM-Flüssigmedium bis zu einer $OD_{600} \approx 0{,}5$ inkubiert. RNA wurde isoliert, über ein Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit radioaktiven Sonden hybridisiert. Aufgetragen wurden jeweils 15 µg RNA. Zur semiquantitativen Abschätzung der aufgetragenen RNA-Menge wurde die Nitrozellulose-Membran zusätzlich mit einer spezifischen Sonde für das endogene, konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen hybridisiert.

Die Funktionalität des Rum1-Proteins in Domänendeletionsstämmen wurde anhand von Infektionsversuchen getestet. Tumorausstriche zeigten, dass bei allen Stämmen mit Ausnahme derer, die eine Deletion der JmjC-Domäne aufweisen, reifes, keimungsfähiges Sporenmaterial gebildet wurde (Phänotyp von *rum1*-Deletionsstämmen, siehe Kapitel 1.4.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Deletion der JmjC-Domäne zu einem Funktionsverlust des Rum1-Proteins führt, was sich unter anderem in der Unfähigkeit reifes Sporenmaterial zu bilden manifestiert. Im Gegensatz dazu liegt bei allen anderen Domänen-Modifikationen zumindest eine Restaktivität des Rum1-Proteins vor, die dem Pilz eine ungestörte Sporogenese ermöglicht.

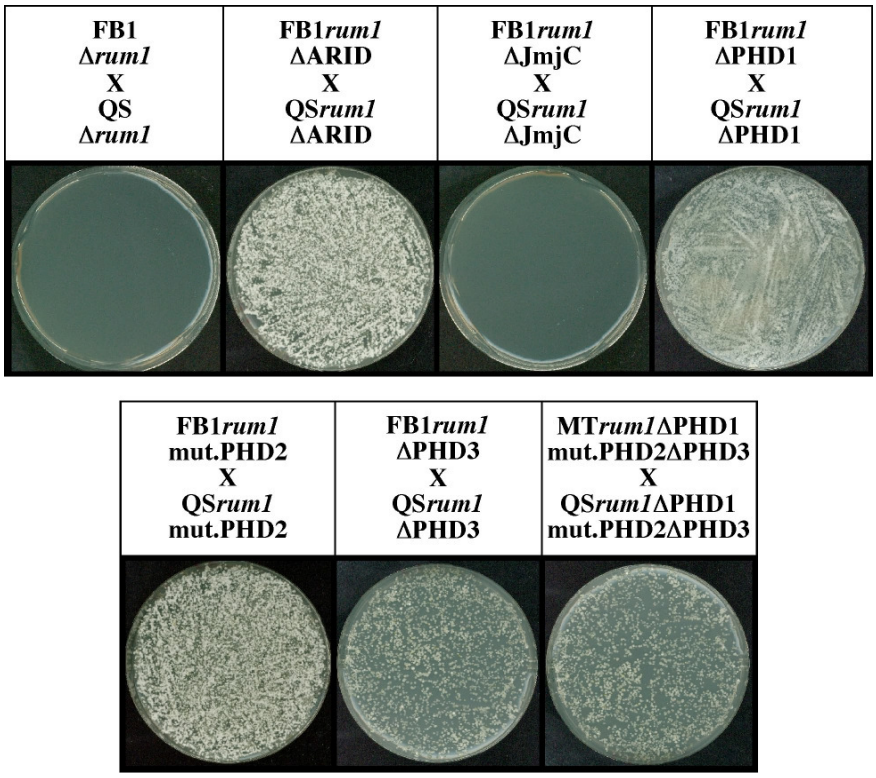

Abbildung 14: Ausstriche getrockneter, mit Kupfersulfat behandelter Tumore der Domänendeletionsstämme. Tumore vier Wochen alter, mit Domänendeletionsstämmen infizierter Maispflanzen wurden auf Vollmedienplatten ausgestrichen und fünf Tage lang bei 28 °C kultiviert. Als Kontrolle diente durch *rum1*-Deletionsstämme induziertes Tumormaterial. Nach fünftägiger Inkubationszeit konnten, mit Ausnahme von JmjC-Domänendeletionsstämmen, bei allen Stämmen Sporidienkolonien, als Resultat gekeimter Sporen, detektiert werden. Tumore, die durch eine Infektion mit JmjC-Deletionsstämmen entstanden, enthielten kein reifes, keimungsfähiges Sporenmaterial.

2.3 Transkriptomanalyse mittels DNA-Microarrays

rum1- und *hda1*-Deletionsstämme exprimieren b-regulierte Gene in der haploiden Lebensphase des Pilzes. Dies führte zu der Hypothese, der putative Rum1-Hda1-Komplex könnte ein Antagonist des b-Heterodimers sein, wobei die ARID-Domäne aus Rum1 mit der Homeodomäne der b-Proteine um DNA-Bindungsstellen konkurriert (Reichmann *et al.*, 2002; Quadbeck-Seeger *et al*., 2000). Eine Deacetylierung von Histonproteinen durch die in dem putativen Komplex enthaltene Hda1, könnte dabei eine Repression entsprechender Zielgene bewirken.

Bisher durchgeführte Expressionsanalysen (Reichmann, 2002) umfassten nur einen Bruchteil aller *U. mayids*-Gene. Um den Effekt der *rum1*- und *hda1*-Deletionen auf die Expression nahezu aller Gene zu analysieren, wurden Microarray-basierte Transkriptomanalysen durchgeführt, mit denen in einem Versuchsansatz die Expression von 6.242 putativen *U. maydis*-Genen detektiert werden kann. Auf den von der Firma Affymetrix hergestellten DNA-Microarrays wird jedes Gen durch 33 sequenzspezifische, 25 Basenpaare umfassende Oligonukleotide und 33 entsprechende Kontroll-Oligonukleotide mit einer Mismatch-Sequenz repräsentiert, welche in ihrer Gesamtheit eine Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung erlauben. *U. maydis*-DNA-Microarrays sind sensitiv genug, um auch schwach exprimierte Gene detektieren zu können. So konnten unter den gewählten experimentellen Bedingungen 70-80 % aller auf dem DNA-Chip befindlicher Gene als "exprimiert" erkannt werden. Um repräsentative Ergebnisse zu gewährleisten und vergleichbare Messwerte zu erhalten, wurden sämtliche Experimente unabhängig, mit mindestens jeweils zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Die biologischen Replikate spiegeln die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wider. In Abbildung 15 (Seite 28) sind exemplarisch die Datensätze jeweils zweier DNA-Microarray-Replikate gegeneinander aufgetragen. Wie erwartet, liegen fast alle Datenpaare annähernd auf der Winkelhalbierenden des Koordinatensystems.

a)

b)

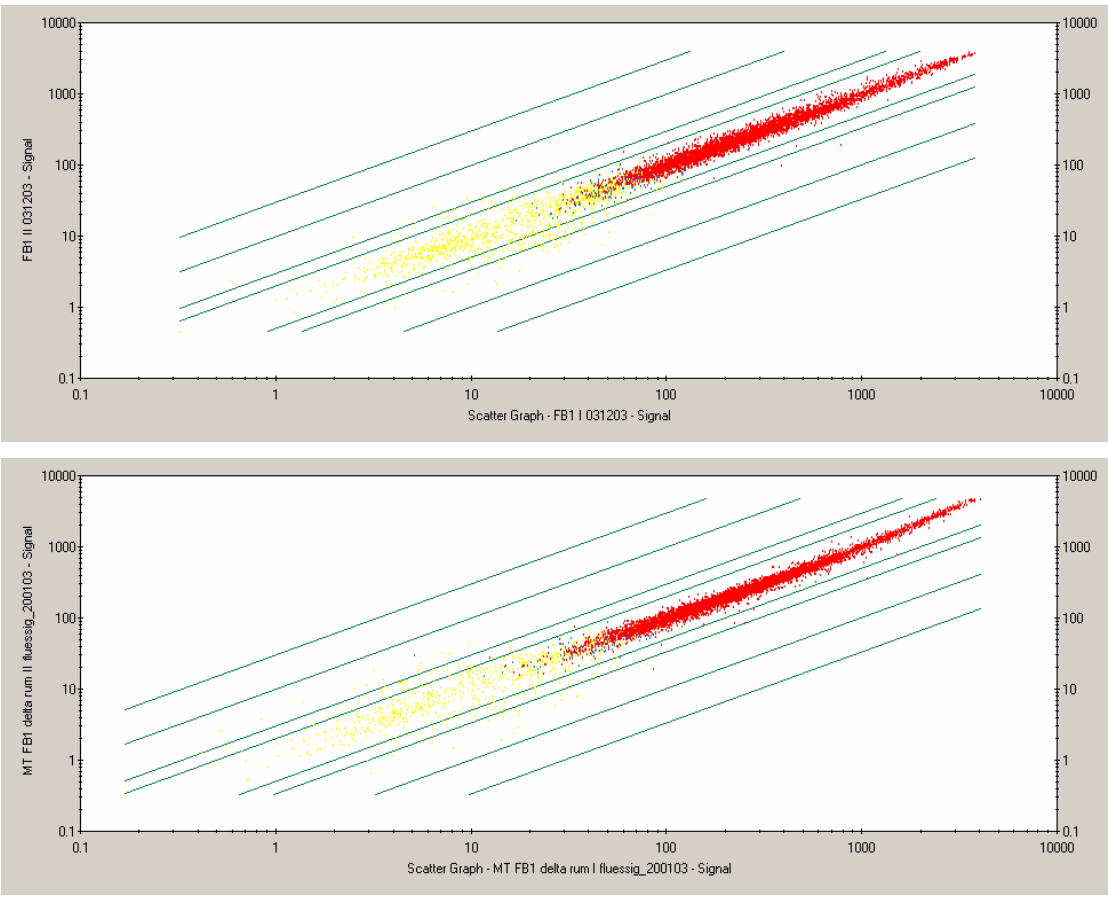

Abbildung 15: Streudiagramme biologischer Replikate: DNA-Microarray-Analysen weisen eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Dargestellt sind Streudiagramme, bei denen die Fluoreszenzintensitäten aller auf dem Chip befindlichen Oligonukleotide zweier biologischer Replikate gegeneinander aufgetragen sind. **a) Kontroll-Microarrays:** FB1 vs. FB1. **b) Experiment-Microarrays:** FB1Δ*rum1* vs. FB1Δ*rum1*. Rote Datenpunkte symbolisieren Gene, bei denen in beiden DNA-Microarrays ein statistisch signifikantes Signal detektiert wurde. Gene, bei denen nur in einem der Microarrays ein signifikantes Signal detektierbar war, sind blau dargestellt. Gelbe Datenpunkte stehen für Gene, bei denen in keinem der beiden Microarrays ein statistisch signifikantes Signal detektiert wurde. Anhand der Geraden ist eine Abschätzung der faktoriellen Expressionsdifferenz von Genen möglich, die in den DNA-Microarray-Experimenten unterschiedlich stark exprimiert wurden.

2.3.1 ARID-Domänendeletionsstämme weisen eine verschwindend geringe Anzahl deregulierter Gene auf

Unter Verwendung der *U. maydis*-spezifischen DNA-Microarrays wurden Transkriptionsprofile der Stämme FB1Δ*rum1,* FB1Δ*hda1* und FB1*rum1*ΔARID erstellt. Um jene Gene zu identifizieren, welche eine Deregulation aufweisen, wurden die Transkriptome der Deletionsstämme mit dem des Wildtypstammes FB1 verglichen. Mit dem Programm dChip (Li und Hung Wong, 2001) wurden Gene extrahiert, deren Expression in den Deletionsstämmen im Vergleich zu FB1 mindestens zweifach induziert oder reprimiert war. Bei der Berechnung der faktoriellen Expressionsänderung wurde, durch die Vorgabe eines Vertrauensintervalls ("lower confidence bound of fold change"), unter anderem der Standardfehler der Expressionswerte mit einbezogen (Li und Hung Wong, 2001).

Ein Vergleich deregulierter Gene von FB1Δ*rum1* und FB1*rum1*ΔARID sollte zeigen, ob die Deletion der ARID-Domäne sich auf transkriptioneller Ebene niederschlägt, nicht aber einen sichtbaren Phänotyp während der Entwicklung des Pilzes hervorruft. Es stellte sich heraus, dass, im Vergleich zu FB1, in FB1*rum1*ΔARID lediglich 14 Gene mehr als zweifach dereguliert sind, wovon sich 13 auch unter den 286 deregulierten Genen des Stammes FB1Δ*rum1* befinden (Tabelle 2, Seite 30). Auffällig ist, dass die Expressionswerte der deregulierten Gene in FB1*rum1*ΔARID ausnahmslos geringer sind als in FB1Δ*rum1*. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei der Deregulation dieser 14 Gene um ein Artefakt handelt. Vergleichende Analysen vieler DNA-Microarray-Daten von Wildtypstämmen hatten gezeigt, dass vielfach Expressionsunterschiede einzelner Gene vorliegen. Die Anzahl dieser Gene ist jedoch, bezogen auf die Gesamtheit aller Gene, gering (M. Scherer, pers. Mitteilung).

Die Möglichkeit einer DNA-Bindung durch die ARID-Domäne konnte aufgrund der erhobenen Daten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Daher sollte eine bioinformatische Suche mit dem "MEME/MAST System for Motiv Discovery Search" (http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html) (Bailey und Elkan, 1994; Bailey und Gribskov, 1998) in Promotorregionen der in FB1*rum1*ΔARID induzierten Gene Aufschluss darüber geben, ob möglicherweise spezifische ARID-Bindesequenzen existieren. Für die Analyse wurde jeweils der unmittelbar vor dem Startkodon lokalisierte Bereich von etwa 1.000 bp gewählt. Zwar wurden keine bekannten Motive gefunden, die in den untersuchten Promotorsequenzen auftraten, das Ergebnis des MEME-Programms zeigte jedoch, dass in einigen der untersuchten Promotorbereiche ähnliche, jedoch bislang unbekannte Motive vorhanden sind. Zwei Motive wurden identifiziert (Tabelle 3, Seite 31), die sich unter anderem in den Promotoren der Gene um00826 und um06497 befinden (in Tabelle 2 und 3 rot dargestellt). Die divergent transkribierten Gene um00826 und um06497 liegen im Telomerbereich von Chromosom 6 unmittelbar nebeneinander, so dass eine gekoppelte Transkriptionsregulation der Gene über Chromatinmodifikation theoretisch möglich wäre.

Tabelle 2: Auflistung der in FB1*rum1*ΔARID deregulierten Gene. Spalte1: Chromosomenlokalisation. **Spalte2:** Accession-Nummer des MIPS (Stand 10/2006). **Spalte 3:** Nummer des probe sets, die eine Identifizierung der auf den DNA-Microarrays enthaltenen Gene erlaubt. **Spalte 4:** Annotation des MIPS (Stand 10/2006). **Spalte 5:** Faktorielle Expressionsänderung des jeweiligen Gens in FB1*rum1*ΔARID im Vergleich zu FB1. **Spalte 6:** Faktorielle Expressionsänderung des jeweiligen Gens in FB1Δ*rum1* im Vergleich zu FB1. Rot dargestellt sind die beiden Gene, die im Telomerbereich des Chromosoms 6 direkt nebeneinander liegen.

Chromosom	MUMDB Accession-Nummer	probe set	MUMDB Annotation	FB1 *rum1* ΔARID	FB1 Δ*rum1*
3	um01745	C25um119G_at	related to ABC transporter	2,77	5,9
4	um06266	W40um273G_at	putative protein	2,23	3,66
4	um06336	W40um198G_at	conserved hypothetical protein	3,24	4,67
5	um02215	W190um281G_at	related to dibenzothiophene desulfurizing enzyme	2,25	6,74
6	um00826	W16um206G_at	putative protein	4,76	15,57
6	um06497	C15um206G_at	putative protein	36,79	118,31
7	um02984	C60um249G_at	related to dibenzothiophene desulfurization enzyme C	2,1	4,75
7	um03122	W15um068G_s_at	related to beta-1,3-glucan binding protein	5,11	10,11
8	um03338	C107um076G_at	conserved hypothetical protein	2,48	2,82
9	um03411	UG12-12b17-77h4_RC_at	probable endo-1,4-beta-xylanase	3,41	10,04
19	um10221	W160um021G_at	conserved hypothetical protein	2,04	5,42
22	um06236	W35um241G_at	probable RIB3-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	-2,03	-2,16
22	um06185	C45um086G_at	probable acyl-CoA dehydrogenase short-branched chain precursor	-2,2	-2,05
22	um06153	C15um231G_at	related to 4-coumarate-CoA ligase 1	-2,28	-

Tabelle 3: Verteilung und Anzahl der Motive 1 und 2 in Promotorsequenzen der im Vergleich zu FB1 induzierten Gene des Stammes FB1*rum1*ΔARID. Spalte 1: Accession-Nummern des MIPS von Genen, in deren Promotorsequenz das entsprechende Motiv identifiziert wurde. Gene, die direkt benachbart liegen, sind rot dargestellt. **Spalte 2:** Anzahl der Motive in den Promotorbereichen der entsprechenden Gene.

Konsensussequenz Motiv 1: **TTGCAGGAAGACGGGGAGAGGGTGGAAGGAAAGATGCA**	
Gene in deren Promotorbereich Motiv 1 identifiziert wurde	Anzahl des Motivs
um00826	1
um06497	1
um06266	1
um06336	1
um03122	1

Konsensussequenz Motiv 2: **CAGCTTCACGA**	
Gene in deren Promotorbereich Motiv 2 identifiziert wurde	Anzahl des Motivs
um06336	1
um02215	1
um02984	1
um06266	1
um00826	1
um06497	2
um03122	2
um03411	2
um03338	3

2.3.2 *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämme weisen ein überlappendes Set deregulierter Gene auf

Zwei nacheinander durchgeführte Vergleiche dienten der Identifizierung von Genen, die in *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen in gleicher Weise dereguliert sind. Im ersten Schritt wurden die Transkriptome der Deletionsmutanten mit denen der Wildtypstämme verglichen. Dabei wurden Gene identifiziert, die mindestens eine zweifache Expressionsänderung aufwiesen. Bei dem darauf folgenden Vergleich wurden die so identifizierten Gene beider Mutanten miteinander verglichen, um darstellen zu können, bei welchem Anteil eine konvergente bzw. divergente Deregulation vorliegt. Insgesamt konnten bei FB1Δ*rum1* 286 und bei FB1Δ*hda1* 486 deregulierte Gene identifiziert werden, wobei alle in Northern-Experimenten nachweislich induzierten Gene wiedergefunden wurden. Die Anzahl induzierter Gene bei beiden Deletionsstämmen ist verhältnismäßig hoch, was für die Repressoraktivität von Rum1 und Hda1 spricht.

Die Analyse zeigte eine starke Überlappung der Datensätze. FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1* wiesen einen hohen Anteil koregulierter Gene auf: 165 Gene konnten in beiden Stämmen als konvergent

dereguliert identifiziert werden. Das entspricht etwa 58 % (165 von 286) aller in FB1Δ*rum1* deregulierten Gene. Auffällig ist die starke Überlappung induzierter Gene beider Stämme. So weisen fast 62 % (161 von 260) aller induzierten Gene in FB1Δ*rum1* eine Koregulation in FB1Δ*hda1* auf. Lediglich ein divergent reguliertes Gen konnte bei dem Vergleich der Stämme FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1* identifiziert werden. Dabei handelt es sich um das Gen für Cytochrom C1, das, im Vergleich zu FB1, bei FB1Δ*rum1* 3,10fach reprimiert und bei FB1Δ*hda1* 3,13fach induziert ist. Über eine Suche in der MUMDB des MIPS (http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago) konnten 73 der in FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1* koregulierten Gene eine potentielle Funktion zugeordnet werden. Eine Blastsuche ergab weiterhin, dass zu 46 der in beiden Stämmen koregulierten Gene Hefehomologe existieren, die einen E-Value von höchstens $1e^{-8}$ aufwiesen (siehe Kapitel 6, Tabelle 3).

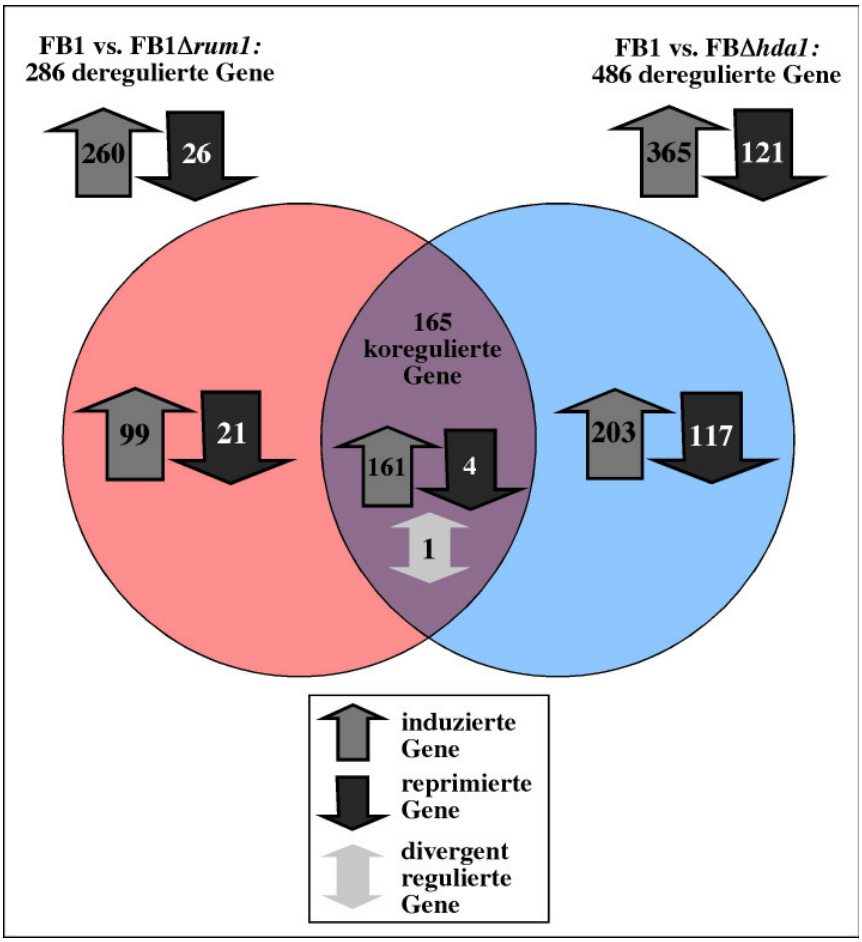

Abbildung 16: Vergleichende Transkriptom-Analyse der *rum1*- und *hda1*-Deletionsmutanten. Das Mengendiagramm zeigt die Anzahl der, im Vergleich zum Wildtypstamm FB1, deregulierten Gene für den jeweiligen Deletionsstamm. Hellgraue Pfeile kennzeichnen induzierte und dunkelgraue Pfeile reprimierte Gene. Der Doppelpfeil steht für Gene, die in beiden Deletionsstämmen divergent reguliert sind.

Eine Klassifizierung der im Vergleich zu FB1 differenziell exprimierten Gene der Deletionsstämme (FunCatDB, http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago) zeigte keine signifikante Anreicherung distinkter funktioneller Kategorien. Zwar konnten 21 % der in *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen koregulierten Gene der funktionellen Kategorie "Metabolismus" zugeordnet werden, doch liegen bei nicht koregulierten Genen beider Stämme ähnliche Prozentzahlen vor. Ebenso verhält es sich mit Genen, die in andere funktionelle Kategorien eingeordnet werden konnten.

2.3.3 *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämme weisen nur eine geringe Anzahl deregulierter Gene auf, die durch das b-Heterodimer reguliert werden

In vorangegangenen Arbeiten konnten durch umfangreiche Expressionsstudien eine Reihe b-regulierter Gene identifiziert werden, die in haploiden Sporidien von *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen exprimiert werden (Reichmann *et al.*, 2002; Quadbeck-Seeger *et al*., 2000; Reichmann, 2002). Da diese Gene normalerweise ausschließlich unter Einfluss eines aktiven b-Heterodimers exprimiert werden, wurde postuliert, der putative Rum1-Hda1-Komplex könnte ein Antagonist des b-Heterodimers sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Vergleiche mit den bereits als b-reguliert identifizierten Genen durchgeführt. Die dafür benötigten Daten wurden ebenfalls mit der DNA-Microarray-Technologie von Affymetrix erhoben (M. Scherer, pers. Mitteilung). Unter Verwendung von Stämmen, bei denen die medienabhängige Induktion eines aktiven b-Heterodimers möglich ist [AB31 (a2 Pcrg:bW2,bE1) und AB33 (a2 Pnar:bW2,bE1)], konnte eine Liste b-regulierter Gene erstellt werden. Als Vergleichsstämme dienten AB32 (a2 Pcrg:bW2,bE2) sowie AB34 (a2 Pnar:bW2,bE2), die nicht in der Lage sind, ein aktives Heterodimer zu bilden (Brachmann, 1995). Die b-Induktion wurde über einen Zeitraum von 12 Stunden gemessen, da in diesem zeitlichen Rahmen die morphologische Transition von hefeartigem zu filamentösem Wachstum erfolgt (M. Scherer, pers. Mitteilung).

Der Vergleich deregulierter Gene in den Stämmen FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1* mit der Liste b-regulierter Gene zeigte eine nur geringe Überlappung der entsprechenden Datensätze. Von den in FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1* deregulierten Genen befanden sich nur 14 % (41 von 286) bzw. 9 % (45 von 486) unter den durch das b-Heterodimer regulierten Genen. Die Vermutung der putative Rum1-Hda1-Komplex könnte in Bezug auf Repression und Induktion seiner Zielgene als Antagonist des b-Heterodimers fungieren, konnte somit nicht bestätigt werden.

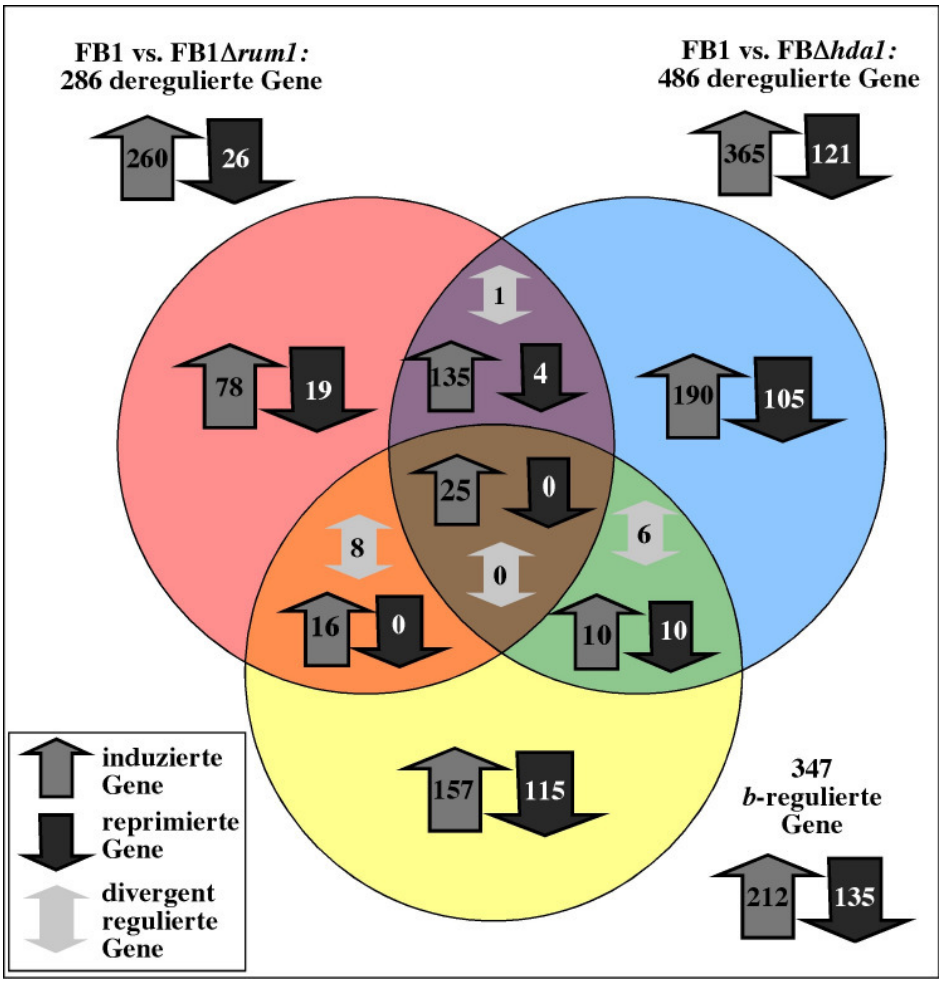

Abbildung 17: Vergleich der deregulierten Gene in FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1* mit den als b-reguliert bekannten Genen. Im Mengendiagramm ist die Anzahl der Gene angegeben, die in den Stämmen FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1* im Vergleich zum Ausgangsstamm FB1 differenziell exprimiert wurden sowie die durch b regulierten Genanzahlen. Hellgraue Pfeile kennzeichnen induzierte und dunkelgraue Pfeile reprimierte Gene. Doppelpfeile stehen für Gene, die in beiden Deletionsstämmen divergent reguliert sind.

2.3.4 Transkriptionelle Regulation von Genclustern durch Rum1 und/oder Hda1

Die in *rum1*- und/oder *hda1*-defizienten Stämmen deregulierten Gene sind nicht gleichmäßig über das Genom verteilt, sondern liegen vielfach nahe bei- oder direkt nebeneinander. Einige dieser Gencluster werden sowohl durch Rum1 als auch Hda1 reguliert. Dies verdeutlicht Abbildung 18 (Seite 35), in der die chromosomale Verteilung und Lokalisation der entsprechenden Gene schematisch dargestellt ist. Rote Rechtecke symbolisieren durch Rum1 und blaue Rechtecke durch Hda1 regulierte Gene.

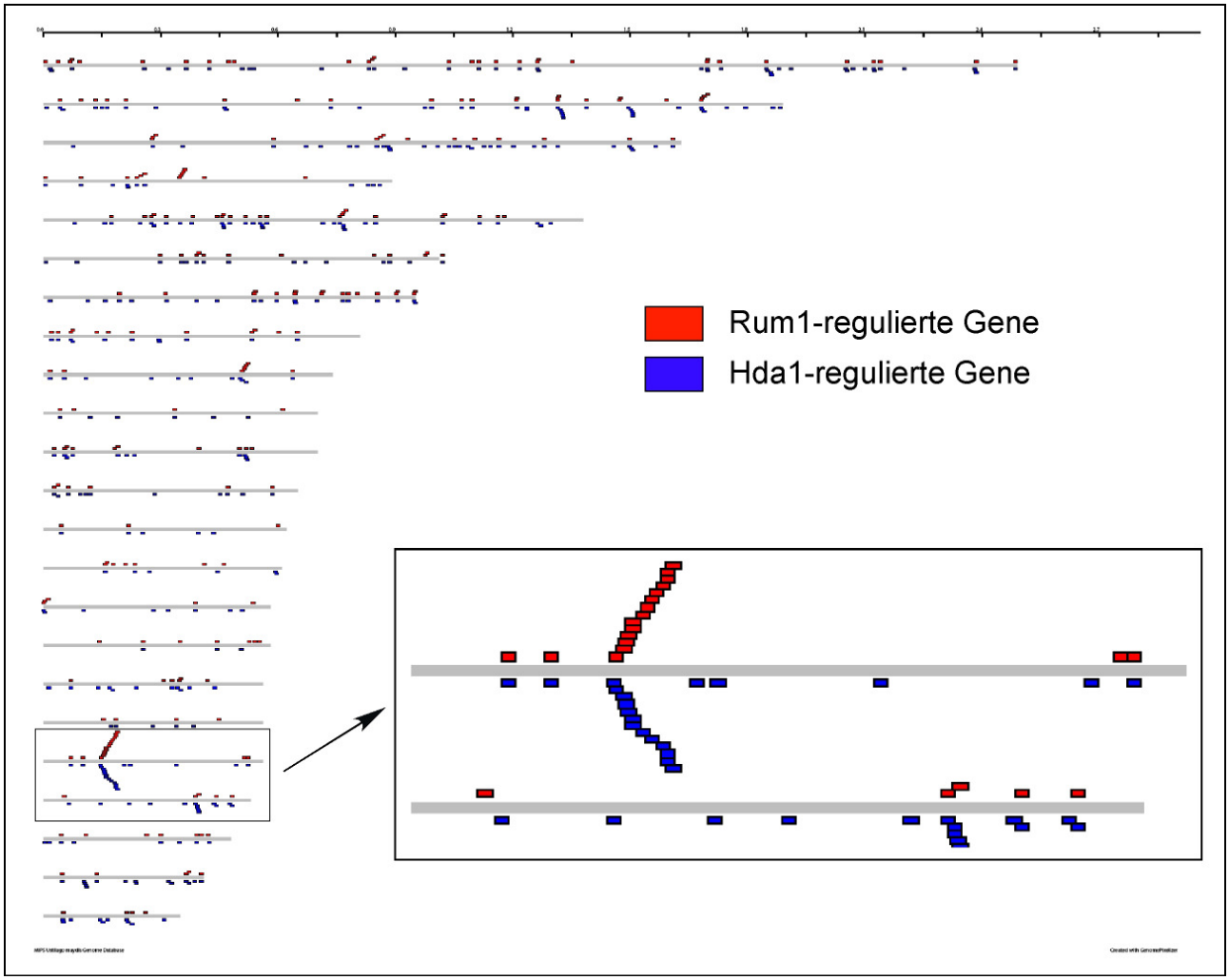

Abbildung 18: Chromosomale Verteilung und Lokalisation der durch Rum1 und/oder Hda1 regulierten Gene. Chromosomen sind als graue Balken dargestellt. Eine Größenabschätzung ist anhand des Zahlenstrahls möglich. Rote Rechtecke stehen für Rum1-regulierte Gene, blaue Rechtecke für Hda1-regulierte Gene.

Gengruppen, die folgende Kriterien erfüllen, wurden als durch Rum1 und/oder Hda1 regulierte Cluster definiert: Gene, die zu einem Cluster zusammengefasst werden, müssen im Vergleich zu FB1, mindestens eine zweifache Expressionsänderung in den Stämmen FB1Δ*rum1* und/oder FB1Δ*hda1* aufweisen und dürfen nicht weiter als 10.000 bp voneinander entfernt liegen. Ein Cluster besteht aus mindestens drei Genen.

Die auf diese Weise identifizierten Cluster sind in Tabelle 4 (Seite 36 – 39) dargestellt.

Tabelle 4: Durch Rum1 und/oder Hda1 regulierte Gencluster. Numerische Bezeichnung der Gencluster: Zahlen vor dem Punkt geben an, auf welchem Chromosom das Cluster lokalisiert ist. Zahlen nach dem Punkt ermöglichen eine Unterscheidung von Clustern, die sich auf demselben Chromosom befinden (linker Tabellenrand). **Spalte 1:** Accession-Nummer des MIPS. Unterstrichen sind Gene, die sich in Gengruppen befinden, deren Funktion bereits untersucht wurde (Kämper *et al.*, 2006). **Spalte 2:** Nummer des probe sets, die eine Identifizierung der auf den DNA-Microarrays enthaltenen Gene erlaubt. **Spalte 3:** Lokalisation des Gens auf dem entsprechenden Chromosom (bp). **Spalte 4:** Distanz der Gene zueinander (bp). **Spalte 5:** Faktorielle Expressionsänderung Hda1-regulierter Gene in FB1Δ*hda1* im Vergleich zu FB1. **Spalte 6:** Faktorielle Expressionsänderung Rum1-regulierter Gene in FB1Δ*rum1* im Vergleich zu FB1. **Spalte 7:** Annotation des MIPS (Stand 10/2006).

	MUMDB Accession-Nummer	probe set	Chromosomale Position (bp)	Distanz (bp)	Δ*hda1*	Δ*rum1*	MUMDB Annotation
1.1	um00628	W45um064G_at	1.848.322		29,20	27,41	putative protein
				2.452			
	um00629	W40um064G_at	1.850.774		9,84		hypothetical protein
				8.820			
	um00633	W25um064G_at	1.859.594		3,09		probable NADH-ubiquinone oxidoreductase
				1.682			
	um00634	C20um064G_at	1.861.276		2,06		probable NADH-ubiquinone oxidoreductase
1.2	um00792	W80um148G_at	2.381.120		18,90		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.463			
	um00793	C75um148G_at	2.382.583		4,23		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.882			
	um00795	W70um148G_at	2.385.465			2,27	hypothetical protein
2.1	um01234	C230um010G_at	1.313.494		6,16	9,71	putative protein
				1.543			
	um01235	W225um010G_at	1.315.037			18,98	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.233			
	um01236	W220um010G_at	1.317.270			3,42	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				3.029			
	um01237	W215um010G_at	1.320.299		6,25		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				3.296			
	um01238	W210um010G_at	1.323.595		24,72		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.844			
	um01239	W205um010G_at	1.325.439		14,41		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.694			
	um01240	W200um010G_at	1.327.133		5,10		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.669			
	um01241	W195um010G_at	1.328.802		7,26		hypothetical protein
2.2	um01294	W80um124G_at	1.494.633		2,27		probable cytochrome b5
				7.908			
	um01297	W65um124G_at	1.502.541		6,80		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.605			
	um01299	C55um124G_at	1.505.146		29,93		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				910			
	um01300	W50um124G_at	1.506.056		16,75		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.538			
	um01301	C45um124G_at	1.507.594		15,82		conserved hypothetical Ustilago-specific protein

	MUMDB Accession-Nummer	probe set	Chromosomale Position (bp)	Distanz (bp)	Δ*hda1*	Δ*rum1*	MUMDB Annotation
2.3	um01374	W40um179G_at	1.681.673		5,17	3,15	hypothetical protein
				3.121			
	um01375	C35um179G_at	1.684.794		4,76	3,04	hypothetical protein
				3.614			
	um01377	C25um179G_at	1.688.408		44,21	38,01	hypothetical protein
				8.681			
	um01378	C19um179G_at	1.697.089			13,03	conserved hypothetical protein
3.1	um01523	W70um024G_at	277.463			2,91	conserved hypothetical protein
				2.017			
	um01524	C75um024G_at	279.480		3,47	4,50	hypothetical protein
				8.995			
	um01528	C90um024G_at	288.475			2,60	conserved hypothetical protein
3.2	um01723	W115um119G_at	881.579		4,68		related to Cytochrome P450
				3.893			
	um01724	W110um119G_at	885.472		2,67		conserved hypothetical protein
				1.229			
	um01725	W105um119G_at	886.701		2,27		conserved hypothetical protein
3.3	um01984	W60um103G_at	1.498.188		19,8	14,05	probable ADH1 - alcohol dehydrogenase I
				5.465			
	um01986	W50um103G_at	1.503.653		2,66		probable sterol carrier protein
				2.862			
	um01987	W45um103G_at	1.506.515		2,97		hypothetical protein
4.1	um05074	W80um196G_at	348.452			4,89	probable Cytochrome P450 monooxygenase / Phenylacetate hydroxylase
				2.762			
	um05075	C75um196G_at	351.214			3,00	conserved hypothetical protein
				4.060			
	um05077	W65um196G_at	355.274			2,36	conserved hypothetical protein
				3.099			
	um05078	C60um196G_at	358.373			18,61	conserved hypothetical protein
				3.791			
	um05080	W50um196G_at	362.164			4,04	hypothetical protein
4.2	um06332	C65um198G_at	239.453		157,23	43,78	Egl1 Endoglucanase 1 procursor (egl1)
				9.243			
	um06334	W55um198G_at	248.696			2,17	related to beta 1,4-mannosyltransferase (egghead protein)
				9.989			
	um06336	W40um198G_at	258.685		2,53	4,67	conserved hypothetical protein
5.1	um02194	W105um126G_at	456.989		11,23	4,81	hypothetical protein
				2.402			
	um02195	C95um126G_at	459.391		6,17	5,71	related to Benzoate 4-monooxygenase
				2.028			
	um02196	W90um126G_at	461.419		4,35		hypothetical protein
5.2	um02230	W120um281G_at	554.395		3,66	3,46	conserved hypothetical protein
				4.523			
	um02233	C110um281G_at	558.918		2,91		probable alcohol dehydrogenase
				2.188			
	um02234	C105um281G_at	561.106		5,70		conserved hypothetical protein

	MUMDB Accession-Nummer	probe set	Chromosomale Position (bp)	Distanz (bp)	Δ*hda1*	Δ*rum1*	MUMDB Annotation
5.3	um02293	C45um006G_at	757.645		8,05	7,70	hypothetical protein
				6.514			
	um02297	C27um006G_at	764.159			3,37	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.294			
	um02298	C26um006G_at	766.453		4,87	4,83	hypothetical protein
				1.067			
	um02299	W21um006G_at	767.520		2,30		hypothetical protein
				2.610			
	um02300	C20um006G_at	770.130		3,43		probable alpha-amylase
				3.128			
	um02301	W15um006G_at	773.258			3,11	related to C2H2-type zinc finger protein
9.1	um03556	C115um031G_at	502.528		2,66		conserved hypothetical protein
				6.024			
	um03558	W105um031G_at	508.552		6,30	4,82	conserved hypothetical protein
				4.993			
	um03559	C100um031G_at	513.545			2,24	related to beta-1,3-glucan binding protein
				2.047			
	um03560	W95um031G_at	515.592			16,45	related to beta-1,3-glucan binding protein
				2.643			
	um03561	C90um031G_at	518.235		2,05	4,01	conserved hypothetical protein
				4.244			
	um03563	W85um031G_at	522.479			3,82	conserved hypothetical protein
11.1	um04033	C34um264G_at	515.530		2,85		hypothetical protein
				2.200			
	um04035	C35um264G_at	517.730		2,02	3,25	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				3.622			
	um04037	W40um264G_at	521.352		6,21		hypothetical protein
15.1	um04889	W140um021G_s_at	515.530		29,11	69,81	related to beta-1,3-glucan binding protein
				2.200			
	um04890	W25um068G_s_at	517.730		5,18	6,32	conserved hypothetical protein
				3.622			
	um04893	C40um068G_at	521.352			16,98	conserved hypothetical protein
17.1	um04813	W140um188G_at	342.878		2,22		conserved hypothetical protein
				5.276			
	um04815	W150um188G_at	348.154			2,25	putative protein
				2.397			
	um04816	W155um188G_at	350.551		15,42	11,95	related to Endoglucanase 1 precursor

	MUMDB Accession-Nummer	probe set	Chromosomale Position (bp)	Distanz (bp)	Δ*hda1*	Δ*rum1*	MUMDB Annotation
19.1	um05294	C15um277G_at	145.923		23,41		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.249			
	um05296	C5um277G_at	148.172		6,34	4,51	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				5.216			
	um05299	C120um125G_at	153.388		5,98	9,68	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.229			
	um05300	C115um125G_at	154.617		41,38	23,52	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.358			
	um05301	C105um125G_at	156.975		2,13	2,87	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.423			
	um05302	C100um125G_at	159.398		3,79	2,75	hypothetical protein
				1.019			
	um05303	C96um125G_at	160.417		10,80	3,75	hypothetical protein
				5.869			
	um05307	W85um125G_at	166.286		7,83	9,80	hypothetical protein
				3.640			
	um05308	C80um125G_at	169.926			3,95	hypothetical protein
				4.633			
	um05310	C67um125G_at	174.559		20,03	21,22	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.498			
	um05312	C64um125G_at	177.057			23,39	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				4.663			
	um05314	C55um125G_at	181.720		6,89	5,08	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				3.276			
	um05316	C45um125G_at	184.996		8,56	5,75	related to transposase, pseudogene
				1.572			
	um05317	C40um125G_at	186.568		9,57	6,39	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				2.025			
	um05319	C34um125G_at	188.593		4,09	3,50	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
20.1	um05928	W25um245G_at	389.018		2,17	2,60	conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				3.918			
	um05929	C21um245G_at	392.936		4,57		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.047			
	um05930	C20um245G_at	393.983		8,90		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.909			
	um05931	C15um245G_at	395.892		23,35		conserved hypothetical Ustilago-specific protein
				1.376			
	um05932	C10um245G_at	397.268		21,30	4,15	hypothetical protein
22.1	um06178	C80um086G_at	104.796		12,51		Mig2-1
				1.417			
	um06179	C75um086G_at	106.213		36,72		Mig2-2
				2.502			
	um06180	C70um086G_at	108.715		38,50		Mig2-4
				1.358			
	um06181	C65um086G_at	110.073		38,27		Mig2-5
23.1	um06428	W180um019G_at	213.011		4,30	8,24	related to Thiamine-repressible acid phosphatase precursor
				3.647			
	um06430	C190um019G_at	216.658		2,13		probable heat shock protein HSP104
				9.879			
	um06433	W200um019G_at	226.537		10,36	15,08	Acu1 K,P-type ATPase

Insgesamt wurden 21 Cluster mit insgesamt 95 Genen durch Rum1 und/oder Hda1 reguliert. Davon unterlagen drei bzw. ein Cluster ausschließlich der Regulation durch Rum1 bzw. Hda1.

2.4 Proteinbiochemische Experimente zur Rum1-Komplexaufreinigung

Die vergleichende Transkriptomanalyse *rum1*- und *hda1*-defizienter Stämme zeigte, dass eine hohe Anzahl koregulierter Gene existiert. Über die Hälfte aller deregulierten Gene konnten in beiden Stämmen nachgewiesen werden. Die Vermutung lag somit nahe, Rum1 und Hda1 könnten in einem gemeinsamen Proteinkomplex vorliegen, um eine Transkriptionsregulation spezifischer Zielgene zu vermitteln.

2.4.1 Das TAP-Tag-Verfahren

Das TAP (tandem affinity purification)-Tag-Verfahren ermöglicht eine schonende Aufreinigung und Anreicherung von Proteinkomplexen, deren genaue Zusammensetzung, Aktivität oder Funktion nicht bekannt ist. Hierzu wird eine bekannte Komponente des Komplexes mit einem TAP-Epitop versehen. Über zwei Affinitätssäulen kann der Komplex isoliert und angereichert werden (Abb. 19, Seite 41) (Rigaut *et al*., 1999).

Das TAP-Epitop besteht aus drei funktionellen Teilen: einem Calmodulin-Bindepeptid, einer TEV-Protease-Schnittstelle und Protein A. Während des ersten Säulen-Aufreinigungsschrittes wird Protein A an immobilisierte IgGs gebunden. Kontaminationen durch Proteine, die nicht in dem aufzureinigenden Komplex enthalten sind, werden durch einen Waschschritt entfernt. Durch Zugabe von TEV-Protease wird das TAP-Epitop enzymatisch gespalten, so dass das Calmodulin-Bindepeptid freigelegt wird und in einem zweiten Säulen-Aufreinigungsschritt an Calmodulin gebunden werden kann. Schließlich wird der Komplex mit Hilfe von EGTA eluiert und kann auf seine Komponenten hin untersucht werden (Puig *et al*., 2001; Rigaut *et al*., 1999).

Mit Hilfe der TAP-Tag-Methode sollten Informationen über die Zusammensetzung des putativen Rum1-Repressorkomplexes gesammelt werden.

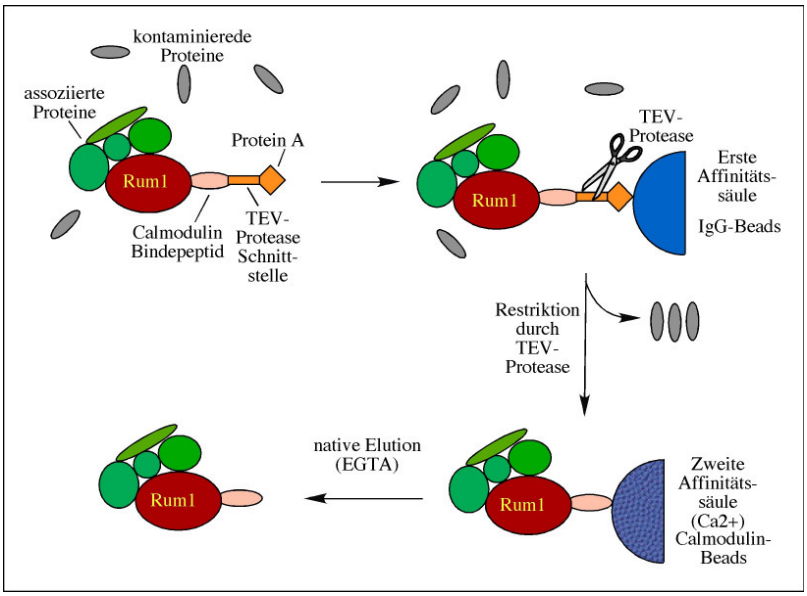

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Aufreinigung eines Rum1-Komplexes über das TAP-Tag-Verfahren. Dargestellt ist eine Aufreinigungsstrategie, bei der Rum1 mit einem TAP-Epitop versehen ist (modifiziert nach Rigeaut *et al.*, 1999).

Ein Integrationsplasmid, bei dem die 560 bp lange *tap*-Epitop-Sequenz zusammen mit einer Hygromycin B-Resistenzkassette an das 3´-Ende einer *rum1*-Flanke fusioniert ist, wurde verwendet, um Stämme zu generieren, die ein TAP-Epitop-markiertes Rum1-Protein exprimieren (FB1*rum1-tap* und FB2*rum1-tap*) (Abb. 20). Die erfolgreiche genomische Integration des transkriptionellen Fusionskonstrukts wurde anhand von Southern-Analysen kontrolliert und der Rekombinationsbereich innerhalb des *rum1*-ORFs sequenziert (Daten nicht gezeigt).

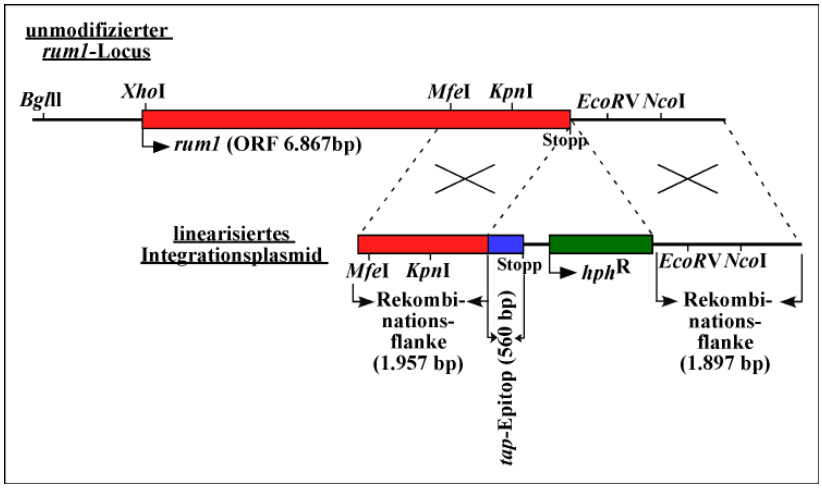

Abbildung 20: Schematische Darstellung des *rum1*-Locus und des linearisierten *rum1-tap*-Integrationsplasmids. Positionen von Restriktionsschnittstellen sowie Fragmentgrößen sind angegeben. *rum1* (roter Balken) symbolisiert das *rum1*-Gen, *hph*^{R} (grüner Balken) die Hygromycin B-Resistenzkassette, *tap* (blauer Balken) die *tap*-Epitopsequenz und Stopp die Position des Stopp-Kodons. Die Kreuze markieren Bereiche in denen eine homologe Rekombination möglich ist.

Die Fusion des *tap*-Epitops (etwa 8 % der Größe des Rum1-Proteins) geht mit einem Funktionsverlust des Rum1-Proteins einher. Sowohl Tests auf Endoglukanase-Sekretion, als auch Pflanzeninfektionen und Sporenausstriche zeigten, dass offensichtlich kein funktionelles Rum1-Protein in den Zellen der Stämme FB1*rum1-tap* und FB2*rum1-tap* vorliegt (Abb. 21).

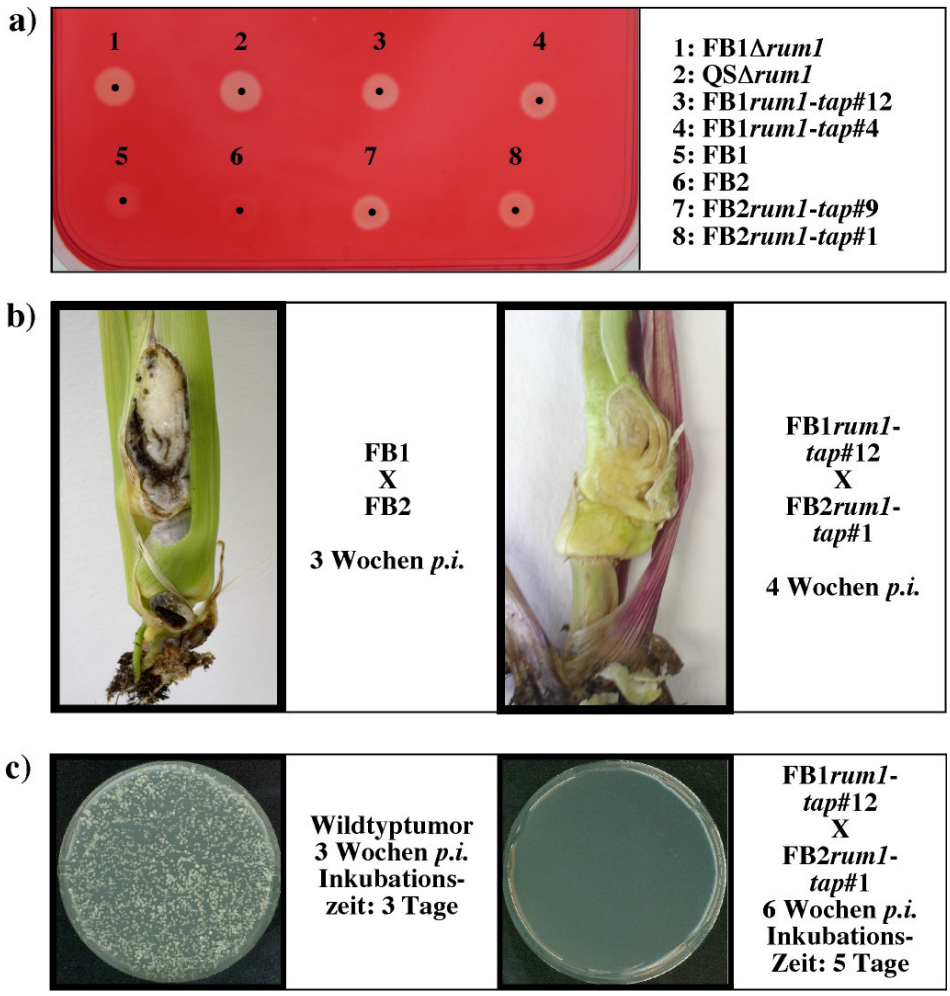

Abbildung 21: CMC-Test, Tumorinduktion, Sporenreifung und Keimungsfähigkeit der Sporen von Stämmen die das *rum1-tap*-Fusionskonstrukt enthielten. Es wurden jeweils mindestens 12 unabhängige Transformanten, die das Fusionskonstukt enthielten, untersucht, um die Ergebnisse zu verifizieren. **a) CMC-Test:** Die Wildtypstämme FB1 und FB2 wurden als Negativkontrolle verwendet, während die Stämme FB1Δ*rum1* und QSΔ*rum1* als Positivkontrolle der Endoglukanasesekretion dienten. Alle Stämme die das *rum1-tap*-Fusionskonstrukt enthielten, wiesen eine Endoglukanasesekretion auf. **b) Tumorinduktion und Sporenreifung:** Vier Wochen alte, eröffnete Tumore, induziert durch eine Infektion mit gekreuzten Wildtypstämmen und Stämmen, die das *rum1-tap*-Fusionskonstrukt enthielten. Stämme, bei denen das *tap*-Epitop an *rum1* fusioniert war, bildeten, ebenso wie *rum1*-Deletionsstämme, kein dunkel gefärbtes Sporenmaterial im Inneren der Tumore. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis der gekreuzten Stämme FB1*rum1-tap*#12 X FB2*rum1-tap*#1. **c) Ausstriche getrockneter, mit Kupfersulfat behandelter Tumore:** Bei Medienplatten, auf denen Wildtyptumore ausgestrichen wurden, war als Resultat gekeimter Sporen ein Rasen von Pilzkolonien zu erkennen. Tumore von Stämmen, die das *rum1-tap*-Fusionskonstrukt enthielten, beinhalteten kein reifes, keimungsfähiges Sporenmaterial. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis der gekreuzten Stämme FB1*rum1-tap*#12 X FB2*rum1-tap*#1.

Western-Analysen wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob eine Translation des Fusionskonstrukts stattfindet. Die Nachweisreaktion wurde mittels Peroxidase-gekoppelter Anti-Peroxidase-Antikörper (PAP) aus Kaninchen durchgeführt, die an Protein A des TAP-Epitops binden. Bei keinem der untersuchten Stämme konnte eine spezifische Bande in der erwarteten Höhe von 247 kDa detektiert werden (Abb. 22). Das schwache Signal bei 83 kDa kann als unspezifisch angesehen werden, da im Falle einer Degradierung des Proteins eine Vielzahl von Banden unterschiedlicher Höhe zu erwarten gewesen wäre.

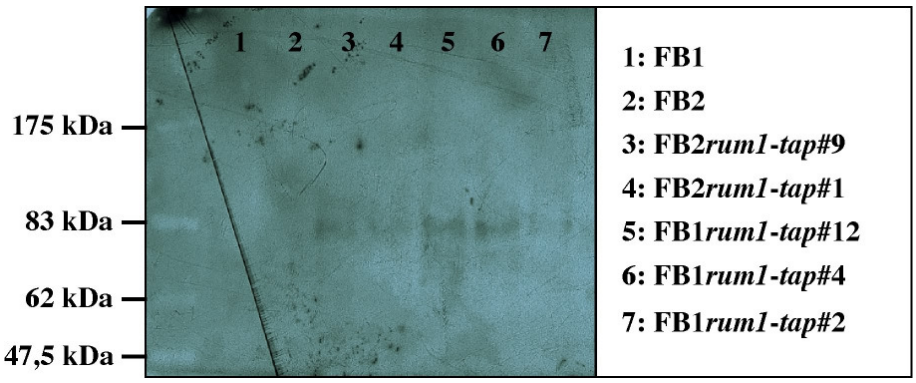

Abbildung 22: Western-Analyse von Transformanten, die das *rum1-tap*-Fusionskonstrukt enthielten. Jeweils 100 µg isoliertes Gesamtprotein wurde über ein 6 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und eine TAP-Epitop-spezifische Nachweisreaktion mittels Peroxidase-gekoppelter Anti-Peroxidase-Antikörper aus Kaninchen durchgeführt. Keiner der sieben getesteten Stämme wies eine spezifische Bande bei 247 kDa auf.

Die Western-Analyse zeigte, dass ein Rum1-Volllängenprotein mit funktionellem TAP-Epitop nicht gebildet wird. Für die Transkription und Translation heterologer Gene spielt die Basenzusammensetzung eine wichtige Rolle (Ladendorf, 2003; Zarnack *et al*., 2006). Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Expression könnte die speziesuntypische Basenzusammensetzung des verwendeten heterologen Gens sein, die zu einer ineffizienten Kodon- und/oder Dikodon-Benutzung führt (als Dikodon ist die Kombination der Kodons für zwei aufeinanderfolgende Aminosäuren zu verstehen).

Mit Hilfe einer computergestützten Analyse von 457 offenen Leserahmen konnte die bevorzugte Kodon- und Dikodon-Verwendung von *U. maydis* errechnet werden (Ladendorf, 2003; Zarnack *et al*., 2006). Dabei stellte sich heraus, dass Gene von *U. maydis* einen durchschnittlichen GC-Gehalt von knapp 56 % aufweisen. Mit einem CG-Gehalt von 42 % weicht das nicht-optimierte *tap*-Epitop deutlich von der durch *U. maydis* bevorzugten Basensequenz ab. Durch eine Anpassung der Dikodon-Verwendung der heterologen *tap*-Sequenz an die Sequenzgegebenheiten von *U. maydis* sollten potentielle, jedoch bislang unbekannte Motive, die zur Destabilisierung des Transkripts

beitragen, auf Sequenzebene eliminiert werden. Einer Transkriptdegradierung oder einer Unterdrückung der Translation aufgrund eines suboptimalen Kodon- und Dikodon-Gebrauchs wird damit vorbeugt.

Für die Neusynthese der *tap*-Sequenz wurde eine von Stemmer (1995) entwickelte und von Hale und Thompson (1998) modifizierte Methode verwendet, bei der ein doppelsträngiges DNA-Fragment durch die komplementäre Anlagerung teilweise überlappender Oligonukleotide erzeugt wird. Die Synthese wird in mehreren aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen durchgeführt, um ein Auffüllen einzelsträngiger Bereiche zu gewährleisten. Die letzte PCR-Reaktion dient der Amplifizierung des vollständigen Syntheseprodukts (siehe Kapitel 4).

Die Optimierung der *tap*-Sequenz auf die bevorzugte Dikodon-Verwendung von *U. maydis* führte zu einem Austausch von 120 der insgesamt 183 Kodons (etwa 66 %), was sich in einer Veränderung der Primärsequenz, nicht aber der Basenzusammensetzung widerspiegelt. Der GC-Gehalt wurde dadurch von 42 % auf 61 % erhöht. Das optimierte *tap*-Epitop (*tap**) wurde an das 3´-Ende von *rum1* fusioniert, Wildtypstämme mit diesem Konstrukt transformiert und die erfolgreiche genomische Integration des transkriptionellen Fusionskonstrukts anhand von Southern-Analysen kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Jeweils sechs Stämme mit FB1 und FB2 als genetischem Hintergrund konnten verifiziert werden, die als FB1*rum1-tap** und FB2*rum1-tap** bezeichnet wurden.

Tests auf Endoglukanasesekretion zeigten, dass die haploiden *rum1-tap**-Stämme keine Deregulation von *egl1* aufwiesen (Abb. 23, Seite 45). Pflanzeninfektionen (Daten nicht gezeigt) sowie Sporenausstriche (Abb. 24, Seite 45) zeigten weiterhin, dass reife, keimungsfähige Sporen gebildet wurden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Funktion von Rum1 durch das TAP*-Epitop nicht eingeschränkt wird.

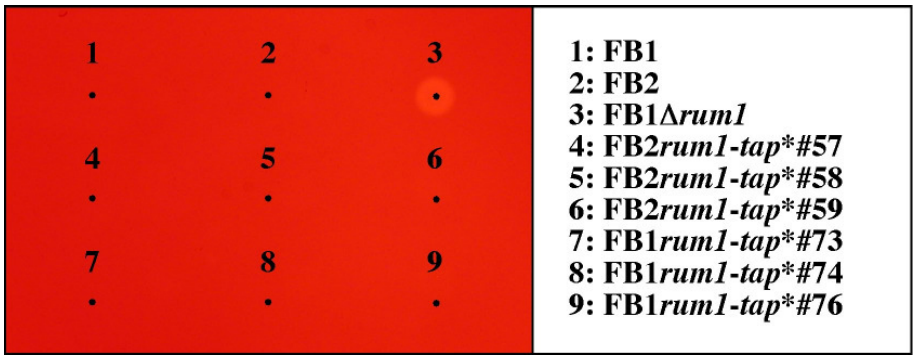

Abbildung 23: Test der TAP*-Epitop enthaltenden Stämme auf Endoglukanase-Sekretion. Untersucht wurden Stämme, bei denen eine Fusion von Rum1 mit dem für *U. maydis* optimierten TAP-Epitop (TAP*) vorlag. Die Wildtypstämme FB1 und FB2 wurden als Negativkontrolle verwendet, während der Stamm FB1Δ*rum1* als Positivkontrolle diente. Bei keinem der Stämme, die das Rum1-TAP*-Fusionskonstrukt enthielten, konnte eine Endoglukanasesekretion detektiert werden.

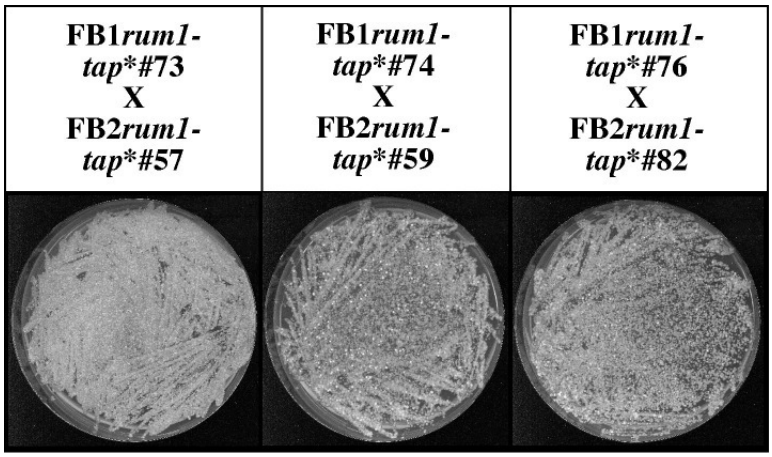

Abbildung 24: Untersuchung auf keimungsfähiges Sporenmaterial. Als Untersuchungsmaterial dienten Tumore, die durch eine Infektion von Stämmen, die das *rum1-tap**-Fusionskonstrukt enthielten, induziert wurden. Als Resultat ausgekeimter Sporen war bei allen getesteten Stämmen ein Rasen von Sporidienkolonien zu erkennen. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von Kreuzungen der Stämme FB1*rum1-tap**#73 X FB2*rum1-tap**#57, FB1*rum1-tap**#74 X FB2*rum1-tap**#59 und FB1*rum1-tap**#76 X FB2*rum1-tap**#8.

Weiterhin zeigten Untersuchungen auf Proteinebene, dass das Rum1-TAP*-Fusionskonstrukt als Volllängenprotein exprimiert wird (Abb. 25, Seite 46). Zusätzlich zu dem erwarteten Signal bei etwa 247 kDa wurde jedoch eine Vielzahl kleinerer Banden detektiert, die vermutlich Abbauprodukte des Rum1-Proteins darstellen. Ein Nachweis des Rum1-TAP*-Proteins aus Proben die anhand eines Schnellpräparationsverfahrens gewonnen wurden zeigte, dass intrazellulär offensichtlich keine verkürzten Rum1-TAP*-Proteine vorliegen, denn außer dem erwarteten Signal bei ca. 247 kDa konnten keine weiteren Banden detektiert werden.

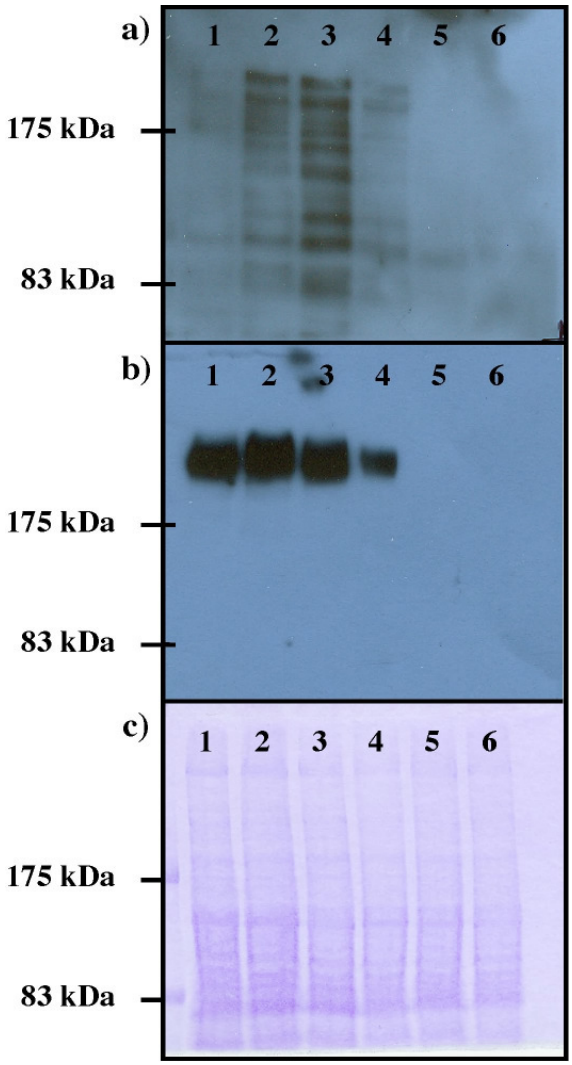

Abbildung 25: Spezifischer Nachweis des Rum1-TAP*-Proteins mittels Western-Analyse. Aufgetragen sind Proteinproben folgender Stämme: (1) FB2*rum1-tap**#57, (2) FB2*rum1-tap**#59, (3) FB1*rum1-tap**#74, (4) FB1*rum1-tap**#73, (5) FB1, (6) FB2. Der spezifische Nachweis des an Rum1 fusionierten TAP*-Epitops erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelter Anti-Peroxidase-Antikörper aus Kaninchen, welche an Protein A binden (siehe Kapitel 4). **a) Western-Analyse von *U. maydis*-Stämmen, bei denen eine Fusion von rum1 mit dem optimierten tap-Epitop (tap*) vorliegt.** Aufgetragen wurden Proben, die über ein konventionelles Proteinaufreinigungsverfahren gewonnen wurden (siehe Kapitel 4). Außer dem erwarteten Signal bei 247 kDa war eine Vielzahl von Banden geringerer Höhe zu erkennen. **b) Western-Analyse von Proteinproben der *rum1-tap**-Stämme, die mittels Schnellpräparationsverfahren gewonnen wurden.** Bei dem hier durchgeführten Schnellpräparationsverfahren wurde mit flüssigem Stickstoff gefrorenes, über eine Kugelmühle aufgeschlossenes Zellmaterial direkt in 95°C heißen Auftragspuffer gegeben, die Probe kurz zentrifugiert und der Überstand zur Auftrennung der Proteine auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Kapitel 4). Beim Nachweis des Rum1-TAP*-Konstrukts konnte eine spezifische Bande auf der erwarteten Höhe von 247 kDa detektiert werden. Abbauprodukte von Rum1-TAP* waren nicht zu erkennen. **c) Quantitative Abschätzung der aufgetragenen Proteinmenge.** Zur Mengenabschätzung diente ein mit Coomassie-Lösung gefärbtes Gel.

Da anzunehmen ist, dass die Stabilität des putativen Rum1-Komplexes von der Stabilität der daran beteiligten Proteine abhängt, wurden Untersuchungen durchgeführt um einen Eindruck davon zu erhalten in welchem zeitlichen Rahmen mit einer quantitativen Degradierung des Rum1-Proteins zu rechnen ist. Dafür wurde gefrorenes Pilzmaterial von Stämmen die das Rum1-TAP*-Konstrukt exprimierten mittels Kugelmühle aufgeschlossen und nach Zugabe von Proteinaseinhibitoren für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4 °C inkubiert. Die direkt nach Zentrifugation und anschließend alle 30 Minuten abgenommenen Proben (über einen Zeitraum von 160 Minuten) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und erst vor Beladen des Polyacrylamidgels mit 95°C heißem Auftragspuffer versetzt. Die Western-Analyse zeigte, dass eine zehnminütige Inkubationszeit bei 4 °C bereits ausreichte, um einen großen Teil des Rum1-Proteins degradieren zu lassen. Außer dem Signal auf erwarteter Höhe konnte eine Vielzahl von Abbauprodukten geringerer molekularer Größe detektiert werden, die ein funktionelles TAP*-Epitop aufwiesen. Die Höhe der Banden reichte von 247 kDa (erwartete molekulare Masse des intakten

Rum1-Volllängenproteins mit fusioniertem TAP*-Epitop) bis etwa 83 kDa (Abb. 26a). Eine Degradierung des Gesamtproteinextrakts konnte hingegen nicht festgestellt werden. Eine Ponceaurot-Färbung der Nitrozellulose-Membran zeigte das typische Bandenmuster von Gesamtproteinextrakten aus *U. maydis* (Abb. 26b).

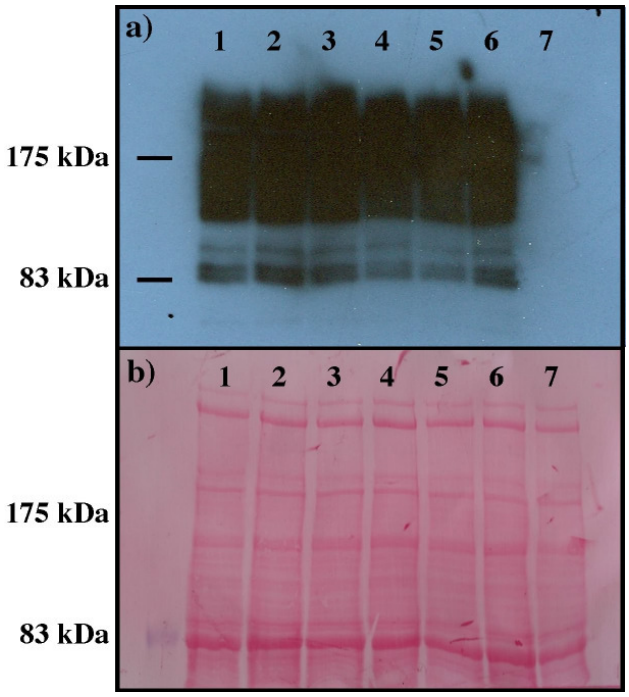

Abbildung 26: Western-Analyse zur zeitlich abhängigen, extrazellulären Degradierung von Rum1-TAP*-Fusionskonstrukten. Aufgetragen sind Proteinproben der Stämme FB2*rum1-tap**#59 und FB2. (1) FB2*rum1-tap**#59 / 10 min, 4 °C; (2) 40 min, 4 °C; (3) 70 min, 4 °C; (4) 100 min, 4 °C; (5) 130 min, 4 °C; (6) 160 min, 4 °C; (7) FB2 / 160 min, 4 °C. **a) Spezifischer Nachweis des TAP*-Epitops.** Der spezifische Nachweis des TAP*-Epitops erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelter Anti-Peroxidase-Antikörper. Außer bei der Negativkontrolle (FB2) konnte bei allen Proben außer dem erwarteten Signal bei 247 kDa eine Vielzahl von Banden geringerer Höhe detektiert werden. **b) Ponceaurot-Färbung der Nitrozellulose-Membran.** Zur quantitativen Abschätzung wurden die auf eine Nitrozellulose-Membran übertragenen Proteinmengen anhand einer Ponceaurot-Färbung kontrolliert. Eine Degradierung des Gesamtproteinextrakts lag nicht vor.

Metabolische Instabilität und ein schneller Umsatz (Turnover) sind charakteristisch für regulatorische Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, deren Konzentration sich beispielsweise in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus betreffender Zellen ändern muss (King *et al.*, 1996; Irninger und Braus, 2003). Viele dieser Proteine weisen PEST-Sequenzen auf, ein Erkennungsmotiv für Proteolysemechanismen, die beispielsweise durch Calpain und das 26S Proteasom realisiert werden (Rechsteiner und Rogers, 1996). Über das Programm PESTFIND konnten insgesamt 13 potentielle PEST-Sequenzen in Rum1 identifiziert werden, wobei sechs dieser PEST-Sequenzen einen PESTFIND-Score von über 5.0 aufwiesen, was, laut Rechsteiner und Rogers (1996), einen starken Hinweis auf die Verwendung dieser Sequenz als Erkennungsmotiv darstellt (Rechsteiner und Rogers, 1996). Die proteolytische Aktivität von Calpain ist auf das Vorhandensein von Kalziumionen angewiesen (Marie *et al.*, 2005) und kann somit durch die Zugabe von EDTA gehemmt werden. Da jedoch bisher keine Informationen darüber vorliegen, ob Rum1 oder der Rum1-Multiproteinkomplex auf zweiwertige Kationen angewiesen ist, wurde bei der Proteinextraktion auf die

Zugabe dieses Chelatbildners verzichtet. Folglich wäre eine Proteolyse von Rum1 durch Calpain denkbar.

Darüber, welche Mechanismen für die Degradierung von Rum1 verantwortlich sind, kann jedoch nur spekuliert werden. Durch Deletionen und Mutationen von PEST-Sequenzen war es in der Vergangenheit bereits gelungen, die Stabilität betroffener Proteine zu erhöhen (Martinez *et al*., 2003; Borges und Gomes, 2000; Marie *et al*., 2005; Fukuda und Itoh, 2004). Sollten die in Rum1 vorhergesagten PEST-Motive Erkennungssequenzen für einen Proteinabbau darstellen, könnte Rum1 durch Deletion und/oder Mutation dieser Sequenzen unter Umständen stabilisiert werden.

2.4.2 Koimmunpräzipitation

Rum1 weißt extrazellulär eine geringe Stabilität auf. Um lange Inkubationszeiten zu vermeiden, wie sie bei einer Komplexaufreinigung über das TAP-Tag-Verfahren benötigt werden, wurde für einen Interaktionsnachweis von Rum1 und Hda1 die Methode der Koimmunpräzipitation gewählt. Ebenso wie mit dem TAP-Tag-Verfahren können sowohl epitopmarkierte Proteinkomponenten eines Komplexes spezifisch nachgewiesen, als auch unbekannte Komponenten des Komplexes isoliert werden.

Um eine Interaktion von Rum1 und Hda1 nachweisen zu können, müssen beide Proteine mit unterschiedlichen, spezifisch nachweisbaren Epitopen versehen sein. Zu diesem Zweck wurde das frei replizierende Plasmid pNEBUCotef-*hda1*H*myc* in die Stämme FB1*rum1-tap** und FB2*rum1-tap** transformiert. Auf dem Plasmid kodiert, befindet sich Hda1, an dessen C-Terminus das Hexa-Myc-Epitop fusioniert ist.

Vorangegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass mit einem *myc*-Epitop versehene *hda1* exprimiert wird und in der Lage ist, den Δ*hda1*-Phänotyp zu komplementieren (Jamnischek, 2003). Da das Fusionskonstrukt *hda1-myc* nicht in den Original-Locus integriert ist, sondern die Expression von einem frei replizierenden Plasmid erfolgt, liegt sowohl wildtypische als auch Myc-markierte Hda1 zeitgleich in der Zelle vor. Folglich muss davon ausgegangen werden, dass beide Hda1-Varianten um die Bindungsstelle innerhalb des Komplexes konkurrieren. Um eine möglichst effiziente Expression des Konstrukts zu ermöglichen, wurde das *myc*-Epitop in Hinblick auf die bevorzugte Basenzusammensetzung von *U. maydis* optimiert (*myc**) (Abb. 27, Seite 49).

Myc:	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L
myc:	gaa	caa	aag	ttg	att	tct	gaa	gaa	gat	ttg
myc*:	gag	cag	aag	ctc	atc	tcg	gaa	gag	gac	ctc

Abbildung 27: Myc-Basen- und Aminosäuresequenz vor und nach Optimierung. Unter der Aminosäuresequenz ist die ursprüngliche Basensequenz (*myc*, grün dargestellt) und darunter die optimierte Sequenz angegeben (*myc**, blau und rot dargestellt). Im Vergleich zur Originalsequenz wurden insgesamt acht von zehn Tripletts verändert (rot dargestellt) und damit der GC-Gehalt von 30 % auf knapp 57 % erhöht.

Die Expressionsstärke der mit konventionellem bzw. optimiertem *myc*-Epitop versehenen Histondeacetylase wurde in den Stämmen FB1*rum1-tap*/hda1-myc*, FB2*rum1-tap*/hda1-myc*, FB1*rum1-tap*/hda1-myc** und FB2*rum1-tap*/hda1-myc** mittels Western-Analyse verglichen. Bei allen untersuchten Stämmen konnte eine spezifische, singuläre Bande bei 66 kDa detektiert werden. Die nachgewiesene Proteinmenge differierte jedoch stark zwischen den verschiedenen Stämmen. Fusionskonstrukte, die das optimierte *myc*-Epitop (myc*) beinhalten, wurden deutlich stärker exprimiert als solche, bei denen *hda1* mit einem konventionellen *myc*-Epitop markiert ist. Da keine weiteren Banden detektiert wurden, kann eine Kreuzreaktion der verwendeten Anti-Myc-Antikörper mit anderen *U. maydis*-Proteinen ausgeschlossen werden (Abb. 28).

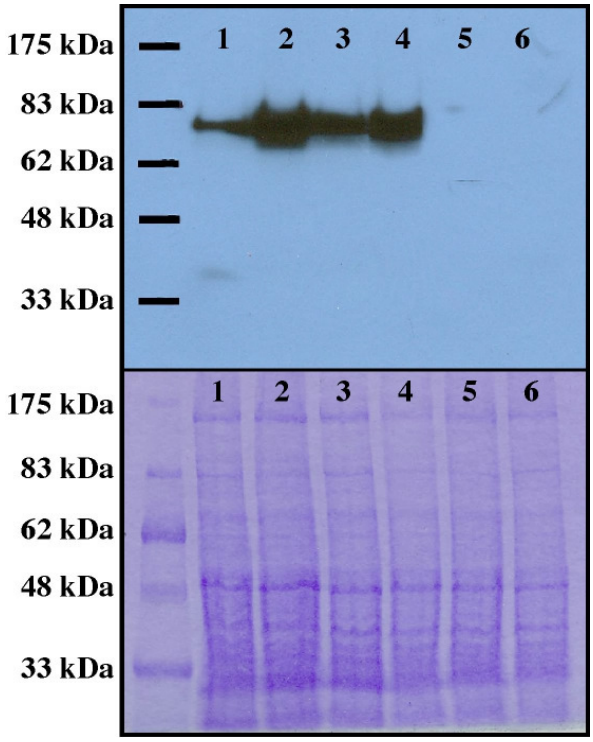

Abbildung 28: Translationaler Expressionsvergleich von Hda1 mit konventionellem und optimiertem Myc-Epitop. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis der Stämme FB1*rum1-tap*/hda1-myc* (1), FB1*rum1-tap*/hda1-myc** (2), FB2*rum1-tap*/hda1-myc* (3) und FB2*rum1-tap*/hda1-myc** (4). Die Stämme FB1 (5) und FB2 (6) dienten als Wildtypkontrollen. Es wurde jeweils 100 µg Proteinextrakt auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und ein Nachweis mit spezifischen Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt. Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford bestimmt, wobei eine Abschätzung der auf das Gel aufgetragenen Proteinmenge anhand einer Coomassie-Färbung erfolgte.

Mit der verwendeten Epitopkombination ist es nicht möglich, den Rum1-Hda1-Komplex durch eine Bindung von Hda1 aufzureinigen. Das für die Markierung des Rum1-Proteins verwendete TAP*-Epitop enthält Protein A, welches an den konstanten Teil (Fc-Terminus) von G-Immunglobulinen (IgG) bindet. Dabei besteht zwar eine Präferenz für IgGs, die aus Kaninchen gewonnen werden, Antikörper anderer Spezies werden jedoch ebenfalls gebunden. Bei den verwendeten Myc-spezifischen Anitkörpern handelt es sich um IgGs der Maus, gebunden an Schaf-Anti-Maus-Antikörper, welche auf der Oberfläche von paramagnetischen Kügelchen (Dynabeads) immobilisiert sind. Folglich wird bei einer Inkubation des Proteinextrakts mit den Dynabeads nicht nur Hda1 spezifisch an die Anti-Myc-Antikörper gebunden, sondern auch Protein A an den Fc-Terminus derselben Immunglobuline. Aufgrund dieser Kreuzreaktion kann der Nachweis eines Rum1 und Hda1 beinhaltenden Komplexes, mit der in dieser Arbeit gewählten Epitop-Kombination, nur über die Immunpräzipitation von TAP*-markiertem Rum1-Protein erfolgen (Abb. 29).

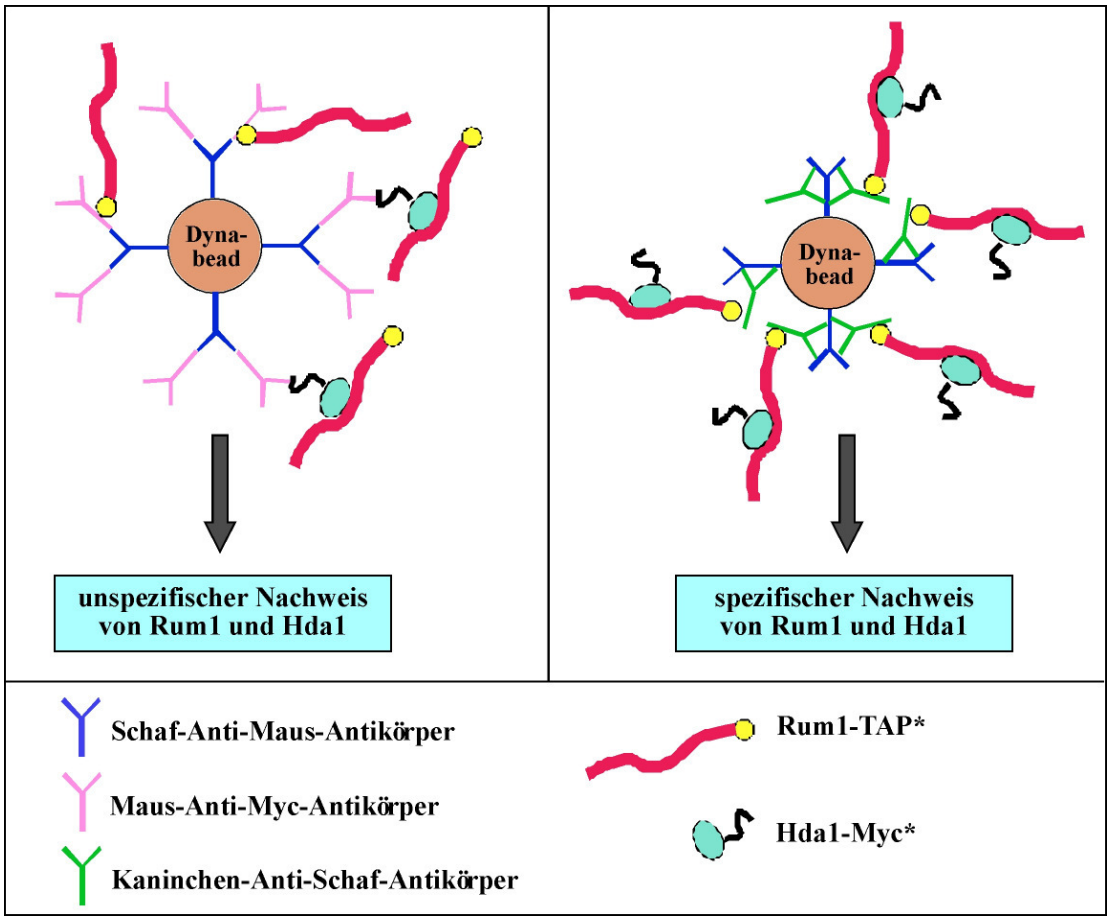

Abbildung 29: Schema der Isolierung eines Rum1-Hda1-Proteinkomplexes durch Koimmunpräzipitation. **a)** Durch die Bindung von Protein A an den Fc-Terminus der Maus-Anti-Myc-Antikörper nicht mögliche Isolierungsstrategie (siehe Text). **b)** Isolierungsstrategie des Proteinkomplexes über Rum1-TAP*.

Die postulierte Interaktion von Hda1 und Rum1 wurde mit einer Koimmunpräzipitation untersucht, bei welcher der putative Komplex über die Isolierung des TAP*-markierten Rum1-Proteins aufgereinigt werden sollte. Zu diesem Zweck wurden die Stämme FB1*rum1-tap*/hda1-myc**, FB1*rum1-tap*/hda1-myc*, FB1*rum1-tap**, FB1*hda1-myc** und FB1*hda1-myc* generiert. Während sich bei diesen Stämmen das *rum1-tap**-Konstrukt im genomischen Ursprungs-Locus von *rum1* befindet, sind die *hda1-myc*-Konstukte auf den frei replizierenden Plasmiden pNEBUCotef-*hda1*H*myc* und pNEBUCotef-*hda1*H*myc** lokalisiert. Dynabeads mit gekoppelten Antikörpern wurden zusammen mit Proteinextrakten der Stämme FB1*rum1-tap*/hda1-myc**, FB1-*rum1-tap*/hda1-myc*, FB1*rum1-tap**, FB1*hda1-myc**, FB1*hda1-myc* und FB1 bzw. Proteinextraktionspuffer (Negativkontrolle) inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Magneten isoliert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Immobilisierung auf einer Nitrozellulose-Membran wurden spezifische Nachweise von epitopmarkiertem Rum1- und Hda1-Protein durchgeführt.

Wie erwartet, konnte das Rum1-TAP*-Fusionsprotein nur bei Stämmen nachgewiesen werden, die ein *rum1-tap**-Konstrukt beinhalteten. Eine unspezifische Bindung der Peroxidase-gekoppelten Anti-Peroxidase-Antikörper an andere *U. maydis*-Proteine oder an die immobilisierten Antikörper kann somit ausgeschlossen werden. Unspezifische Kreuzreaktionen der Myc-spezifischen Antikörper lagen ebenfalls nicht vor. Bei Stämmen, die das Rum1-TAP*-Fusionsprotein exprimierten, wurden sowohl Volllängenprotein als auch TAP*-Epitop enthaltende Proteinfragmente isoliert (Abb. 30a, Seite 52). Das dadurch entstehende Bandenmuster konnte teilweise bereits bei Western-Analysen beobachtet werden, die der Untersuchung der extrazellulären Stabilität von Rum1 dienten (vergleiche Abb. 26a, Seite 46). Der Stamm FB1*rum1-tap*/hda1-myc** lieferte klare Signale beim Nachweis des TAP*-markierten Rum1 und Myc*-markierter Hda1 (eine distinkte Bande auf der erwarteten Höhe von etwa 66 kDa für Hda1-Myc), was eindeutig auf eine Interaktion beider Proteine schließen lässt (Abb. 30a und Abb. 30b, Seite 52).

Überraschenderweise konnte bei FB1*rum1-tap*/hda1-myc* keine epitopmarkierte Hda1 detektiert werden (Abb. 30b, Seite 52). Obwohl dieser Stamm im Vorfeld auf die Expression von Rum1-TAP* und Hda1-Myc getestet wurde, konnte bei der Kontrolle der Proteinextrakte, die für die Koimmunpräzipitation verwendet wurden, kein Myc-markiertes Hda1-Protein nachgewiesen werden (Abb. 30d, Seite 52). Die fehlende Interaktion von Rum1 und Hda1 in diesem Stamm kann somit auf eine zu geringe (unterhalb der Nachweisgrenze) oder nicht vorhandene Expression von Hda1-Myc zurückgeführt werden.

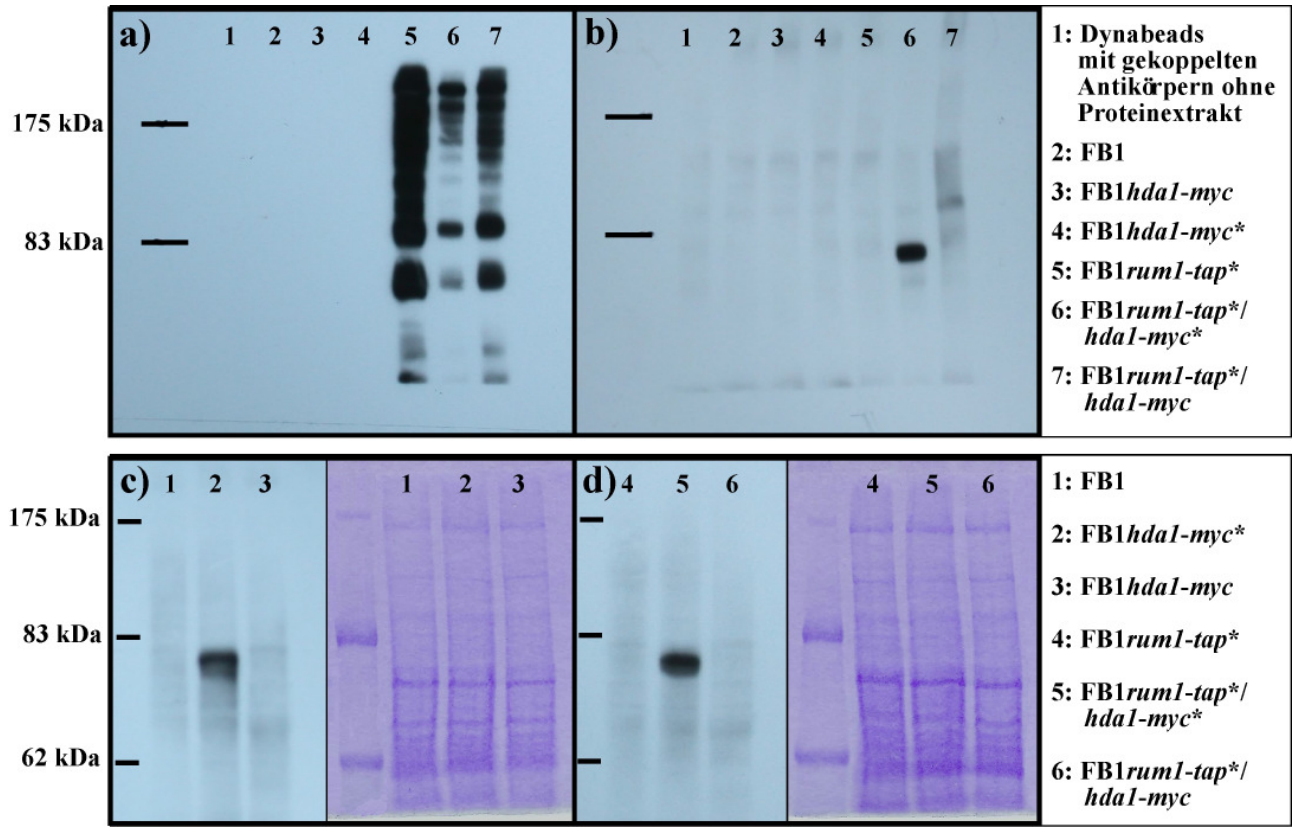

Abbildung 30: Nachweis von Rum1 und Hda1 nach Koimmunpräzipitation sowie Mengenvergleich von Hda1-Myc und Hda1-Myc* in den Ausgangsproben. a) Nachweis von Rum1-TAP* nach Immunpräzipitation. Nach Immunpräzipitation wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert und ein spezifischer Nachweis des TAP*-markierten Rum1 mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Peroxidase-Antikörpern durchgeführt. Ausschließlich bei Stämmen, die das Rum1-TAP*-Konstrukt enthielten, wurden Banden detektiert (Proben-Nummern 5, 6 und 7). Außer dem Rum1-Volllängenprotein waren Rum1-Fragmente nachweisbar, die das TAP*-Epitop enthielten. Eine Kreuzreaktionen mit anderen *U. maydis*-Proteinen und den an die Dynabeads gekoppelten Antikörpern kann ausgeschlossen werden, da weder bei den Negativkontrollen (Proben-Nummern 1 und 2), noch bei Stämmen, die das Rum1-TAP*-Konstrukt nicht exprimierten (Proben-Nummern 3 und 4), Banden detektiert wurden. **b) Nachweis von Hda1 nach Koimmunpräzipitation.** Nach Koimmunpräzipitation wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert und ein spezifischer Nachweis der Myc*-markierten Hda1 mit Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt. Nur bei FB1*rum1-tap*/hda1-myc** war eine Bande auf der erwarteten Höhe von etwa 66 kDa detektierbar (Proben-Nummern 6). **c) und d) Mengenvergleich von Hda1-Myc und Hda1-Myc* in Proteinextrakten, die für die Koimmunpräzipitation verwendet wurden.** Ausgangsproteinextrakte für die Koimmunpräzipitation wurden einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford unterzogen, jeweils 100 µg über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert und ein spezifischer Nachweis der Hda1 mittels Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt. Zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen diente jeweils ein zweites Gel, das mit gleichen Probenvolumina bestückt und nach Coomassie gefärbt wurde. Nur bei Stämmen, die das Hda1-Myc*-Konstrukt enthielten, war eine distikte Bande bei etwa 66 kDa detektierbar (Proben-Nummern 2 und 5).

Aufgrund der Ergebnisse kann von einer physikalischen Interaktion zwischen Rum1 und Hda1 *in vivo* ausgegangen werden. Über welchen Bereich von Rum1 die Interaktion erfolgt, ebenso wie die Frage, ob die detektierte Interaktion direkter Natur ist oder über Linkerproteine vermittelt wird, kann mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht beantwortet werden.

3 Diskussion

Rum1 besitzt konservierte Domänen, die in ähnlicher Form und Anordnung auch in Proteinen anderer Organismen zu finden sind. Darunter befinden sich Pilze wie z.B. *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Giberella zeae* und *Magnaporthe grisea*, aber auch *Homo sapiens* und *Mus musculus*. Während Rum1-ähnliche Proteine in pilzlichen Organismen meist auf Basis von DNA-Annotationen gefunden und nicht weiter untersucht wurden, sind einige Säugetierproteine bereits gut charakterisiert. Zu diesen zählen RBP2 (Defeo-Jones *et al*., 1991; Fattaey *et al*., 1993), XE169 (Wu *et al*., 1994a; Wu *et al*., 1994b), und PLU-1 (Lu *et al*., 1999), welche ebenso wie Rum1 eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation im jeweiligen Organismus spielen und wichtige Aufgaben während bestimmter Entwicklungsphasen übernehmen.

Sowohl *rum1*- als auch *hda1*-defiziente Stämme weisen eine Sporogeneseblockade sowie eine Expression b-regulierter Gene in betroffenen Sporidien auf. Weiterhin zeigten Gelfiltrations-experimente, dass Hda1 Bestandteil eines etwa 2 MDa großen Multiproteinkomplexes ist (Reichmann *et al*., 2002; Reichmann, 2002). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, Hda1 und Rum1 könnten in einem gemeinsamen Repressorkomplex vorliegen, dessen DNA-Bindung durch die ARID-Domäne von Rum1 vermittelt wird. Eine Interaktion von Rum1 mit Hda1 und/oder anderen Proteinen des Komplexes wäre über die PHD-Domänen des Rum1-Proteins möglich und eine Repression entsprechender Zielgene könnte laut dieser Hypothese durch eine Histon-deacetylierung mittels Hda1 erfolgen.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Rum1-Proteins in Hinblick auf die Notwendigkeit bestimmter konservierter Domänen. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob eine physikalische Interaktion von Rum1 und Hda1 vorliegt und damit die Möglichkeit besteht, dass beide Proteine eine funktionelle Einheit innerhalb eines Multiproteinkomplexes darstellen. Die Hypothese, der putative Rum1-Hda1-Repressorkomplex könnte als Antagonist des b-Heterodimers wirken sollte anhand von Transkriptom-Analysen untersucht werden.

3.1 Auswirkungen der Domänendeletionen auf die Funktionalität des Rum1-Proteins

Die in Rum1 postulierten Domänen wurden in verschiedenen Proteinen anderer Spezies auf ihre Funktion hin untersucht. ARID-Domänen sind in der Lage, eine DNA-Bindung zu vermitteln (Gregory *et al*., 1996; Herrscher *et al.*, 1995; Yuan *et al*., 1998), und PHD-Domänen konnten in der Vergangenheit als Protein-Interaktionsdomänen identifiziert werden (Aasland *et al*., 1995; Fair *et al*., 2001; O´Connell *et al.*, 2001; Schultz *et al*., 2001), wobei auch Histondeacetylasen als Interaktionspartner gefunden wurden (Deplus *et al*., 2002; Iwase *et al.*, 2004; Tong *et al*., 1998; Zhang *et al*., 1998). JmjC-Domänen verschiedener Proteine weisen unterschiedliche Funktionen auf. Im humanen PLU-1 und EPE1 aus *S. pombe* vermitteln die JmjC-Domänen eine Proteininteraktion (Tan *et al*., 2003; Zofall *et al*., 2006). In Proteinen der JHDM-Gruppe hingegen (JHDM2A (Yamane *et al*., 2006), JHDM1A und JHDM1B (Tsukada *et al*., 2006) und JHDM3 (Cloos *et al*., 2006; Fodor *et al*., 2006; Klose *et al.*, 2006b; Whetstine *et al*., 2006)), besitzen sie die enzymatische Aktivität einer Histondemethylase.

3.1.1 Die ARID-Domäne ist für die Funktionalität des Rum1-Proteins entbehrlich

Da Deletionen von *rum1* und *hda1* zur Expression b-abhängiger Gene in der saprophytischen Lebensphase des Pilzes führt, wurde spekuliert, der putative Rum1-Hda1-Komplex könnte ein Antagonist des b-Heterodimers sein, wobei die ARID-Domäne mit der Homeodomäne um DNA-Bindungsstellen konkurrieren könnte (Reichmann *et al.*, 2002; Quadbeck-Seeger *et al*., 2000). Dies schien denkbar, da in der Vergangenheit eine Bindung des ARID-Domänenproteins Dead ringer aus *Drosophila melanogaster* an die Konsensussequenz des Homeodomänenproteins Antennapedia nachgewiesen wurde (Gregory *et al*., 1996) und das Homeodomänenprotein Cux/CDP einer DNA-Bindung des murinen ARID-Domänenproteins Bright an den intronischen Enhancer des Gens der schweren Immunglobulinkette entgegenwirkt (Wang *et al*., 1999).

Enstprechend der aufgestellten Hypothese sollte eine Deletion der putativen DNA-Bindedomäne von Rum1 zu einem Phänotyp führen, der dem von *rum1*-Deletionsstämmen gleicht. Auf funktioneller Ebene zeigt die Deletion der ARID-Domäne jedoch keinen Phänotyp.

Bislang wurden in der Literatur lediglich zwei Proteine beschrieben, in denen die ARID-Domäne für deren physiologische Funktion essentiell ist. Dabei handelt es sich um Dead ringer und Bright (Nixon *et al*., 2004; Patsialou *et al*., 2005; Shandala *et al*., 2002), die nachweislich an DNA-Sequenzen binden, die gleichfalls als Bindestellen für Homeodomänenproteine dienen (Gregory *et*

al., 1996; Wang *et al*., 1999). In anderen Proteinen konnte eine essentielle Funktion der ARID-Domäne nicht nachgewiesen werden und bei SWI1, einer Komponente des Chromatin-remodelling-Komplexes SWI-SNF in *S. cerevisiae*, stellte sich heraus, dass die ARID-Domäne für die Komplementation des SWI1-Deletions-Phänotyps entbehrlich ist (Prochasson *et al*., 2003; Wilsker *et al.*, 2004).

Durch eine vergleichende Transkriptomanalyse war es möglich, 14 deregulierte Gene in FB1*rum1*ΔARID zu identifizieren. Dieses Ergebnis scheint jedoch ein Artefakt der DNA-Microarray-Analyse zu sein. Vergleichende Analysen der DNA-Microarray-Daten von Wildtypstämmen hatten gezeigt, dass vielfach Expressionsunterschiede einzelner Gene, die jedoch nur einen verschwindend geringen Anteil aller *U. maydis*-Gene darstellen, vorliegen (M. Scherer, pers. Mitteilung). Gene, deren Expressionswerte in biologischen Replikaten der Wildtypstämme häufig voneinander abweichen, konnten auch unter den in FB1*rum1*ΔARID deregulierten Genen wiedergefunden werden (M. Scherer, pers. Mitteilung).

Da jedoch nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei der Deregulation der 14 Gene um ein Artefakt handelt, wurden die Promotorbereiche der in FB1*rum1*ΔARID induzierten Gene einer bioinformatische Suche nach Motiven unterzogen, die einer Bindung der ARID-Domäne dienen könnten. Unter den insgesamt sechs identifizierten Motiven befinden sich lediglich zwei, die in mehr als 50 % der untersuchten Promotoren existent sind. Weiterhin zeigte keines der identifizierten Motive eine Ähnlichkeit zur Konsensus-Sequenz der b-Bindestelle in Promotoren der Klasse I-Gene *frb52*, *lga2* und *dik6* (Brachmann, 2001a). Eine DNA-Bindung der ARID-Domäne von Rum1 an definierte Sequenzmotive scheint daher unwahrscheinlich, zumal Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt hatten, dass die Mehrheit der ARID-Domänen-Proteine (darunter auch die Rum1-ähnlichen Proteine RBP2, PLU-1 und XE169) ohne erkennbare Sequenzspezifität an DNA bindet. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen nicht darauf hin, dass eine DNA-Bindung des Rum1-Hda1-Komplexes über die ARID-Domäne von Rum1 erfolgt um eine Transkriptionsrepression entsprechender Zielgene zu induzieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Deletion der ARID-Domäne zu einer nur minimalen Funktionseinschränkung des Rum1-Proteins führte, welche auf transkriptioneller Ebene kaum ins Gewicht fiel und in Hinblick auf die Entwicklung des Pilzes keine Relevanz hatte. Ähnlich wie bei SWI-SNF in *S. cerevisiae* scheint die ARID-Domäne für die Funktion des Rum1-Proteins entbehrlich zu sein und die Hypothese, Rum1 könnte die Aufgabe eines essentiellen DNA-Bindeproteins im putativen Repressorkomplex übernehmen, konnte nicht bestätigt werden. Es kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die ARID-Domäne eine DNA-Binde-

aktivität aufweist, die für eine Transkriptionsregulation der 14 Gene benötigt wird, deren Expression für die Sporulation jedoch nicht essentiell scheint.

3.1.2 Die PHD-Domänen sind für die Funktion des Rum1-Proteins entbehrlich

Stämme, in denen die erste oder dritte PHD-Domäne deletiert war, verhielten sich auf funktioneller Ebene wie Wildtypstämme. FB1mut.PHD2 hingegen sekretierte Endoglukanase, und in Northern-Analysen wurden geringe Transkriptmengen der Gene *egl1*, *rep1*, *frb52*, *lga2* und *b* nachgewiesen. Auf funktioneller Ebene zeigte jedoch keine der Deletions- bzw. Mutationsstämme einen von Wildtypstämmen abweichenden Phänotyp. Interessanterweise unterschied sich der Phänotyp von FB1ΔPHD1mut.PHD2ΔPHD3 nicht von dem der Stämme bei denen nur einzelne PHD-Domänen deletiert bzw. mutiert waren. Die in Rum1 vorliegenden PHD-Domänen scheinen somit nicht essentiell für die Funktion des Rum1-Proteins zu sein.

In einigen Repressorkomplexen stellt die Interaktion von PHD-Domänen mit HDACs einen wichtigen Mechanismus zur Vermittlung einer Transkriptionsrepression dar (Deplus *et al.*, 2002; Iwase *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Mi2ß, eine Komponente des humanen NuRD-Komplexes mit ATP-abhängiger Nukleosomen-Remodellierungsaktivität, weist beispielsweise eine für die Interaktion mit HDAC1 essentielle PHD-Domäne auf. Aber auch die PHD-Domäne des humanen BHC80, einer Komponente des BHC-Komplex (BRAF-HDAC-complex), ist aufgrund ihrer Interaktion mit HDAC1 und HDAC2 unentbehrlich für eine Transkriptionsrepression (Iwase *et al.*, 2004). Die beiden Transkriptionsrepressoren MSC1 in *S. pombe* und JMJD2A in *H. sapiens* hingegen, welche eine zu RBP2 ähnliche Domänenstruktur aufweisen, enthalten zwar PHD-Domänen, die für eine Assoziation mit HDAC-Aktivität wichtig sind (Ahmed *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2005), eine direkte Interaktion zwischen PHD-Domäne und Histondeacetylase konnte jedoch nicht gezeigt werden.

In *U. maydis* sind die PHD-Domänen des Rum1-Proteins für dessen Repressorfunktion entbehrlich. Eine Integration von Hda1 in den putativen Rum1-Hda1-Komplex müsste demnach über einen anderen Mechanismus erfolgen. Denkbar wäre ein zu SIN3-Komplexen analoges System: Das in nahezu allen Eukaryoten konservierte SIN3-Protein weist weder eine intrinsische Enzymfunktion, noch eine DNA-Bindeaktivität auf. Durch seine multiplen Interaktionsdomänen bildet es ein Grundgerüst für den Aufbau unterschiedlicher, enzymatisch aktiver Komplexe, die eine Transkriptionsregulation vermitteln (Silverstein und Ekwall, 2005). Der SIN3-Kernkomplex enthält abgesehen von SIN3 sieben Proteine, die der Stabilisierung des Komplexes dienen (SAP18, SAP30, SDS3), eine Interaktion mit Kernhistonen vermitteln (RbAp46 und RbAp48) oder aber als Histondeacetylase

(HDAC1 und HDAC2) wirken (Hassig *et al.*, 1997; Laherty *et al.*, 1997; Verreault *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1997). Eine Bindung an entsprechende Promotorregionen wird durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren (z.B. UME6 in *S. cerevisiae*) gewährleistet (Kadosh und Struhl, 1997; Silverstein *et al.*, 2005; Suka *et al.*, 1998; van Ingen *et al.*, 2004; Washburn und Esposito, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Weitere Protein-Interaktionen ermöglichen eine Funktionserweiterung, die zur Entstehung von Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung und Wirkung führt (Silverstein *et al.*, 2005).

Das *U. maydis*-Protein um02706 weist eine 45 %ige Identität zu SIN3 in Hefe auf. Zwar kann über die Funktion von um02706 in *U. maydis* nur spekuliert werden, es wäre jedoch möglich, dass es eine indirekte Interaktion zwischen Rum1 und Hda1 vermittelt, zumal Interaktionen zwischen SIN3-enthaltenden Komplexen mit JmjC-Domänen enthaltenden Histondemethylasen (JHDM-Gruppe) beschrieben wurden (Yang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005).

Bei den hier vorliegenden Ergebnissen muss in Betracht gezogen werden, dass PFAM ein weiteres Zinkfingermotiv in Rum1 vorhersagt. Dabei handelt es sich um einen Zinkfinger des C5HC2-Typs, der direkt hinter der JmjC-Domäne lokalisiert ist. Eine Interaktion dieses Motivs mit Hda1 und/oder anderen Komponenten des putativen Repressorkomplexes kann nicht ausgeschlossen werden. Neuere Untersuchungen ergaben, dass eine Reihe unterschiedlicher Mutationen in XE169, welches bei Säugetieren vom inaktiven X-Chromosom exprimiert wird und vermutlich eine Rolle bei der X-Inaktivierung spielt (Agulnik *et al.*, 1994), zu einer X-chromosomal gekoppelten, geistigen Retardierung bei betroffenen Personen führt (Jensen *et al.*, 2005). Unter den entsprechenden Mutationen befinden sich sowohl Missense- als auch Nonsense-Mutationen, wobei eine der Missense-Mutationen im C5HC2-Zinkfinger lokalisiert ist. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass der in Rum1 vorhandene C5HC2-Zinkfinger ebenfalls eine Funktion inne hat.

3.1.3 Die JmjC-Domäne ist essentiell für die Funktionalität von Rum1

JmjC-Domänendeletionsstämme weisen sowohl auf transkriptioneller (Northern-Analysen) als auch auf funktioneller Ebene (CMC-Test, Pflanzeninfektion, Sporenausstriche) einen Phänotyp auf, der dem von *rum1*-Deletionsstämmen gleicht. Lange Zeit konnte über die Funktion von JmjC-Domänen nur spekuliert werden. Im Jahre 2003 gelang erstmals eine auf experimentellen Daten begründete Funktionszuordnung einer JmjC-Domäne (Tan *et al.*, 2003). Die JmjC-Domäne des humanen PLU-1 vermittelt eine Interaktion mit den entwicklungsspezifischen, synergistisch mit PLU-1 wirkenden Transkriptionsrepressoren PAX9 (Neubüser *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1998) und BF-1 (Huh *et al.*, 1999). Die durch Tan *et al.* erhobenen Daten lassen jedoch keine Aussage darüber zu, ob das JmjC-

Motiv für die Fuktionalität von PLU-1 essentiell ist. Für EPE1 aus *S. pombe* ist die JmjC-Domäne nachweislich essentiell. EPE1 wirkt als SWI6-abhängiger Modulator des Heterochromatins transkriptionellem Silencing entgegen (Ayoub *et al*., 2003; Zofall *et al*., 2006). Die JmjC-Domäne von EPE1 ist für eine Interaktion mit SWI6 und damit für die Funktionalität des Proteins unentbehrlich (Zofall *et al*., 2006).

Untersuchungen von JmjC-Domänen in *U. maydis* zeigten Folgendes:

1. Die JmjC-Domäne von Rum1 ist in der Lage eine Proteininteraktion zu vermitteln.

   In einem Hefe-Zweihybrid-Ansatz, bei dem die JmjC-Domäne aus Rum1 als "Köder" diente, konnten mehrere potentielle Interaktionspartner identifiziert werden (Papenfort, 2005). Bei einem der Interaktionspartner (um02866) handelt es sich um einen b-ZIP (basic leucine zipper)-Transkriptionsfaktor (Ellenberger *et al*., 1994; Harrison, 1991; Hurst, 1995), von dem angenommen wurde, er könnte eine Bindung von Rum1 an spezifische Protmotoren vermitteln. Deletionsstämme des als *zip1* benannten Gens zeigten jedoch einen von *rum1*- und *hda1*-defizienten Stämmen abweichenden Phänotyp.

2. Eine Überexpression der JmjC-Domäne aus Rum1 führt zu einem Phänotyp, der dem von Δ*rum1*-Stämmen ähnelt.

   Eine Überexpression der JmjC-Domäne aus Rum1 führt zu einem dominant negativen Phänotyp, der sich durch eine Sporogeneseblockade, Endoglukanasesekretion und morphologische Veränderungen der Sporidien auszeichnet (Papenfort, 2005).

3. Die Deletion von *str1*, das für ein JmjC- und JmjN-Domänen enthaltendes Protein kodiert, führt zu einem Phänotyp, der dem von JmjC-Überexpressionsstämmen nahezu gleicht.

   Ein Phänotyp, der sich durch eine Sporogeneseblockade, Endoglukanasesekretion und morphologische Veränderungen der Sporidien auszeichnet, konnte ausser bei JmjC-Überexpressionsstämmen auch bei *str1* (similar to Rum1, um05449)- Deletionsstämmen beobachtet werden (Papenfort, 2005). Str1 ist neben Rum1 das einzige Protein in *U. maydis*, das sowohl eine JmjN- als auch eine JmjC-Domäne besitzt, denn allen weiteren JmjC-Domänenproteinen (um00353, um00499, um00799, um02574, um04522, um05658) fehlt die JmjN-Domäne.

Aufgrund der Daten kann davon ausgegangen werden, dass die JmjC-Domäne von Rum1 in der Lage ist, eine Proteininteraktion zu vermitteln. Eine überlappende Bindespezifität von JmjC-Domänen anderer Proteine ist denkbar, zumal JmjC-Überexpressionsstämme und *str1*-Deletionsstämme nahezu den gleichen Phänotyp aufweisen. Es wurde spekuliert, dass über die JmjC-Domäne sowohl Str1 als auch Rum1 mit Zip1 interagieren, die Rum1- und Str1-abhängigen Zielgene sich jedoch unterscheiden (Papenfort, 2005). Da *rum1*- und *str1*-Deletionsmutanten, nicht aber Δ*zip1*-Stämme in der Sporogenese inhibiert sind, muss jedoch davon ausgegangen werden, dass eine mögliche Interaktion mit dem Zip1-Protein weder für die Funktion von Rum1 noch für die von Str1 essentiell ist.

Alternativ wäre eine zusätzliche Funktion der JmjC-Domäne in Rum1 denkbar. In jüngster Vergangenheit konnte den humanen JmjC-Domänenproteinen JHDM1A und JMJD2A eine Histondemethylaseaktivität nachgewiesen werden, die von der Präsenz und Funktionalität der JmjC-Domäne abhängig ist (Chen *et al*., 2006; Tsukada *et al*., 2006). Die JmjC-Domänen verschiedener Enzyme (darunter auch JMJD2A) weisen hoch konservierte Aminosäuren auf, die einer Bindung der Kofaktoren Fe(II) und αKG dienen (Dann *et al.*, 2002; Elkins *et al*., 2003; Lee *et al*., 2003; Chen *et al.*, 2006). Als strukturgebende Komponente für den Aufbau des aktiven Zentrums ist die Kofaktorbindung und damit auch die Konservierung der Kofaktor-bindenden Aminosäuren Voraussetzung für die enzymatische Aktivität der Proteine. Auch in der JmjC-Domäne von Rum1 sind die entsprechenden Aminosäuren konserviert, was die Möglichkeit einer Histondemethylase-aktivität impliziert.

3.2 Rum1 und Hda1: Regulatoren eines überlappenden Gensets in der saprophytischen Lebensphase von *U. maydis*.

Sowohl *rum1*- als auch *hda1*-defiziente Stämme weisen im Vergleich zu Wildtypstämmen eine beträchtliche Anzahl differenziell exprimierter Gene auf. Bislang liegen keine Daten darüber vor, wie groß der Anteil direkt durch Rum1 und/oder Hda1 regulierter Gene ist; es ist jedoch anzunehmen, dass die Deregulation vieler Gene auf indirekte Effekte zurückzuführen ist. Ein Vergleich deregulierter Gene von *hda1*- und *rum1*-Deletionsstämmen zeigt eine starke Überlappung der Datensätze. Bei 57 % der in *rum1*-Deletionsstämmen differenziell exprimierten Gene konnte eine Koregulation in *hda1*-Deletionsstämmen festgestellt werden, was als starker Hinweis auf eine gemeinsame oder zumindest überlappende regulatorische Funktion von Rum1 und Hda1, eventuell als Komponenten eines gemeinsamen Multiproteinkomplexes, gewertet werden kann.

Beide Deletionsstämme weisen einen vergleichsweise hohen Anteil induzierter Gene auf, was die Repressorfunktion von Rum1 und Hda1 widerspiegelt. In FB1Δ*rum1* sind 91 % (260 von 286) und in FB1Δ*hda1* 75 % (365 von 486) aller deregulierten Gene induziert, wobei fast 62 % dieser Gene eine Koregulation in beiden Stämmen aufweisen. Sowohl *rum1*- als auch *hda1*-Deletionsstämme sind in einem distinkten Stadium der Sporogenese blockiert (Quadbeck-Seeger *et al.*, 2000; Reichmann *et al*., 2002). Daher lag die Vermutung nahe, unter den koregulierten Genen könnten sich solche befinden, die eine für die Sporulation essentielle Funktion inne haben. Im Rahmen einer von Chu *et al*. durchgeführten DNA-Microarray-Studie konnten 480 Gene identifiziert werden, die während der Sporulation in *S. cerevisiae* induziert wurden, sowie 600 Gene, bei denen eine Transkriptionsrepression vorlag (Chu *et al.*, 1998). In der Hoffnung, Gene identifizieren zu können, die sowohl bei *U. maydis* als auch in Hefe sporulationsspezifisch reguliert werden, wurde ein Vergleich des durch Chu *et al.* erhobenen Datensatzes mit den Hefehomologen der Rum1-Hda1-koregulierten Gene vorgenommen. Erstaunlicherweise konnten unter den Hefehomologen der Rum1-Hda1-koregulierten Gene keine sporulationsspezifisch regulierten *S. cerevisiae*-Gene gefunden werden. Dabei muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass Proteine, die in unterschiedlichen Organismen gleiche Funktionen erfüllen, nicht zwingend eine signifikante Ähnlichkeit über die gesamte DNA- und/oder Aminosäure-Länge aufweisen müssen, und für 72 % der Rum1-Hda1-koregulierten Gene keine Hefehomologen identifiziert wurden.

Weiterhin konnte eine nicht unerhebliche Anzahl von Genen identifiziert werden, die nur in jeweils einem der beiden Deletionsstämme differenziell exprimiert waren. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass Hda1 und/oder Rum1 außer in dem postulierten Rum1-Hda1-Repressorkomplex weitere, voneinander abgekoppelte Funktionen erfüllen und damit auch die Expression eines voneinander unabhängigen Gensets beeinflussen. Eine Klassifizierung der in beiden Stämmen nicht koregulierten Gene mit dem Programm FunCatDB konnte keinen Aufschluss darüber geben, ob distinkte zelluläre Funktionsbereiche betroffen sind, denn eine Tendenz zur Häufung funktioneller Kategorien lag nicht vor. Eine Abgrenzung voneinander getrennter Funktionsfelder für Rum1 und Hda1 aufgrund dieser Daten war daher nicht möglich.

In der saprophytischen Lebensphase von *U. maydis* wird der Phänotyp von *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen lediglich auf transkriptioneller Ebene evident. Keiner der beiden Stämme weist morphologische Veränderungen der Sporidien auf, noch liegt eine Wachstumsinhibition vor. Somit kann ausschließlich die differenzielle Expression von *egl1*, die durch den CMC-Plattentest nachgewiesen werden kann, mit den Phänotypen beider Stämme korreliert werden.

3.3 Der Rum1-Hda1-Komplex: Ausschließlich Repressor oder auch Aktivator entwicklungsspezifischer Gene?

Haploide Δ*rum1*-Stämme weisen keinen offensichtlichen Phänotyp auf. Da die Bedeutung von Rum1 erst während der biotrophen Lebensphase des Pilzes evident wird, besteht die Möglichkeit, dass eine Deregulation sporulationsspezifisch wichtiger Gene erst im pathogenen Entwicklungsstadium von *U. maydis* zum Tragen kommt.

Bislang wurden Transkriptiomanalysen von *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen lediglich in der saprophytischen Lebensphase von *U. maydis* durchgeführt. DNA-Microarray-Analysen von Tumorgewebe beider Stämme könnten Aufschluss darüber geben, ob das in der biotrophen Lebensphase durch Rum1 und/oder Hda1 regulierte Genset dem aus der saprophytischen Lebensphase gleicht. Anhand dieser Daten wäre es möglich, die Funktionen von Rum1 und Hda1 in beiden Lebensphasen zu vergleichen, was wiederum Rückschlüsse darauf zulassen würde, ob eine Funktionsmodulation von Rum1 und/oder Hda1 in distinkten Entwicklungsstadien von *U. maydis* vorliegt. Untersuchungen der letzten Jahre konnten belegen, dass RBP2 sowohl Aktivator- als auch Repressorfunktionen aufweist. Zum einen konnten Chan und Hong zeigen, dass RBP2 die Transaktivierung von nukleären Hormonrezeptoren verstärkt (Chan und Hong, 2001), und zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass freies, nicht an pRB gebundenes RBP2 als Differenzierungsinhibitor wirkt (Benevolenskaya *et al*., 2005). In einem Modell von Benevolenskaya *et al*. bindet RBP2 aufgrund von Differenzierungssignalen an pRB, was zu einer Funktionsmodulation von RBP2 führt. RBP2 ist nicht länger ein Differenzierungsinhibitor, sondern ein Differenzierungsaktivator. Es wurde spekuliert, dass die Expression direkter Zielgene von RBP2 für eine Differenzierung benötigt wird und freies RBP2 und pRB-RBP2-Komplexe einen antagonistischen Effekt in Bezug auf Aktivierung und Inhibition haben könnten: Liegen pRB und RBP2 in einem Komplex vor, so verhindert pRb eine Genrepression durch RBP2 (Benevolenskaya *et al*., 2005; Gutierrez *et al*., 2005).

Zwar gibt es in *U. maydis* kein homologes Protein zum humanen pRb, doch auch für die Histondeacetylase RPD3 aus *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass diese unter bestimmten Voraussetzungen nicht nur reprimierende, sondern auch induzierende Funktion besitzt. Unter osmotischem Stress und Hitzeschock nimmt RPD3 die Funktion eines Genaktivators ein, wobei die Histondeacetylaseaktivität für die Aktivatorfunktion benötigt wird (De Nadal *et al.*, 2004). Das impliziert eine Funktionsänderung von HDACs aufgrund bestimmter Signale. Histondeacetylasen scheinen zwar auf globaler Ebene die Funktion von Repressoren zu übernehmen (Robyr *et al.*, 2002), doch gibt es viele Beispiele, bei denen eine Verminderung der Histonacetylierung in Zusammenhang mit einer Transkriptionsinduktion von Genen gebracht werden kann (Bernstein *et al*., 2000; Deckert und

Struhl, 2001; Wang *et al*., 2002). Die Wirkung einer Histondeacetylierung durch RPD3 scheint somit nicht auf die Änderung der Chromatinstruktur beschränkt zu sein, sondern könnte (z.B. aufgrund bestimmter Signale) auch spezielle Bindestellen oder Erkennungssignale für die Rekrutierung von Aktivatoren generieren (Berger, 2002; Dyson *et al.*, 2001; Fischle *et al*., 2003; Kurdistani und Grunstein, 2003; Loyola und Almouzni, 2004; Strahl und Allis, 2000; Yang, 2004; Zeng und Zhou, 2002). Ein ähnlicher Mechanismus scheint auch der Transkriptionsregulation durch Histonmethylierung und -demethylierung zu Grunde zu liegen: Die Generierung von Erkennungssignalen, kodiert durch Methylierungslokalisation und -status, ermöglicht die Bindung spezifischer Proteine an definierte Chromatinbereiche, die infolgedessen ihre Funktion auf das umgebende Chromatin ausüben (Bannister *et al*., 2001; Lachner *et al*., 2001; Wysocka *et al*., 2006).

In der saprophytischen Lebensphase von *U. maydis* sind Rum1 und Hda1 vornehmlich, aber nicht ausschließlich, Repressoren eines spezifischen Gensets, denn bei *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen sind 9 % bzw. 33 % der deregulierten Gene reprimiert. Diese Beobachtung demonstriert, dass Rum1 und Hda1 das Potential besitzen, die Transkription bestimmter Gene zu induzieren. Allerdings muss dabei in Betracht gezogen werden, dass anhand der Daten keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Regulation dieser Gene auf einen direkten oder indirekten Effekt zurückzuführen ist.

Denkbar wäre, dass auch der Rum1-Hda1-Komplex eine von seiner Repressorfunktion zeitlich abgekoppelte Aktivatorfunktion besitzt, die seine Ausprägung erst in der biotrophen Lebensphase des Pilzes erlangt. Durch Fusion zweier kompatibler Sporidien, Aktivierung des b-Heterodimers, Penetration der Pflanze, Induktion von Tumorgewebe und Karyogamie wirken viele Signale auf den Pilz ein, die zur Differenzierung und schließlich zur Generierung von Sporenmaterial führen. Einige dieser Signale könnten auch für die Induktion einer Transkriptionsaktivatorfunktion von Rum1 und/oder Hda1 verantwortlich sein.

Sollten DNA-Microarray-Analysen von Tumorgewebe der *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämme jedoch zeigen, dass die beiden Proteine auch in der biotrophen Lebensphase des Pilzes die Funktion von Repressoren übernehmen, wären zwei unterschiedliche Szenarien denkbar: Zum einen könnten Rum1 und Hda1 die Repression von Repressoren sporulationsspezifischer Gene vermitteln, was letztendlich die Expression eben dieser Gene während der entsprechenden Entwicklungsphase des Pilzes ermöglichen würde. Zum anderen bestünde die Möglichkeit einer Repression von Genen, die in der Entwicklung vor der Sporulation benötigt werden. Ein Austritt aus dieser Lebensphase würde dadurch ermöglicht und die Sporulation könnte eingeleitet werden.

3.4 Expressionsregulation von Genclustern durch Rum1 und/oder Hda1

Viele der durch Rum1 und/oder Hda1 regulierten Gene liegen in unmittelbarer Nähe zueinander. Die über das ganze Genom verteilten Gengruppen wurden als Cluster definiert, wenn die daran beteiligten Gene nicht weiter als 10.000 bp voneinander entfernt lagen. Auf diese Weise konnten 21 Gencluster identifiziert werden, die durch Rum1 und/oder Hda1 reguliert wurden.

Neuere Untersuchungen zeigten, dass im Genom von *U. maydis* ein Teil der Gene, die für putativ sekretierte Proteine kodieren, in zwölf Clustern organisiert sind (in dieser Arbeit als Sekretions-Cluster bezeichnet). Die Expression der Mehrzahl dieser Gene ist in Tumorgewebe induziert (Kämper *et al*., 2006). Untersuchungen von Cluster-Deletionsstämmen zeigten, dass einige Sekretions-Cluster offensichtlich eine wichtige Rolle während der pathogenen Entwicklung des Pilzes spielen (Kämper *et al*., 2006). Es wäre somit möglich, dass, analog zu den Pathogenitätsinseln bei Bakterien, in *U. maydis* "biotrophe Cluster" existieren, deren Expression für die pathogene Entwicklung des Pilzes benötigt wird. Einige der durch Rum1 und/oder Hda1 regulierten Cluster zeigen eine vollständige oder partielle Überlappung mit den in Kämper *et al*. beschriebenen Sekretions-Clustern. Die Vermutung liegt somit nahe, dass auch die Rum1 und/oder Hda1-regulierten Gencluster distinkte Funktionen inne haben. Eine Expressionsregulation ganzer Gencluster wäre somit sinnvoll.

Zurzeit existieren zwei gängige Modelle, auf welche Weise eine Deacetylierung der Kernhistone die Expression betroffener Gene beeinflusst (siehe Kapitel 1.5). Geht man von einer, durch Histon-deacetylierung hervorgerufenen, Kondensation des Chromatins als Ursache einer Repression der in diesem Bereich gelegenen Gene aus, könnte man eine Clusterregulierung aufgrund der räumlichen Nähe von Genen postulieren.

Beim dynamischen Modell wird eine Expressionsmodulation nicht auf einen erniedrigten Acetylierungslevel der Histone zurückgeführt, sondern auf die Veränderung des Acetylierungs-musters und/oder -Turnovers im Promotorbereich des betroffenen Gens. Eine Clusterregulierung aufgrund räumlicher Nähe kann durch dieses Modell nicht erklärt werden. Vielfach liegen Gene, die für gleiche Funktionsbereiche benötigt werden, in räumlicher Nähe zueinander. Es wäre daher möglich, dass diese Cluster-bildenden Gengruppen aufgrund ihrer Funktionszugehörigkeit gemeinsam reguliert werden. Eine durch Rum1 und/oder Hda1 vermittelte Regulation eines oder mehrerer Gencluster, deren Gene für die Sporulation benötigt werden, wäre somit denkbar.

Sollte Rum1 eine Histondemethylase-Aktivität aufweisen, wie sie für einige andere JmjC-Domänen-proteine gezeigt wurde, könnte die Überlappung der durch Rum1 und Hda1 regulierten Gencluster

auf eine Kopplung der Histonmodifikationen zurückzuführen sein (siehe Kapitel 1.5), was die Existenz eines Rum1-Hda1-Komplexes jedoch nicht ausschließt.

3.5 In der saprophytischen Lebensphase von *Ustilago maydis* werden nur wenige b-regulierte Gene auch durch Rum1 und/oder Hda1 reguliert.

Ein Vergleich der durch Rum1 und/oder Hda1 regulierten Gene mit den bislang 347 als b-reguliert charakterisierten Genen (M. Scherer, pers. Mitteilung) zeigte, dass weder in *rum1*- noch in *hda1*-Deletionsstämmen eine signifikante Anzahl b-regulierter Gene induziert ist. Lediglich knapp 12 % (41 von 347) bzw. 13 % (45 von 347) aller b-regulierten Gene befinden sich unter den induzierten Genen der *rum1*- bzw. *hda1*-Deletionsstämme. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der Rum1-Hda1-Komplex als globaler Antagonist des b-Heterodimers wirkt.

Eine antagonistische Wirkung auf einzelne b-regulierte Gene kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. 25 b-regulierte Gene konnten identifiziert werden, die sowohl in *rum1*- als auch in *hda1*-Deletionsstämmen induziert sind. Neben elf Genen, die laut der Annotation des MIPS für hypothetische bzw. putative Proteine kodieren, konnten vierzehn weitere identifiziert werden, deren Proteine Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Spezies aufweisen. Darunter befindet sich auch um03067, ein Gen, das für ein zum Translations-Initiationsfaktor CDC33 ähnliches Protein kodiert. um03067 fällt in die funktionelle Kategorie "mitotic cell cycle and cell cycle control", so dass eine Repression durch Rum1 und Hda1 nötig sein könnte, um eine Sporulation einleiten zu können.

Neuere Untersuchungen mit temperatursensitiven bE-Mutanten zeigten, dass ein aktives b-Heterodimer nicht nur für den Eintritt in die biotrophe Lebensphase von *U. maydis* benötigt wird (Bölker *et al.*, 1995; Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995), sondern während der gesamten pathogenen Entwicklung in der Wirtspflanze als essentiell angesehen werden kann (Wahl, 2005). Sollte der Rum1-Hda1-Komplex in der biotrophen und saprophytischen Lebensphase von *U. maydis* die Transkriptionsregulation des gleichen Gensets übernehmen, könnte eine global-antagonistische Wirkung zum b-Heterodimer ausgeschlossen werden. Bislang liegen jedoch keine DNA-Microarray-Daten von Tumorgewebe *rum1*- und *hda1*-defizienter Stämme vor, so dass die durch Rum1 und/oder Hda1 regulierten Gene in der biotrophen Lebensphase von *U. maydis* noch nicht identifiziert werden konnten. Folglich können in dieser Lebensphase für Rum1 und/oder Hda1 weder synergistische noch antagonistische Wirkungen zum b-Heterodimer ausgeschlossen werden.

3.6 Optimierung des *tap*- und des *myc*-Epitops auf die bevorzugte Dikodon-Verwendung von *U. maydis*

Untersuchungen von Stämmen, bei denen eine Fusion des *tap*-Epitops an das 3´-Ende von *rum1* vorgenommen wurde, zeigten, dass eine Komplementation des Δ*rum1*-Phänotyps durch das *rum1-tap*-Fusionskonstrukt nicht möglich ist. *rum1-tap*-Stämme verhielten sich wie *rum1*-Deletionsstämme und TAP-Epitop-marktiertes Rum1-Protein konnte in Western-Analysen nicht detektiert werden.

Ein in *U. maydis* beschriebenes Phänomen ist die suboptimale Expression heterologer Gene aufgrund ineffizienter Kodon- und Dikodon-Benutzung, die infolge einer speziesuntypischen Basenzusammensetzung auftritt. Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Basenzusammensetzung für Transkription und Translantion heterologer Gene eine wichtige Rolle spielt. Die bioinformatische Analyse konservierter ORFs zeigte, dass kodierende Sequenzen in *U. maydis* einen durchschnittlichen GC-Gehalt von knapp 56 % aufweisen (Ladendorf, 2003). Fast alle Kodons weisen somit die maximal mögliche Anzahl an Guaninen und Cytosinen auf. Das nicht optimierte *tap*-Epitop weicht mit einem CG-Gehalt von 42 % deutlich von der durch *U. maydis* bevorzugten Basensequenz ab. Durch Analyse der Kodon- und Dikodonverwendungsfrequenz in *U. maydis* war es bereits möglich, die mobilen genetischen Elemente Tc1A und Mos1A, sowie das Tet-Repressorprotein aus *Escherichia coli* hinsichtlich ihrer Tanskriptions- und Translationsfähigkeit für *U. maydis* zu optimieren (Ladendorf, 2003; Zarnack *et al.*, 2006).

Die Optimierung der *tap*-Epitop-Sequenz auf die bevorzugte Dikodon-Verwendung von *U. maydis* erhöhte den GC-Gehalt von 42 % auf 61 %. Funktions- und Expressionsanalysen von Stämmen, bei denen eine Fusion des optimierten *tap*-Epitops (*tap**) an das 3´-Ende von *rum1* vorliegt, zeigten, dass TAP*-Epitop-markiertes Rum1 in den Zellen exprimiert wird und das Rum1-TAP*-Fusionskonstrukt in der Lage ist, den Δ*rum1*-Phänotyp zu komplementieren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die fehlende Expression des *rum1-tap*-Konstrukts auf einer nicht mit der *U. maydis*-Translationsmaschinerie kompatiblen Basenzusammensetzung der Nukleotidsequenz beruht. Einen weiteren Hinweis auf die Wirksamkeit derartiger Mechanismen liefert die Tatsache, dass *hda1*, welches mit einem optimierten *myc*-Epitop versehen ist (*hda1-myc**), effizienter exprimiert wird als solches, das eine Fusion mit einem nicht optimierten *myc*-Epitop aufweist (*hda1-myc*).

3.7 Rum1 und Hda1 interagieren *in vivo*

Gelfiltrationsexperimente mit nativen Proteinextrakten aus *U. maydis* hatten gezeigt, dass Hda1 offensichtlich Bestandteil eines Multiproteinkomplexes von etwa 2 MDa ist (Reichmann, 2002; Reichmann *et al.*, 2002). Anhand einer Koimmunpräzipitation war es im Rahmen dieser Arbeit erstmals möglich, eine Interaktion von Rum1 und Hda1 *in vivo* nachzuweisen. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der detektierten Interaktion um einen indirekten Effekt handelt, denn eine direkte Wechselwirkung von Hda1 und Rum1 im Hefe-Zweihybrid-System konnte nicht gezeigt werden (Reichmann, 2002).

In Eukaryoten findet man Klasse (I)-Histondeacetylasen, zu denen auch RPD3 in *S. cerevisiae* gehört, vornehmlich in zwei distinkten Multiproteinkomplexen. Sowohl der SIN3- als auch der NuRD-Komplex enthalten die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2, sowie RbAp46 und RbAp48 (ursprünglich als Retinoblastoma (Rb)-assoziierte Proteine beschriebenen) (Ahringer, 2000; Hassig *et al.*, 1997; Taunton *et al.*, 1996; Verreault *et al.*, 1996). Die Assoziation weiterer Faktoren bestimmt die unterschiedlichen Funktionen der Komplexe. Beispielsweise besitzt NuRD im Gegensatz zum SIN3-Komplex eine ATP-abhängige Nukleosomen-Remodellierungsaktivität, die auf Interaktionen mit Proteinen der Mi2/CHD-Familie und DNA-Helikasen der SWI/SNF-Familie zurückzuführen ist (Zhang *et al.*, 1998). Komponenten des SIN3- und NuRD-Komplexes sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet, was einen generellen Mechanismus der Genregulation durch Repressorkomplexe dieser Art vermuten lässt (Ahringer, 2000). Neuere Untersuchungen zeigten, dass auch die JmjC-Domäne-enthaltende Histondemethylase JMJD2A ein fakultativer Bestandteil des mit SIN3 interagierenden Korepressors N-CoR (nuclear receptor corepressor) ist, dessen Funktion es modelliert (Zhang *et al.*, 2005). Man könnte somit spekulieren, dass Hda1 über um02706, ein *U. maydis*-Protein, das eine 45 %ige Identität zu SIN3 in Hefe aufweist, mit Rum1 interagiert um auf diese Weise einen gemeinsamen Repressorkomplex zu bilden.

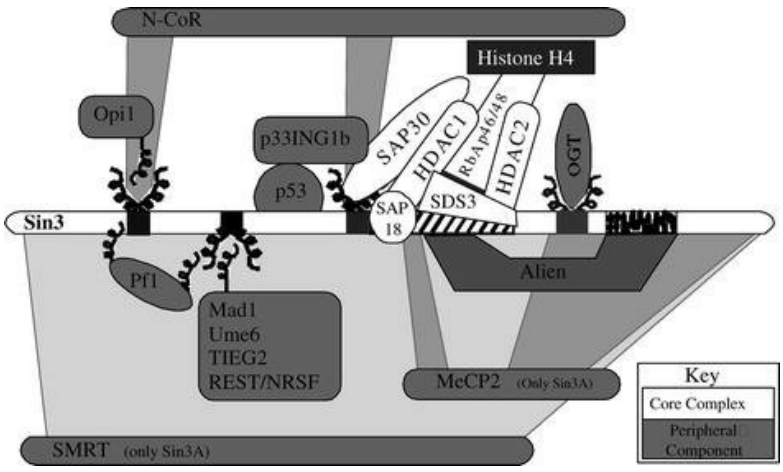

Abbildung 31: Darstellung eines SIN3-enthaltenden Multiproteinkomplexes, der Histondemethylase- und Histondeacetylase-Aktivität kombinieren könnte (Zhang *et al.*, 2005)

3.8 Rum1 und Hda1: Obligatorisches Zusammenwirken in einem gemeinsamen Komplex oder zusätzliche, voneinander getrennte Wirkungsspektren?

Die in *rum1*- und *hda1*-Deletionsstämmen vorliegende Sporogeneseblockade in der Wirtspflanze deutet darauf hin, dass Rum1 und Hda1 neben ihrer überlappenden Repressorfunktion in der saprophytischen Lebensphase auch in der biotrophen Phase von *U. maydis* ein gemeinsames oder zumindest überlappendes Wirkungsspektrum aufweisen.

Die Reifung der Teliosporen setzt eine Reihe distinkter morphologischer Veränderungen voraus. Nach Proliferation der Hyphen im Tumorgewebe beginnen die von amorphem Material umgebenen Filamente sich in gewundene, unregelmäßig geformte Zellen zu fragmentieren (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1994). Bislang konnten drei Gene identifiziert werden, deren Deletion zu einer Entwicklungsblockade nach erfolgreicher Karyogamie führt: *rum1* (Quadbeck-Seeger *et al*., 2000), *hda1* (Reichmann *et al.*, 2002; Reichmann, 2002) und *hgl1* (Dürrenberger *et al*., 2001), das für ein Protein unbekannter Funktion kodiert. Die Anfangsstadien der biotrophen Phase pilzlicher Entwicklung (Zellfusion, Bildung des Dikaryons, Penetration sowie Proliferation in der Pflanze, Tumorinduktion und Karyogamie) sind bei den entsprechenden Deletionsstämmen nicht gestört. Die Fragmentierung der Hyphen, das Abrunden der Zellen und schließlich die Ausreifung dickwandiger, dunkel pigmentierter Sporen ist jedoch arretiert.

RPD3 ist während des vegetativen Wachstums der Hefezellen an der Repression früher meiosespezifischer Gene beteiligt (Dora *et al.*, 1999). Der als Transkriptionsrepressor wirkende RPD3-Komplex wird durch UME6 an Promotorsequenzen sporulationsspezifischer Gene rekrutiert (Kadosh und Struhl, 1997; Kadosh und Struhl, 1998; Rundlett *et al.*, 1998). Die Funktion von RPD3 ist jedoch nicht auf die Repression meiosespezifischer Gene beschränkt. Zusätzlich wird ein von UME6 unabhängiges Genset reguliert, das weitere zelluläre Funktionen betrifft (Fazzio *et al*., 2001; Kurdistani *et al*., 2002; Robyr *et al.*, 2002). Es ist anzunehmen, dass RPD3 durch verschiedene DNA-Bindeproteine an die Promotoren seiner Zielgene gelangt, was die Ausbildung unterschiedlicher Proteinkomplexe voraussetzt (Kurdistani *et al*., 2002). Ein ähnlicher Mechanismus wäre für Hda1 in *U. maydis* denkbar.

Nach bisherigem Kenntnisstand findet bei *U. maydis* eine Karyogamie direkt vor der Ausbildung der sporogenen Hyphen statt. Da in den sporogenen Hyphen jeweils nur ein Kern pro Zelle vorliegt, wird vermutet, dass es sich hierbei um diploide Zellen handelt (Snetselaar und Mims, 1994). Es wird spekuliert, dass die erste meiotische Teilung zwar direkt nach der Karyogamie eingeleitet wird, aber

bereits in einem frühern Stadium (beispielsweise nach der Prophase) arretiert (Reichmann *et al*., 2002; Snetselaar und Mims, 1993a). Die darauf folgenden mitotischen Teilungen resultieren in der Formation großer Areale sporogener Hyphen. Durch die Fragmentierung der Hyphen entstehen sich abrundende Einzelzellen, die im Laufe der Sporogenese dunkel pigmentierte Sporenhüllen ausbilden und zu diploiden Sporen ausreifen. Die beiden meiotischen Teilungen erfolgen während des Auskeimens der Sporen (Holliday, 1961; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1994). Mikroskopische Untersuchungen hatten gezeigt, dass Tumore von *hda1*-Deletionsstämmen nur kleine Bereiche spärlich fragmentierter sporogener Hyphen aufweisen. *rum1*-defiziente Stämme hingegen bilden, ähnlich wie Wildtypstämme, große Areale sporogener Hyphen aus (Reichmann *et al*., 2002; Reichmann, 2002). Diese Beobachtung impliziert die Möglichkeit, dass *hda1*-defiziente Stämme vor, und *rum1*-defiziente Stämme nach den mitotischen Teilungen der sporogenen Hyphen in ihrer Entwicklung blockiert sind. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, wäre die Existenz eines Rum1-unabhängigen Hda1-Komplexes denkbar, der Gene reguliert, die in einem Entwicklungsstadium unmittelbar vor den mitotischen Zellteilungen benötigt werden. Die Ergebnisse der DNA-Microarray-Analysen weisen darauf hin, dass außer Rum1-unabhängigen Hda1-Komplexen auch Hda1-unabhängige Rum1-Komplexe existieren könnten, denn in FB1Δ*rum1* werden 42 % der differenziell exprimierten Gene nicht durch Hda1 reguliert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch Rum1 Bestandteil verschiedener Komplexe ist, deren Zielgenspezifitäten sich unterscheiden.

3.9 Rum1 und RBP2: Funktionen und Spekulationen

Die Tatsache, dass in anderen Spezies Proteine existieren, die in ihrer Domänenarchitektur dem Rum1-Protein aus *U. maydis* stark ähneln, könnte ein Hinweis auf einen konservierten Wirkungsmechanismus solcher Proteine sein. Die für Rum1-Homologe erhobenen Daten könnten somit Hinweise auf Funktion und Wirkungsweise des Rum1-Proteins liefern:

Neuere Untersuchungen zeigten, dass RBP2 an Promotorsequenzen der Gene *brd2* und *brd8* bindet, deren Transkription es induziert (Benevolenskaya *et al*., 2005). Sowohl für BRD2 als auch für BDF1, ein zu BRD2 homologes Protein in *S. cerevisiae*, konnte eine Bindung an acetyliertes Histon H4 nachgewiesen werden (Kanno *et al*., 2004; Ladurner *et al*., 2003; Matangkasombut und Buratowski, 2003; Pamblanco *et al*., 2001). Beide Proteine scheinen Aufgaben im Rahmen der Chromatinumstrukturierung zu übernehmen (Matangkasombut und Buratowski, 2003; Sinha *et al*., 2005). Für BDF1 im Speziellen wird vermutet, dass es durch Histonbindung eine aktive Rolle bei der Erhaltung von Euchromatin spielt und eine Anti-Silencing-Funktion aufweist (Ladurner *et al*., 2003). Interessanterweise konnten Chua und Roeder zeigen, dass BDF1 in *S. cerevisiae* eine essentielle

Funktion während der Meiose und der darauf folgenden Sporulation inne zu haben scheint (Chua und Roeder, 1995).

Sowohl zu BRD2 bzw. BDF1 als auch zu BRD8 existieren ähnliche Proteine in *U. maydis*. um03437 (MUMDB Annotation: related to BDF1-sporulation protein) weist eine 21 %ige bzw. 29 %ige Identität zu BRD2 bzw. BDF1 auf und um00878 (MUMDB Annotation: conserved hypothetical protein) besitzt eine 24 %igen Identität zu BRD8. Eine Überprüfung der erstellten Transkriptionsprofile von FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1* ergab, dass das Gen, des zu BRD2 bzw. BDF1 homologen Proteins, um03437 nicht auf den DNA-Microarrays vorhanden ist und für um00878 (Homologon zu BRD8) keine Deregulation vorliegt. Dabei muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass für die durchgeführten DNA-Microarray-Studien Flüssigkulturen verwendet wurden und somit nur die Situation während der saprophytischen Lebensphase des Pilzes widergespiegelt wird.

Ein Expressionsnachweis von um03437 anhand von Northern-Analysen in *rum1*-Deletionsstämmen und Wildtypstämmen scheint sinnvoll. Liegt eine im Vergleich zu Wildtypstämmen verminderte Expression von um03437 in Δ*rum1*-Stämmen vor, wäre dies ein Hinweis auf eine, sporulationsspezifische Gene betreffende, Aktivatorfunktion von Rum1. Sollte um03437, wie für BDF1 beschrieben, eine essentielle Funktion während der Meiose zukommen, könnte dies, unter der Voraussetzung, dass die erste meiotische Teilung bei *U. maydis* bereits nach der Karyogamie eingeleitet wird (siehe Kapitel 3.8), die Sporogeneseblockade bei *rum1*-Deletionsstämmen erklären.

In einer anderen Studie konnte Rhombotin-2 als Interaktionspartner von RBP2 identifiziert werden (Mao *et al*., 1997a). Bei Rhombotin-2 handelt es sich um einen Transkriptionsregulator, der über seine Interaktion mit RBP2 in der Lage ist, dessen Funktion als Transkriptionsakivator zu verstärken (Mao *et al*., 1997a; Mao *et al*., 1997b). In *U. maydis* existieren zwei Proteine, um10200 und um01663, die jeweils eine 26 %ige Identität zu Rhombotin-2 aufweisen. Interessanterweise konnten Mao *et al*. nachweisen, dass die Proteininteraktion durch die dritte PHD-Domäne in RBP2 mit der zweiten LIM-Domäne in Rhombotin-2 vermittelt wird (Mao *et al*., 1997a). Da sich die PHD-Domänen in Rum1 als entbehrlich erwiesen hatten, ist es unwahrscheinlich, dass eine für die Funktionalität von Rum1 essentielle Interaktion mit um10200 und/oder um01663 vorliegt (vergleiche Kapitel 3.1.2).

3.10 Ausblick

Bisherige Erkenntnisse zeigten, dass der JmjC-Domäne des Rum1-Proteins eine Funktion als Protein-Bindedomäne zukommt. Ob die Vermittlung einer Proteininteraktion die einzige Funktion der JmjC-Domäne in Rum1 ist kann aufgrund der erhobenen Daten nicht beantwortet werden. JmjC-Domänenproteinen in anderen Organismen konnte eine Histondemethylase-Aktivität nachgewiesen werden, die auf der Funktionalität der JmjC-Domäne beruht. Anhand eines in Tsukada *et al*. beschriebenen *in vitro* Histondemethylase-Testverfahrens könnte untersucht werden, ob auch Rum1 eine Histondemethylase-Aktivität aufweist (Tsukada *et al*., 2006).

Um weitere Interaktionspartner von Rum1 bzw. des Rum1-Hda1-Komplexes zu identifizieren, scheint es sinnvoll den Multiproteinkomplex mittels TAP-Tag-Verfahren, unter Verwendung TAP*-Epitop markierten Rum1-Proteins, zu isolieren. Aufgrund der Instabilität des Rum1-Proteins stellen lange Inkubationszeiten ein wesentliches Problem dieser Methode dar. Eine potentielle Möglichkeit die Stabilität des Rum1-Proteins zu erhöhen wäre die Deletion und/oder Mutation der in Rum1 enthaltenen PEST-Sequenzen. Ob diese Modifikationen das Rum1-Protein stabilisieren ohne dabei seine Funktion einzuschränken müsste jedoch erst untersucht werden.

Da die Funktion von Rum1 und Hda1 erst während der Sporogenese evident wird, wäre es weiterhin von Bedeutung einen Einblick in die Genregulationsaufgaben dieser Proteine während der pathogenen Entwicklung des Pilzes zu erlangen. Die Durchführung von DNA-Microarrays mit Tumorgewebe betreffender Deletionsstämme könnte Aufschluß darüber geben, welche Gensets in der biotophen Entwicklungsphase durch Rum1 und/oder Hda1 reguliert werden und ob der Rum1-Hda1-Komplex in dieser Lebensphase von *U. maydis* eine Repressor- und/oder Aktivatorfunktion inne hat.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën, Gerbu, Seakem, Duchefa, Difco, Serva, BioRad, Amersham, Pharmacia, Invitrogen und Carl-Roth bezogen; Einzel-heiten siehe (Brachmann, 2001a; Ladendorf, 2003).

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al*. (1989) hergestellt. Spezielle Lösungen und Puffer sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Medien

Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 121 °C für 5 Minuten autoklaviert.

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde dYT-Flüssig-medium und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al*., 1989). Medienzusätze wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (25 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml). Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet:

$YEPS_L$-Medium (modifiziert nach Tsukuda *et al*., 1988)**:**

10 g Yeast Extract

10 g Pepton

10 g Saccharose

mit H_2O auf 1 l aufgefüllt

PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth

mit H_2O auf 1 l aufgefüllt

CM Vollmedium (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday *et al*., 1974)**:**

1,5 g NH_4NO_3

2,5 g Casamino Acids

0,5 g DNA

1 g Yeast Extract

10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)

62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)

1 ml Spurenelement-Lösung (siehe unten)

20 g Bacto Agar (für Festmedium)

mit H_2O auf 980 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert

nach dem Autoklavieren:

20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f.c. 1 %)

NM Nitrat-Minimalmedium (modifiziert nach Holliday, 1974)**:**

3 g KNO_3

62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)

mit H_2O auf 980 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert

nach dem Autoklavieren:

20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f.c. 1 %)

Array-Minimalmedium (Scherer *et al*., 2006)**:**

30 mM L-Glutamin

62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)

mit H_2O auf 980 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und sterilfiltriert

nach dem Sterilfiltrieren:

20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f.c. 1 %)

Carboxymethylcellulose-Lösung:

40 g Carboxymethylcellulose

Mit H_2O auf 1 l aufgefüllt

CMC-Medium:

5 g Yeast Extract

4 g Pepton

4 g Saccharose

2 % Carboxymethylcellulose

1,5 % BiTec-Agar

Mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Salz-Lösung (Holliday, 1974)**:**

16 g KH_2PO_4

4 g Na_2SO_4

8 g KCl

4 g $MgSO_4$ x 7 H_2O

1,32 g $CaCl_2$ x 2 H_2O

8 ml Spurenelement-Lösung

mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)**:**

60 mg H_3BO_3

140 mg $MnCl_2$ x 4 H_2O

400 mg $ZnCl_2$

40 mg $NaMoO_4$ x 2 H_2O

100 mg $FeCl_3$ x 6 H_2O

40 mg $CuSO_4$ x 5 H_2O

mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)**:**

100 mg Thiamin

50 mg Riboflavin

50 mg Pyridoxin

200 mg Kalziumpantothenat

500 mg p-Aminobenzoesäure

200 mg Nikotinsäure

200 mg Cholinchlorid

1000 mg myo-Inositol

Mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

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

a) Top-Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar

1 M Sorbitol

in $YEPS_L$ -Medium (siehe oben)

b) Bottom-Agar:

wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum.

NSY-Glycerin (Einfriermedium):

8 g Nutrient Broth

1 g Yeast Extrakt

5 g Saccharose

800 ml 87 % (v/v) Glycerin

mit H2O auf 1 l aufgefüllt

Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Hygromycin B (200 µg/ml) und Phleomycin (40 µg/ml). (Im Fall der Selektion mit Phleomycin in Flüssigmedien wurde eine Konzentration von 5 µg/ml verwendet und dem Medium zusätzlich Tris-Cl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt, da ansonsten das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird).

Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von NEB Biolabs, Roche und Pharmacia bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen *Taq* DNA-Polymerase (Laborpräparation), Novozym 234 (Novo Nordisc) und *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene).

Verwendete Kits und sonstiges Material

RNeasy Kit (Quiagen) zur Präparation hochreiner Gesamt-RNA, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETsorb Kit zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (NEB Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, Microspin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden und Microspin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.1.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5´-Ende in Richtung 3´-Ende angegeben.

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Deletion der ARID-Domäne verwendet:

MT-1_080201
CATCCATCTCGCAGTCTCCAT

MT-2_080201
GCACGCGTCTAGTTCTGAGAGGCCCGAGC
Schnittstelleninsertion: *Mlu*I

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Deletion der PHD1-Domäne verwendet:

MT-7_160301
CGATTTGTACCAGCTCAAAC

MT-8_191201
ACCGGTGTCTTGCGCCTGATTGC
Schnittstelleninsertion: *Age*I

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Deletion der PHD3-Domäne verwendet:

MT-5_160301
CAAGGCAAAGCGATTCGAGACG

MT-6_160301
CGCAATTGCGATCGCGGTAAGCACC
Schnittstelleninsertion: *Mfe*I

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Deletion der JmjC-Domäne verwendet:

MT-3_160301
CATCAAGATCACCTCTGGAGGCC

MT-4_191201
AGGCCTGGTCGCGCGAATACAGACTCAAGG
Schnittstelleninsertion: *Stu*I

Folgende Oligonukleotide wurden zur Optimierung des C-terminalen *tap*-Epitops (*tap) verwendet:**

A1_f
CCCGGGGAGAAGCGTCGATGGAAGAAGAACTTTATCGCCGTC TCGG

A2_f
CCGCCAACCGCTTCAAGAAGATCTCGTCGTCGGGTGCGCT

A3_f
CGACTACGACATCCCCACCACCGCCTCGGAAAACCTCTAC

A4_f
TTCCAGGGCGAGCTCAAGACCGCCGCTCTCGCCCAGCACG

A5_f
ACGAGGCCGTCGACAACAAGTTCAACAAGGAGCAGCAGAA

A9_r
CTTCTTGAAGCGGTTGGCGGCCGAGACGGCGATAAAGTTC

A10_r
TGGTGGGGATGTCGTAGTCGAGCGCACCCGACGACGAGAT

A11_r
GTCTTGAGCTCGCCCTGGAAGTAGAGGTTTTCCGAGGCGG

A12_r
CTTGTTGTCGACGGCCTCGTCGTGCTGGGCGAGAGCGGCG

A16_r
TGGGAGCCTGAGCGTCGTTGAGCTTCTTGGCCTCGGCGAG

B1_f
CAACGACGCTCAGGCTCCCAAGGTCGACAACAAGTTCAAC

B5_f
GAGGCCAAGAAGCTCAACGGTGCCCAGGCTCCCAAGGTCG

B6_f
ACGCCAACTCGGCCGGCAAGTCGACCTGAGATGCGGCCGC

B7_r
AAGGCGTTCTGCTGCTCCTTGTTGAACTTGTTGTCGACCT

B10_r
CCGTTGAGCTTCTTGGCCTCGGCGAGCAGGTTGGCCGACT

B11_r
CTTGCCGGCCGAGTTGGCGTCGACCTTGGGAGCCTGGGCA

D1_f
GAGGCCAAGAAGCTCAACGACGCTCAGGCTCCCAAGGTCG

D2_f
CCGACTACGACATCCCCACCACCGAGAACCTCTACTTCCA

D4_f
AAGAAGAACTTTATCGCCGTCTCGGCCGCCAACCGCTTCA

D6_r
TCGTTGAGCTTCTTGGCCTCGGCGAGCAGGTTGGCCGACT

D9_r
ACGGCGATAAAGTTCTTCTTCCATCGACGCTTCTTGTAGT

D10_r
ACCCGACGACGAGATCTTCTTGAAGCGGTTGGCGGCCGAG

Folgende Oligonukleotide wurden zur Generierung und Sequenzierung des optimierten *myc*-Epitops (*myc) verwendet:**

MT-87_ A5´
CATGGACCTGCAGGGCGAGCAGAAGCTCATCTCGGAAGAGG
ACCTCGGCCGTAACGGCCGCC

MT-88_§A5´
CATGGGCGGCCGTTACGGCCGAGGTCCTCTTCCGAGATGAGC
TTCTGCTCGCCCTGCAGGTC

MT-89_ B3´
CATGGGGCCGTAACGGCCGCGAGCAGAAGCTCATCTCGGAA
GAGGACCTCTAGGC

MT-90_§B3´
GGCCGCCTAGAGGTCCTCTTCCGAGATGAGCTTCTGCTCGCG
GCCGTTACGGCCC

MT-95_ A
CATGGTCGGCCGGCTCGGCCGAGCAGAAGCTCATCTCGGAAG
AGGACCTCGGCCGTAACGGCCGCC

MT-96_§A
CATGGGCGGCCGTTACGGCCGAGGTCCTCTTCCGAGATGAGC
TTCTGCTCGGCCGAGCCGGCCGAC

MT-97_ B
CATGGGGCCGTAACGGCCGCGAGCAGAAGCTCATCTCGGAA
GAGGACCTCTCGGCCGGCTCGGCCC

MT-98_§B
CATGGGGCCGAGCCGGCCGAGAGGTCCTCTTCCGAGATGAGC
TTCTGCTCGCGGCCGTTACGGCCC

MT-117f_120603
GGATAACAATTTCACACAGG
Sequenzieroligo für das *myc**-Epitop

MT-118r_120603
GCTAGCTATAGTTCTAGAGG
Sequenzieroligo für das *myc**-Epitop

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet, um das *rum1-tap*- und das *rum1-tap-Fusionskonstrukt zu generieren bzw. sequenzieren:**

TAP-5´-*Sbf*I_231101
CCTGCAGGATGGAAAAGAGAAGATG
Amplifikationsoligo für C-terminales *tap*-Epitop: *Sbf*I am ATG.

TAP-3´-*Not*I_231101
GCGGCCGCTCAGGTTGACTTCCCC
Amplifikationsoligo für C-terminales *tap*-Epitop: *Not*I am Stopp-Kodon.

TAP-5´-*Sbf*I
CCTGCAGGATGGAAAAGAGAAGATG
Amplifikationsoligo für C-terminales tap-Epitop: *Sbf*I am ATG.

TAP-3´-*Not*I
GCGGCCGCTCAGGTTGACTTCCCC
Amplifikationsoligo für C-terminales tap-Epitop: *Not*I am Stopp-Kodon.

MT-70f_161202
CCTGCAGGGAGAAGCGTCGATGGAAGAAG
Amplifikationsoligo für das *tap**-Epitop: *Sbf*I am ATG.

MT-71r_161202
GCGGCCGCTCAGGTCGACTTGCCGGCCGA
Amplifikationsoligo für das *tap**-Epitop: *Not*I am Stopp-Kodon.

MT-26f_231101
TTAATTAAGCAAAGCCAAGAGAGG
Amplifikationsoligo für N-terminale Rekombinationsflanke: *Pac*I am N-Terminus

MT-27r_231101
CCTGCAGGACTTAGACTCTCCACCAC
Amplifikationsoligo für N-terminale Rekombinationsflanke: *Sbf*I am N-Terminus

MT-24f_231101
GCGGCCGCTAGCGCGCCCTGCCAAG
Amplifikationsoligo für C-terminale Rekombinationsflanke: *Not*I am N-Terminus

MT-25r_231101
TTAATTAACCTGTCACGTGGGTACAAG
Amplifikationsoligo für C-terminale Rekombinationsflanke: *Pac*I am C-Terminus

Oligonukleotide zum Sequenzieren der Rekombinationsflanken der Plasmide EP*rum1*CTT und EP*rum1*CTT*:

MT-28f_040102
GCTTGTAGTGTTCGGGAAGG
Sequenzieroligo für C-terminale Rekombinationsflanke in EP*rum1*CTT* bzw. EP*rum1*CTT

MT-29r_040102
CATCGGACGCAAATTCTCG
Sequenzieroligo für C-terminale Rekombinationsflanke in EP*rum1*CTT* bzw. EP*rum1*CTT

MT-30f_040102
CCTCCAGATCAGGAAGGAACG
Sequenzieroligo für N-terminale Rekombinationsflanke in EP*rum1*CTT* bzw. EP*rum1*CTT

MT-31r_040102
GGACTTGTGGCTGCCGATGC
Sequenzieroligo für N-terminale Rekombinationsflanke in EP*rum1*CTT* bzw. EP*rum1*CTT

Oligonukleotide zur PCR-Generierung einer *rum1*-spezifischen Southern-Sonde:

CQS11 (Quadbeck-Seeger, 1998)
CGAGGAAGTGGTTGCCAAGG

CQS13 (Quadbeck-Seeger, 1998)
CCTTGCTCGGCGTGTCGGACTCG

Weitere Oligonukleotide:

REV24
TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR-Topo.

UNI24
ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR-Topo.

OAN104
ACTAGTAACGGCCGCCAG
Amplifikationsoligo, das im Polylinker von pCR-Topo bindet und für die Generierung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet wurde.

OAN105
CTTGCGCATCAGGAAAACATTG
Amplifikationsoligo, das im Polylinker von pCR-Topo bindet und für die Generierung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet wurde.

DNA-Größenstandards

Als DNA-Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese dienten 1000 bp- und 100 bp-Leitern der Firmen NEB Biolabs und PeqLab sowie λ-DNA *Pst*I-, *Bst*EII- und *Hind*III-Fragmente (Laborpräparate):

λ-DNA *Pst*I-Fragmente:

11.509 bp, 5.077 bp, 4.749 bp, 4.507 bp, 2.838 bp, 2.560 bp, 2.459 bp, 2.443 bp, 2.130 bp, 1.936 bp, 1.700 bp, 1.159 bp, 1.093 bp, 805 bp, 514 bp, 468 bp, 458 bp, 339 bp, 264 bp, 249 bp, 216 bp, 211 bp, 200 bp, 164 bp, 150 bp, 94 bp, 87 bp, 72 bp, 15 bp.

λ-DNA *Bst*EII-Fragmente:

8.454 bp, 7.242 bp, 6.369 bp, 5.686 bp, 4.822 bp, 4.324 bp, 3.675 bp, 2.323 bp, 1.929 bp, 1.371 bp, 1.264 bp, 702 bp, 224 bp, 117 bp.

λ-DNA *Hind*III-Fragmente:

23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 225 bp.

4.1.3 Stämme

Escherichia coli-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5α (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F´, *end*A1, *hsd*R, *hsd*M, *sup*44, *thi*-1, *gyr*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *rec*A1, *lac*Z ΔM15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR-Topo mit dem TOPO-TA Klonierungs-Kit (Invitrogen) wurde teilweise der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: F^-, *mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), Φ80*lac*ZΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rec*A1, *ara*D139, Δ(*ara-leu*)7697, *gal*U, *gal*K, *rps*L(Str^R), *end*A1, *nup*G.

Um auch mit *dcm*-sensitiven Restriktionsendonukleasen Plasmid-DNA zu manipulieren, wurde der Stamm JM110 verwendet, ebenfalls ein *E. coli* K12-Derivat mit folgendem Genotyp: *rpsL*, (Str^r), *thr*, *leu*, *endA*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*, Δ(*lac-proAB*), (F´*traD36*, *proAB*, $lacI^q$ ZΔM15).

Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Für Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

***U. maydis*-Stämme**

Tabelle 5: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	*a1 b1*	-	Banuett, 1989
FB2	*a2 b2*	-	Banuett, 1989
FB1Δ*rum1*	*a1 b1* Δ*rum1*	Hyg^R	Quadbeck-Seeger, 1998
QSΔ*rum 1*	*a2 b2* Δ*rum1*	Hyg^R	entspricht FB1Δ*rum1*-0; Quadbeck-Seeger, 1998
FB1Δ*hda1*	*a1 b1* Δ*hda1*	Hyg^R	entspricht MR11; Jamnischek, 2002

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
FB1Δ*rum1*+*rum1*	*a1 b1* Δ*rum1* + *rum1*	$Phleo^R$	FB1Δ*rum1*
QSΔ*rum1*+*rum1*	*a2 b2* Δ*rum1* + *rum1*	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
FB1*rum1*ΔARID	*a1 b1 rum1* ΔARID	$Phleo^R$	FB1Δ*rum1*
QS*rum1*ΔARID	*a2 b2 rum1* ΔARID	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
FB1*rum1*ΔPHD1	*a1 b1 rum1* ΔPHD1	$Phleo^R$	FB1Δ*rum1*
QS*rum1*ΔPHD1	*a2 b2 rum1* ΔPHD1	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
FB1*rum1*mut.PHD2	*a1 b1 rum1* C1443S	$Phleo^R$	FB1Δ*rum1*
QS*rum1*mut.PHD2	*a2 b2 rum1* C1443S	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
FB1*rum1*ΔPHD3	*a1 b1 rum1* ΔPHD3	$Phleo^R$	FB1Δ*rum1*
QS*rum1*ΔPHD3	*a2 b2 rum1* ΔPHD3	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
FB1*rum1*ΔJmjC	*a1 b1 rum1* ΔJmjC	$Phleo^R$	FB1Δ*rum1*
QS*rum1*ΔJmjC	*a2 b2 rum1* ΔJmjC	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
FB1*rum1*ΔPHD1mut.PHD2	*a1 b1 rum1* ΔPHD1 C1443S	$Phleo^R$	FB1Δ*rum1*
QS*rum1*ΔPHD1mut.PHD2	*a2 b2 rum1* ΔPHD1 C1443S	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
FB1*rum1*mut.PHD2ΔPHD3	*a1 b1 rum1* C1443S ΔPHD3	$Phleo^R$	FB1Δ*rum1*
QS*rum1*mut.PHD2ΔPHD3	*a2 b2 rum1* C1443S ΔPHD3	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
MT*rum1*ΔPHD1mut.PHD2ΔPHD3	*a1 b1 rum1* ΔPHD1 C1443S ΔPHD3	$Phleo^R$	FB1*rum1*ΔPHD1mut.PHD2 X QS*rum1*mut.PHD2 ΔPHD3
QS*rum1*ΔPHD1mut.PHD2ΔPHD3	*a2 b2 rum1* ΔPHD1 C1443S ΔPHD3	$Phleo^R$	QSΔ*rum1*
FB1*rum1–tap*	*a1 b1 rum1–tap*	Hyg^R	FB1
FB2*rum1–tap*	*a2 b2 rum1–tap*	Hyg^R	FB2
FB1*rum1–tap**	*a1 b1 rum1–tap**	Hyg^R	FB1
FB2*rum1–tap**	*a2 b2 rum1–tap**	Hyg^R	FB2
FB1*rum1–tap**/*hda1-myc*	*a1 b1 rum1–tap** pNEBUCotef-*hda1*H*myc*	Hyg^R, Cbx^R	FB1
FB2*rum1–tap**/*hda1-myc*	*a2 b2 rum1–tap** pNEBUCotef-*hda1*H*myc*	Hyg^R, Cbx^R	FB2
FB1*rum1–tap**/*hda1-myc**	*a1 b1 rum1–tap** pNEBUCotef-*hda1*H*myc**	Hyg^R, Cbx^R	FB1
FB2*rum1–tap**/*hda1-myc**	*a2 b2 rum1–tap** pNEBUCotef-*hda1*H*myc**	Hyg^R, Cbx^R	FB2

Alle durch homologe Integration erzeugten Stämme, wurden im Southern-Verfahren überprüft. Stämme, die frei replizierende Vektoren tragen, wurden auf entsprechenden antibiotikahaltigen Medien propagiert. Bei der Beschreibung des jeweiligen Genotyps nicht integrativer Transformanten sind die eingesetzten Plasmide aufgeführt. Ausgangsstamm: Stamm, in dem die jeweils letzte Transformation erfolgte.

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

Ausgangsplasmide

pSP72 (Promega)
Sehr kleiner Klonierungsvektor, keine Blau/Weiß-Selektion möglich.

pUC19 (Yanisch-Perron *et al*., 1985)
Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pSL1180 (Pharmacia)
Klonierungsvektor mit sehr großem Polylinker; enthält zwar das Gen für β-Galaktosidase, trotzdem ist keine Blau/Weiß-Selektion möglich.

pNEB193 (NEB)
Klonierungsvektor**,** Derivat von pUC19 mit verändertem Polylinker, der vor allem Erkennungssequenzen für selten schneidende Enzyme enthält; Blau/ Weiß-Selektion ist möglich.

pCR-Topo (Invitrogen)
Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Produkte können mit *Eco*RI wieder ausgeschnitten werden; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pSL-Ble(+), pSL-Ble(-) (Brachmann, 2001a)
Enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2.407 bp *Not*I-Fragment aus pUThsp70Not, in unterschiedlicher Orientierung in die *Not*I-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *ble*-Gen (aus *Streptoalloteichus hindustanus*) wird von dem *hsp70*-Promotor (aus *U. maydis*) und dem *trpC*-Terminator (aus *Aspergillus nidulans*) flankiert.

pSL-Hyg(+), pSL-Hyg(-) (Brachmann, 2001a)
Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp *Not*I-Fragment aus pbE1-k-W2, in unterschiedlicher Orientierung in die *Not*I-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *hph*-Gen (aus *E. coli*) wird von dem *hsp70*-Promotor und dem *hsp70*-Terminator flankiert (beide aus *U. maydis*).

pNEB-Ble(+), pNEB-Ble(-) (Brachmann, 2001a)
Enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2.407 bp *Not*I-Fragment aus pSL-Ble(+), in unterschiedlicher Orientierung in die *Not*I-Schnittstelle von pNEB193-*Not*I inseriert.

pNEB-Hyg(+), pNEB-Hyg(-) (Brachmann, 2001a)
Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp *Not*I-Fragment aus pSL-Hyg(+), in unterschiedlicher Orientierung in die *Not*I-Schnittstelle von pNEB193-*Not*I inseriert.

pBS1479 und pBS1539 (Rigaut *et al*., 1999)
Enthält die 601 bp lange kodierende Sequenz des C-terminalen *tap*-Epitops. Eine Isolation durch *Not*I-Restriktion ist möglich.

pNEBUC-otef*hda1*#17 (Jamnischek, 2003)
Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression von *hda1* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde der *o2tef*-Promotor als 897 bp langes Fragment mittels *Nde*I- und *Xba*I-Restriktion aus pCU4 und der offene Leserahmen der *hda1* mittels *Nde*I und *Hin*dIII-Restriktion als 1.778 bp langes Fragment aus pTOPO-hda1NdeI/NotI isoliert. Die isolierten Frag-

mente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den mit *Xba*I und *Hin*dIII gespaltenen Vektor pNEBUC ligiert. pNEBUC besitzt eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

pTOPO-HMYC SbfI/NotI#7 (Jamnischek, 2003)

Das PCR-Amplifikat des C-terminalen *hexa-myc*-Epitops aus pCK152 wurde in pCR-Topo inseriert. Über die Primer 5´-Hmyc-SbfI und 3´-Hmyc-NotI wurde am 5´-Ende eine *Sbf*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die die translationale Fusion an ein entsprechendes 3´-Ende des zu markierenden Gens erlaubt sowie eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle am 3´-Ende, die die Fusion an eine entsprechend restringierte Resistenzkassette ermöglicht.

pTOPO-hda1-5´HMYC#14 (Jamnischek, 2003)

Vektor, der ein C-terminales Fusionskonstrukt aus dem 3´-Bereich des *hda1*-ORFs und *hexa-myc* enthält. Dazu wurde der Vektor pTOPO-hda1-5´#2-4 mit *Sbf*I und *Not*I geöffnet und darin ein 279 bp langes *Sbf*I-*Not*I-Fragment aus pTOPO-HMYC SbfI/NotI#7, das die kodierende Sequenz von *hexa-myc* enthält, inseriert.

p241095 1#1 (J. Kämper, pers. Mitteilung)

In pSL1180 ist ein 8.925 bp großes Fragment aus dem Genom von *U. maydis* eingefügt. Darin enthalten sind ORF und Promotorbereich von *rum1*. Im ORF von *rum1* liegt eine Mutation der Base 4328 (G) zu C vor.

Plasmide für die Herstellung von Hybridisierungssonden

pCR-rep1 (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 429 bp *Bam*HI/*Hin*dIII-Fragment von *rep1* aus dem Plasmid pSL6,8NdeIrep1, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

pCR-dik1 (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 357 bp *Nco*I/*Ava*II-Fragment von *dik1* aus dem Plasmid p5.3*Bam*HI*dik1* (Bohlmann, 1996), bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

pCR-hum2 (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 345 bp *Sph*I/*Sph*II-Fragment von *hum2* aus dem Plasmid pRep/ORF, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Das Plasmid wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

pCR-lga2 (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Enthält ein *Bsm*BI/*Hin*dIII-Fragment von *lga2* aus dem Plasmid pUMa2, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Das Plasmid wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

pCR-egl1 (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 522 bp *Nco*I/*Hin*dIII-Fragment von *egl1* aus dem Plasmid pGE60, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Das Plasmid wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

pCR-ppi (Weinzierl, 2001)

Enthält ein 132 bp *Msc*I/*Eco*RI-Fragment von *ppi1* aus dem Plasmid pdik2cDNAH10, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde. Das Plasmid wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern-Hybridisierungssonden verwendet.

pfrb52 (Brachmann, 2001a)

Enthält ein 392 bp *Eco*RI/*Eco*RI-Fragment des Amplicons *frb52* (=Polymerase X; *polX*), das in pCR-Topo kloniert wurde.

pbW2-NdeI-bE1 (Brachmann, 2001a)

Enthält ein intronfreies 1.837 bp *Nde*I/*Pvu*II 5´-Fragment von *bW2* und ein intronfreies 761 bp *Nde*I/*Pvu*II 5´-Fragment von *bE1*. Entstanden durch Einfügen des 2.598 bp *Pvu*II-Fragments aus pE1W2ΔP#1 in den mit *Pvu*II linearisierten Vektor pBS(+)SK.

p241095 1#1 (J. Kämper, pers. Mitteilung)

In pSL1180 ist ein 8.925 bp großes Fragment aus dem Genom von *U. maydis* eingefügt. Darin enthalten sind ORF und Promotorbereich von *rum1*. Im ORF von *rum1* liegt eine Mutation der Base 4.328 (G) zu C vor. Das Plasmid wurde als Matrize zusammen mit den Oligonukleotiden CQS11 und CQS13 in PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Northern- und Southern-Hybridisierungssonden verwendet.

Plasmide zur Herstellung von Deletionsmutanten

pSP*rum1*

In pSP72 eingefügt ist ein 8.925 bp großes *Xba*I-*Bgl*II Fragment aus p241095 1#1. Darin enthalten sind ORF und putativer Promotorbereich von *rum1*. Im ORF von *rum1* liegt eine Mutation der Base 4.328 (G) zu C vor. Die Mutation bewirkt in der PHD2-Domäne von Rum1 einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Serin (AS 1.443).

EPpSP*rum1*

In den Vektor pSP72 sind folgende DNA-Fragmente der Reihe nach eingefügt: 2.078 bp großes Fragment (*Eco*RV-*Eco*RV) aus p241095 1#1; 1.756 bp große Phleomycin-Resistenzkassette (*Bgl*II-*Xba*I) aus pNEB-Ble(-); 8.925 bp großes Fragment (*Xba*I-*Bgl*II) aus dem Genom von *U. maydis,* das sowohl den gesamten ORF als auch den putativen Promotorbereich von *rum1* enthält. Das mit *Ssp*I linearisierte Plasmid wurde zur homologen Rekombination verwendet, um die *U. maydis*-Stämme FB1Δ*rum1*+*rum1* und QSΔ*rum1*+ *rum1* zu generieren.

EPpSP*rum1*mut.PHD2

In den Vektor pSP72 sind folgende DNA-Fragmente der Reihe nach eingefügt: 2.078 bp großes Fragment (*Eco*RV-*Eco*RV) aus p241095 1#1; 1.756 bp große Phleomycin-Resistenzkassette (*Bgl*II-*Xba*I) aus pNEB-Ble(-); 8.925 bp großes Fragment (*Xba*I-*Bgl*II) aus p241095 1#1, darin enthalten sind ORF und Promotorbereich von *rum1*. Im ORF von *rum1* liegt eine Mutation der Base 4.328 (G) zu C vor. Das Plasmid wurde zur homologen Rekombination verwendet, um die *U. maydis*-Stämme FB1*rum1*mut.PHD2 und QS*rum1* mut.PHD2 zu generieren.

EPpSP*rum1*ΔPHD1

In den Vektor pSP72, linearisiert mit *Xba*I und *Bgl*II, sind folgende DNA-Fragmente der Reihe nach eingefügt: 2.078 bp großes Fragment (*Eco*RV-*Eco*RV) aus p241095 1#1; 1.756 bp große Phleomycin-Resistenzkassette (*Bgl*II-*Xba*I) aus pNEB-Ble(-); 8.775 bp großes *Xba*I-*Bgl*II Fragment aus dem Genom von *U. maydis,* bei dem die Basenpaare 1.617-1.767, die für die PHD1-Domäne kodieren, und die Basenpaare 5.007-5.154, die für die PHD3-Domäne in Rum1 kodieren, deletiert sind. Das mit *Ssp*I linearisierte Plasmid wurde zur homologen Rekombination verwendet, um den *U. maydis*-Stamm FB1*rum1*ΔPHD1mut.PHD2 ΔPHD3 zu generieren.

EPpSP*rum1*ΔPHD3

In den Vektor pSP72, linearisiert mit *Xba*I und *Bgl*II, sind folgende DNA-Fragmente der Reihe nach eingefügt: 2.078 bp großes Fragment (*Eco*RV-*Eco*RV) aus p241095 1#1; 1.756 bp große Phleomycin-Resistenzkassette (*Bgl*II-*Xba*I) aus pNEB-Ble(-); 8.778 bp großes *Xba*I-*Bgl*II Fragment aus dem Genom von *U. maydis,* bei dem die Basenpaare 5.007-5.154, die für die PHD3-Domäne in Rum1 kodieren, deletiert sind. Das mit *Ssp*I linearisierte Plasmid wurde zur homologen Rekombination verwendet, um die *U. maydis*-Stämme FB1*rum1*ΔPHD3 und QS*rum1*ΔPHD3 zu generieren.

EPpSP*rum1*ΔPHD1mut.PHD2ΔPHD3

In den Vektor pSP72, linearisiert mit *Xba*I und *Bgl*II, sind folgende DNA-Fragmente der Reihe nach eingefügt: 2.078 bp großes Fragment (*Eco*RV-*Eco*RV) aus p241095 1#1; 1.756 bp große Phleomycin-Resistenzkassette (*Bgl*II-*Xba*I) aus pNEB-Ble(-); 8.628 bp großes *Xba*I-*Bgl*II Fragment aus dem Genom von *U. maydis,* bei dem die Basenpaare 1.617-1.767, die für die PHD1-

Domäne kodieren, und die Basenpaare 5.007-5.154, die für die PHD3-Domäne in *rum1* kodieren, deletiert sind. Im ORF von *rum1* liegt eine Mutation der Base 4.328 (G) zu C vor. Die Mutation bewirkt in der PHD2-Domäne von Rum1 (AS 1.443) einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Serin. Das mit *Ssp*I linearisierte Plasmid wurde zur homologen Rekombination verwendet um den *U. maydis*-Stamm FB1*rum1* ΔPHD1mut.PHD2ΔPHD3 zu generieren.

EPpSP*rum1*ΔARID

In den Vektor pSP72, linearisiert mit *Xba*I und BglII, sind folgende DNA-Fragmente der Reihe nach eingefügt: 2.078 bp großes Fragment (*Eco*RV-*Eco*RV) aus p241095 1#1; 1.756 bp große Phleomycin-Resistenzkassette (*Bgl*II-*Xba*I) aus pNEB-Ble(-); 8.769 bp großes *Xba*I-*Bgl*II Fragment aus dem Genom von *U. maydis,* bei dem die Basenpaare 900-1.056, die für die ARID-Domäne in Rum1 kodieren kodieren, deletiert sind. Das mit *Ssp*I linearisierte Plasmid wurde zur homologen Rekombination verwendet, um die *U. maydis*-Stämme FB1*rum1*ΔARID und QS*rum1* ΔARID zu generieren.

EPpSP*rum1*ΔJmjC

In den Vektor pSP72, linearisiert mit *Xba*I und *Bgl*II, sind folgende DNA-Fragmente der Reihe nach eingefügt: 2.078 bp großes Fragment (*Eco*RV-*Eco*RV) aus p241095 1#1; 1.756 bp große Phleomycin-Resistenzkassette (*Bgl*II-*Xba*I) aus pNEB-Ble(-); 8.556 bp großes *Xba*I-*Bgl*II Fragment aus dem Genom von *U. maydis,* bei dem die Basenpaare 2.133-2.502, die für die ARID-Domäne in Rum1 kodieren, deletiert sind. Das mit *Ssp*I linearisierte Plasmid wurde zur homologen Rekombination verwendet, um die *U. maydis*-Stämme FB1*rum1*ΔJmjC und QS*rum1* ΔJmjC zu generieren.

Plasmide zur biochemischen Komplexaufreinigung

pTOPO-TAPTAG

Das PCR-Amplifikat des C-terminalen *tap*-Epitops aus pBS1479 wurde in pCR-Topo inseriert. Über die Primer TAP-5´-SbfI und TAP-3´-NotI wurde am 5´-Ende eine *Sbf*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die die translationale Fusion an ein entsprechendes 3´-Ende des zu markierenden Gens erlaubt sowie eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle am 3´-Ende, die die Fusion an eine entsprechend restringierte Resistenzkassette ermöglicht.

Topo MT-26/27

Das PCR-Amplifikat der N-terminalen Rekombinationsflanke aus dem ORF von *rum1* wurde in pCR-Topo inseriert. Über die Primer MT-26 und MT-27 wurde am 5´-Ende eine *Pac*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt, sowie eine *Sbf*I-Restriktionsschnittstelle am 3´-Ende, die eine Fusion an das *tap*- bzw *tap**-Epitop ermöglicht.

Topo MT-24/25

Das PCR-Amplifikat der C-terminalen Rekombinationsflanke aus dem Genom von *U. maydis* für EP*rum1*CTT wurde in pCR-Topo inseriert. Über die Primer MT-24 und MT-25 wurde am 5´-Ende eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die eine Ligation an die Resistenzkassette erlaubt, sowie eine *Pac*I-Restriktionsschnittstelle am 3´-Ende.

EP*rum1*CTT

In den mit *Pac*I restringierten Vektor p193 wurden der Reihenfolge nach folgende Fragmente inseriert: 1.957 bp großes *Pac*I-*Sbf*I Fragment aus Topo MT-26/27; 560 bp großes *Sbf*I-*Not*I Fragment aus pTOPO-TAPTAG; 2.896 bp große Hygromycin-Resistenzkassette (*Not*I-*Not*I) pSL Hyg(+); 1.897 bp großes *Not*I-*Pac*I Fragment aus Topo MT-24/25. Dieses mit *Ssp*I linearisierte Plasmid wurde verwendet, um die Stämme FB1*rum1-tap* und FB2*rum1-tap* zu generieren.

Topo*rum1*CTT*

Das PCR-Amplifikat des C-terminalen, optimierten *tap**-Epitops wurde in pCR-Topo inseriert.

Topo MT-70/71

Das PCR-Amplifikat des C-terminalen, optimierten *tap**-Epitops wurde in pCR-Topo inseriert. Über die Primer MT-70 und MT-71 wurde am 5´-Ende eine *Sbf*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die die translationale Fusion an ein entsprechendes 3´-Ende des zu markierenden Gens erlaubt sowie eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle am 3´-Ende, die die Fusion an eine entsprechend restringierte Resistenzkassette ermöglicht.

EP*rum1*CTT*

In den mit *Pac*I restringierten Vektor p193 wurden der Reihenfolge nach folgende Fragmente inseriert: 1.957 bp großes *Pac*I-*Sbf*I Fragment aus Topo MT-26/27; 557 bp großes *Sbf*I-*Not*I Fragment aus pTOPO-TAPTAG; 2.896 bp große Hygromycin-Resistenzkassette (*Not*I-*Not*I) pSL Hyg(+); 1.897 bp großes *Not*I-*Pac*I Fragment aus Topo MT-24/25. Dieses mit *Ssp*I linearisierte Plasmid wurde verwendet, um die Stämme FB1*rum1-tap** und FB2*rum1-tap** zu generieren.

pNEBUC-otef-*hda1* (Jamnischek, 2003)

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression von *hda1* unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die Klonierung wurde der *o2tef*-Promotor als 897 bp langes Fragment mittels *Nde*I- und *Xba*I-Restriktion aus pCU4 und der offene Leseraster der *hda1* mittels *Nde*I und *Hin*dIII-Restriktion als 1.778 bp langes Fragment aus pTOPO-hda1NdeI/NotI isoliert. Die isolierten Fragmente wurden entsprechend ihrer Schnittstellen in den mit *Xba*I und *Hin*dIII gespaltenen Vektor pNEBUC ligiert. pNEBUC besitzt eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion für *U. maydis*.

pTOPO-*hda1*-5´Hmyc (Jamnischek, 2003)

Vektor, der ein C-terminales Fusionskonstrukt aus dem 3´-Bereich des *hda1*-ORFs und *hexa-myc* enthält. Dazu wurde der Vektor pTOPO-hda1-5´#2-4 mit *Sbf*I und *Not*I geöffnet und darin ein 279 bp langes *Sbf*I-*Not*I-Fragment aus pTOPO-HMYC SbfI/NotI#7, das die kodierende Sequenz von *hexa-myc* enthält, inseriert.

pNEBUCotef-*hda1*Hmyc (Jamnischek, 2003)

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines Hda1-MYC-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die C-terminale translationale Fusion des MYC-Epitops an die Hda1 wurde der Vektor pNEBUC-otef*hda1*#17 mit *Sac*II und *Hin*dIII restringiert. Dies führte zur Excision eines 907 bp langen Fragments, das den 3´-Bereich der *hda1* umfasst. Aus dem Vektor pTOPO-hda1-5´Hmyc wurde ein 1.113 bp langes *Sac*II-*Hin*dIII-Fragment isoliert, das den 3´-Bereich der *hda1* in translationaler Fusion zu *hexa-myc* umfasst und über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pNEBUC-otef*hda1* ligiert.

Vektor DC

Ein 2.707 bp großes *Sac*I-*Eco*RI Fragment aus p193 wurde mit einem 270bp *Sac*I-*Eco*RI Fragment aus pSL1180 ligiert.

pDC-HMYC*

Das PCR-Amplifikat des C-terminalen, optimierten *myc**-Epitops wurde in pCR-Topo inseriert. Die Restriktionsschnittstellen für *Sbf*I und eine *Not*I ermöglichen eine translationale Fusion an das entsprechende 3´-Ende des zu markierenden Gens.

pTOPO-*hda1*-5´Hmyc*

Vektor, der ein C-terminales Fusionskonstrukt aus dem 3´-Bereich des *hda1*-ORFs und *hexa-myc** enthält. Dazu wurde der Vektor pTOPO-*hda1*-5´#2-4 (Jamnischek, 2003) mit *Sbf*I und *Not*I geöffnet und darin ein *Sbf*I-*Not*I-Fragment aus pDC-Hmyc*, das die kodierende Sequenz von *hexa-myc** enthält, inseriert.

pNEBUCotef-*hda1*Hmyc*

Autonom in *U. maydis* replizierender Vektor, der die Expression eines Hda1-Myc-Fusionsproteins unter dem konstitutiv aktiven *o2tef*-Promotor erlaubt. Für die C-terminale translationale Fusion des Myc-Epitops an die Hda1 wurde der Vektor pNEBUC-otef*hda1* (Jamnischek, 2003) mit *Sac*II und *Hin*dIII restringiert. Dies führte zur Excision eines 907 bp langen Fragments, das den 3´-Bereich der *hda1* umfasst. Aus dem Vektor pTOPO-hda1-5´Hmyc* wurde ein *Sac*II-*Hin*dIII-Fragment isoliert, das den 3´-Bereich der *hda1* in translationaler Fusion zu *hexa-myc* umfasst und über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pNEBUC-otef*hda1* ligiert.

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

Kultivierung von *E. coli*

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

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD_{600} die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD_{600} des jeweiligen Kulturmediums verwendet. $OD_{600} = 1{,}0$ entspricht etwa 10^9 Zellen/ml.

RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung transformations-kompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM $MgCl_2$ und $MgSO_4$ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600} \approx 0{,}5$ bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4 °C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42 °C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotika-resistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37 °C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformations-Ansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10^6 Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung:

100 mM RbCl

50 mM $MnCl_2 \times 4\ H_2O$

30 mM K-Acetat

10 mM $CaCl_2 \times 2\ H_2O$

15% (v/v) Glycerin

in $H_2O_{bid.}$

mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

RF2-Lösung:

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM $CaCl_2 \times 2\ H_2O$

15% (v/v) Glycerin

in $H_2O_{bid.}$

mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

Elektroporations-Transformation von *E. coli*

Eine frische Übernachtkultur von *E. coli* JM110 wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer $OD_{600} \approx 0{,}7$ geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 0 °C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert (300 Upm, 15 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wurde in 500 ml kaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem Wasser (250 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 0,5 bis 1 ml kaltem

10 %igem Glycerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40 µl Zellsuspension wurden mit bis zu 5 µl DNA aus einem Ligationsansatz gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulsers gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF, 2,5 kV, 200 W). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 ml SOC-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf YT-Amp-Platten ausgestrichen.

4.2.2 *Ustilago maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtkulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD_{600} die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD_{600} des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD_{600} = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10^7 Zellen/ml.

Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz *et al.*, 1990) und (Gillissen *et al.*, 1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem $YEPS_L$-Medium verdünnt und bei 29 °C bis zu einer Zelldichte von 1-2 × 10^7 Zellen/ml (bis maximal OD_{600} = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit autonom replizierenden Plasmiden werden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl zirkulärer Plasmid-DNA (ca. 0,5–3 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentiell korrekte Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot-Analyse verifiziert. Die Stämme wurden vor weiteren Experimenten insgesamt dreimal vereinzelt.

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8

1 M Sorbitol

in $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert

STC:

10 mM Tris-Cl, pH 7,5

100 mM $CaCl_2$

1 M Sorbitol

in $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert

STC/PEG:

15 ml STC

10 g PEG4000

Test auf Pathogenität

Die für den Pathogenitätstest verwendeten Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (14 h 20000 lux, 28 °C; 10 h Dunkelperiode, 18 °C) angezogen und 14 bis 16 Tage nach der Aussaat infiziert. Die *U. maydis*-Stämme wurden zum Infizieren über Nacht in YEPS angezogen ($OD_{600} \approx 0{,}8$), anschließend abzentrifugiert und in sterilem Wasser aufgenommen. Für Kreuzungen wurden Suspensionen kompatibler Sporidien im gleichen Verhältnis gemischt. Zur Infektion von Early Golden Bantam wurden Zellsuspensionen durch Injektion in den Stengel eingebracht. Nach 1-2 Wochen konnte bei Infektion mit pathogenen Stämmen die Bildung von Tumoren an den Pflanzen beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass die in *U. maydis* eingebrachten Resistenzgene keine Auswirkung auf die Interaktion des Pilzes mit seiner Wirtspflanze haben (Topp *et al.*, 2002). Etwa 14 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Tumore lichtmikroskopisch auf Sporenbildung untersucht.

Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37 °C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5 %igen $CuSO_4$-Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit $H_2O_{bid.}$ gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf $YEPS_L$-Platten ausplattiert, denen Chloramphenicol, Kanamycin und Tetracyclin zugesetzt war, um bakterielle Kontaminationen zu entfernen. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden zweimal vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6b (*a1 b2*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt.

Mikroskopie

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet.

Test auf Endoglukanasesekretion

Das Protokoll wurde modifiziert nach Schauwecker *et al.*, (1995). Um Endoglukanase-Aktivität in *U. maydis*-Zellen nachzuweisen, wurden 3 µl einer in $YEPS_L$-Medium inokulierten Übernachtkultur auf CMC-Platten getropft und 18 bis 24 h bei 28°C inkubiert. Sichtbare *U. maydis*-Kolonien wurden auf der Plattenunterseite mit einem Stift markiert. Die Platten wurden anschließend mit $H_2O_{bid.}$ abgespült und kurz getrocknet. Um den Carboxymethylcellulose-Abbau sichtbar zu machen, wurden 20 ml einer 1 %igen Kongorot-Lösung auf die Platten gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Nach Entfernung des überschüssigen Farbreagenz wurde mehrmals mit einer 1 M NaCl-Lösung entfärbt. Endoglukanase-Aktivität konnte als gelblicher Hof (Halo) detektiert werden.

1 % (w/v) Kongorot-Lösung:

10 mg/ml Kongorot

in $H_2O_{bid.}$ lösen

1 M NaCl-Lösung:

58,4 g NaCl

in $H_2O_{bid.}$ lösen

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z.B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind in Ausubel *et al*. (1987) und Sambrook *et al*. (1989) ausführlich beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus A_{260} zu A_{280}. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem BioSpec UV-Spektralphotometer (Amersham) bzw. NanoDrop ND-1000 Spectralphotometer (NanoDrop-Technologies).

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al*. (1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95 °C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100 bis 200 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtkultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0
50 mM Na_2-EDTA
8% (w/v) Saccharose
5% (v/v) Triton X-100
in $H_2O_{bid.}$

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
in $H_2O_{bid.}$

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach (Hoffmann und Winston, 1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtkultur in $YEPS_L$-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50 °C resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

***Ustilago*-Lysispuffer:**

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na_2-EDTA
1% (w/v) SDS
in $H_2O_{bid.}$

TE-Phenol/Chloroform:

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

RNA-Isolierung aus *U. maydis* Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach (Schmitt *et al*., 1990). Zellen von einer frischen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis $OD_{600} \approx 0{,}5$ bei 29 °C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600 µl AE-Puffer mit 1 % (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 65 °C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4 °C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 µl) wurde danach mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4 °C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 µl $H_2O_{bid.}$ oder RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 1 µl auf einem 1 %igen TBE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260 nm gemessen.

AE-Puffer:

50 mM Na-Acetat, pH 5,3
10 mM Na_2-EDTA
in $H_2O_{bid.}$

AE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit AE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

RNA-Lagerpuffer:

1 mM Na-Citrat, pH 6,4
in $H_2O_{bid.}$

4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA wurde durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht. Diese Methode hat gegenüber der häufig verwendeten Formamid/Formaldehyd-Denaturierung den Vorteil, bei der Gelelektrophorese eine deutlich bessere Auftrennung der Fragmente zu bieten. Die RNA-Probe (5-15 µg) wurde dazu in 16 µl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50 % DMSO für 1 h bei 50 °C denaturiert, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1 % MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde alle 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. In der Regel wurden mehrere parallele Auftrennungen gleichzeitig durchgeführt.

MOPS-Puffer:

200 mM MOPS, pH 7,0
80 mM Na-Acetat
10 mM Na_2-EDTA
in $H_2O_{bid.}$

RNA-Auftragspuffer:

50% (w/v) Saccharose
0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol FF
in MOPS-Puffer

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach (Southern, 1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N^+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzu-

spalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 2 h.

DENAT-Lösung:

1,5 M NaCl
0,4 M NaOH
in $H_2O_{bid.}$

Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N^+, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC über Nacht. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (302 nm, 120 mJ/cm^2) kovalent mit der Membran verknüpft. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylenblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H_2O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

20x SSC:

300 mM Na-Citrat, pH 7,0
3 M NaCl
in $H_2O_{bid.}$

Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die Hybond-N^+-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60 °C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95 °C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10^6 cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60 °C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60 °C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

Hybridisierungspuffer:

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
50 mM PIPES
100 mM NaCl
1 mM Na_2-EDTA
5% (w/v) SDS
in $H_2O_{bid.}$

Waschpuffer:

1x SSC
0,1% (w/v) SDS
in $H_2O_{bid.}$

Herstellung von Northern-Hybridisierungssonden

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von α^{32}P-dCTP hergestellt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Dabei wurden folgende DNA-Fragmente eingesetzt:

bE/bW ein 2.598 bp *Pvu*II-Fragment aus pbW2-NdeI-bE1

lga2 ein *Eco*RI-Fragment aus pCR-lga2

dik1 ein 357 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-dik1

egl1 ein 582 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-egl1

hum2 ein 345 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-hum2

rep1 ein 459 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-rep1

ppi1 ein 165 bp *Eco*RI-Fragment aus pCR-ppi1

frb52 ein 392 bp *Eco*RI-Fragment aus pfrb52

rum1 ein 820 bp *Bst*EII/*Nco*I-Fragment aus pSP*rum1*

Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach (Sanger *et al.*, 1977): In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na_2-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgekocht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert werden.

Sequenz- und Strukturanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

SEQUENCENAVIGATOR 1.0.1 (ABI) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

DNA-STRIDER 1.3 (Douglas, 1995) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.

BLAST2 (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997; Gish und States, 1993) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

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

SMART (Schlutz *et al.*, 1998) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

PSORT2 (Nakai und Horton, 1999) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

CLUSTALW (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

SEQVU 1.0.1 (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments.

MEME SYSTEM (Bailey und Elkan, 1994) und **MAST SYSTEM** (Bailey und Gribskov, 1998) **MOTIF DISCOVERY AND SEARCH 3.5.4** zur Identifikation von DNA-Sequenzmotiven.

PENCE PROTEOME ANALYST V2.5 (Lu *et al.*, 2004) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

INTERPRO (EMBL-EBI) zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

PESTFIND (Version EMBOSS, Institut Pasteur) zur Idenfifizierung von PEST-Motiven als potentielle proteolytische Schnittstellen.

PREDICTNLS (Cokol *et al.*, 2000) zur Identifikation von Kernlokalisationssequenzen.

4.3.4 PCR-Techniken

Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach (Innis und Gelfand, 1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d. h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl mit Hot-Start durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

Denaturierung bei 94 °C für 2 Minuten, Zugabe von 1U Taq DNA-Polymerase (Hot-Start), Denaturierung bei 94 °C für 1 Minute, 30 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 1 Minute Annealing bei 65 °C und 1,5 Minuten Elongation bei 72 °C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 5 Minuten bei 72 °C. Für die Darstellung von PCR-Protokollen wird eine vereinfachte Schreibweise verwendet:

94/2-1U*Taq*-94/1-[94/0,5-65/1-72/1,5]x30-72/5

Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate musste die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (PTC 100 oder PTC 200, MJ Research).

PCR-Puffer (*Taq* DNA-Polymerase):

10 mM Tris-Cl, pH 8,3

50 mM KCl

1,5 mM $MgCl_2$

in $H_2O_{bid.}$

Ganz-Zell-PCR aus *E. coli*-Zellen

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *E. coli*-Zellen durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100 µl $H_2O_{bid.}$ resuspendiert und davon jeweils 1 µl zu einem 50 µl Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10 min), um ein Platzen der *E. coli*-Zellen zu erreichen. Für den Nachweis der Insertion von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR-Topo wurden die Oligonukleotide UNI24 und REV24 bzw. OAN104 und OAN105 verwendet.

Synthese-PCR (Hale *et al.*, 1998) zur Optimierung der *tap*-Sequenz

Das Synthese-Protokoll ist eine Weiterentwicklung der Single-step Assembly-Methode nach (Stemmer *et al.*, 1993). Insgesamt 22 Oligonukleotide von jeweils 40 nt Länge bildeten die Grundlage für die Synthese der modifizierten *tap*-Sequenz *tap**. Den kodierenden Strang deckten in Transkriptionsrichtung die Oligonukleotide A1_f, A2_f, A3_f, A4_f, A5_f, B1_f, B5_f, B6_f, D1_f, D2_f, D4_f ab, den Gegenstrang ebenfalls vom 3´-Ende beginnend A9_r, A10_r, A11_r, A12_r, A16_r, B7_r, B10_r, B11_r, D6_r, D9_r, D10_r. Die Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von jeweils 100 µM verdünnt und anschließend zu gleichen Teilen gemischt. In der Mischung für *tap** betrug die Konzentration der einzelnen Oligonukleotide etwa 3 µM. Jeweils 5 µl dieser Gemische dienten als Grundlage für den anschließenden PCR-Schritt mit folgenden Komponenten:

5 µl Oligonukleotid-Lösung

10 µl 10x *Pfu*-Reaktionspuffer

0,8 µl 25 mM dNTPs

3 U *Pfu*-DNA-Polymerase

ad 100 µl $H_2O_{bid.}$

94/5-[94/0,2-65/0,3-72/0,45]x25-72/5

Nach Beendigung der 25 Zyklen wurden 33 µl des ersten PCR-Ansatzes nach dem gleichen Schema mit frischen Reagenzien versetzt und das Programm ein weiteres Mal durchlaufen. Die nachfolgende Recovery-PCR (94/2-[94/0,2-72/1,3]x26) enthielt neben 20 µl dieser zweiten PCR-Probe erneut alle Komponenten in obigem Verhältnis, zusätzlich jedoch 200 pmol der Primer-Kombination A1_f und D9_r welche den jeweils äußersten Oligonukleotiden des *tap**-Fragments entsprechen. Aus allen PCR-Ansätzen wurden jeweils 5 µl auf einem 1 % TBE-Agarosegel aufgetrennt.

Optimierung der *myc*-Sequenz

Die von der Firma MWG synthetisierten Oligonukleotide wurden phosphoryliert. Jeweils 150 pmol zweier Oligonukleotide wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl miteinander gemischt (MT-87_A5´ und MT-88_§A5´, MT-89_B3´ und MT-90_§B3´, MT-95_A und MT-96_§A, MT-97_B und MT-98_§B), 15 min bei 94 °C inkubiert und langsam bis auf 60 °C abgekühlt. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden in den mit *Nco*I restringierten Vektor pCR-Topo inseriert. Mittels *Sfi*I (MT-95_A / MT-96_§A und MT-97_B / MT-98_§B), *Sbf*I und *Sfi*I (MT-87_A5´ / MT-88_§A5´), *Sfi*I und *Not*I (MT-89_B3´ und MT-90_§B3´) wurden die mono-*myc**-Sequenzen restringiert, anschließend isoliert und mit dem durch *Sbf*I und *Not*I linearisierten Vektor DC ligiert. Dadurch wurden tetra-, hexa-, und okta-*myc**-Epitope generiert.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Isolierung von Proteinen

Isolierung von Proteinen aus *U. maydis*

Die Isolierung von Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde aus etwa 500 ml Flüssigkultur bei $OD_{600} \approx 0,5$ durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (3.000 Upm, 10 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R), mit Proteinextraktionspuffer gewaschen, erneut abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) und in 5 ml Proteinextraktionspuffer aufgenommen. Diese Suspension wurde in flüssigen Stickstoff getropft. Die dadurch entstehenden "Eiskügelchen" wurden in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Metallbecher der Retsch MM200-Zellmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Die Zellen wurden in der Zellmühle zweimal für 5 min bei einer Frequenz von 30 Hz geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Das tiefgefrorene "Zellmehl" wurde in, mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte, Greiner-Gefäße überführt und bei Bedarf bei -80 °C gelagert.

Bei "konventioneller" Proteinextraktion wurde eine beliebige Menge des gefrorenen Zellmehls mit 4 °C kaltem Proteinextraktionspuffer versetzt, und in Eppendorf-Gefäßen zentrifugiert (22.000 Upm, 30 Minuten, 4 °C, Beckman Avanti30) um Zelltrümmer zu pelletieren. Die Proteinmenge im Überstand wurde durch einen Proteinnachweis nach Bradford bestimmt.

Im Fall eines Rum1-Nachweises (siehe Kapitel 2.4.1) wurde ein Schnellpräparationsverfahren verwendet: Eine entsprechende Menge gefrorenen Zellmehls wurde in einem Eppendorf-Gefäß direkt mit 95 °C heißem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurde die Probe 30 sec bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand direkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Proteinextraktionspuffer:

2 mM Pefabloc (Roche)

5 mM Benzamidin

2 Tabletten Complete EDTA-free (Roche)

0,1% BSA (Sigma, Fraction V)

2% Glycerin

in TBST (0,05% Triton100; 50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 0,1% Tween 20)

Probenpuffer (6x):

300 mM Tris-Cl, pH 8,0

30% (v/v) Glycerin

20% (w/v) SDS

0,5 g/l Bromphenolblau

15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)

in $H_2O_{bid.}$

Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Proteinmengen wurden durch den Protein-Nachweis nach Bradford bestimmt (Ausubel *et al*., 1987).

Für jede Probe wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. 10 µl Proteinlösung wurden zusammen mit 200 µl Färbelösung 15 min in Dunkelheit inkubiert. Für die Eichgerade wurden Proteinlösungen definierter Konzentration hergestellt [0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml BSA (Sigma, BSA fraction V, A-6003) in Proteinextraktionspuffer] und wie die Proben behandelt. Eine Messung der Absorption erfolgte bei 590 nm in einem Mikrotiterplatten-Scanner (Microplate Reader Safire der Firma TECAN). Eichgerade und Proteinkonzentrationen in den Proben wurden durch das Programm XFLUOR4 v4.50 der Firma TECAN berechnet. Lagen die Proteinkonzentrationen der Proben außerhalb der Eichgeraden, wurden diese verdünnt und erneut gemessen.

Färbelösung:

70 mg Serva Blau G (Coomassie Brillant Blue G-250, Serva)

50 ml 100% EtOH

100 ml 85% (v/v) o-Phosphorsäure (Sigma P-6560)

mit $H_2O_{bid.}$ auf 1l aufgefüllt

4.4.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Proteinextrakte werden dabei unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein 1 mm dickes Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der Grenze der Gele aufgrund des pH-Sprungs verdichtet und anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Es wurden in der Regel 100 µg Proteinextrakt in einer Mini Protean II Apparatur (Biorad) bei 200 V für 1 h aufgetrennt. Für die Auftrennung von Proteinextrakten mit TAP*-markiertem Rum1- Protein wurden 6 %ige Trenngele und für die Auftrennung von Proteinextrakten mit Myc- bzw. Myc*-markierten Histondeacetylasen 8 %ige Trenngele verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbe-Lösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Als Proteingelmarker wurde der Prestained Protein Marker, Broadrange (NEB; Prod.-# P7708S) verwendet:

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

Proteingel-Laufpuffer:

25 mM Tris-Cl, pH 8,8
200 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS
in $H_2O_{bid.}$

Sammelgel:

125 mM Tris-Cl, pH 6,8
5 % (w/v) Acrylamid
0,13 % (w/v) Bisacrylamid
0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
0,1 % (v/v) TEMED
in $H_2O_{bid.}$

Trenngel:

375 mM Tris-Cl, pH 8,8
8 % bzw. 15 % (w/v) Acrylamid
0,27 % (w/v) Bisacrylamid
0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
0,1 % (v/v) TEMED
in $H_2O_{bid.}$

Coomassie-Färbelösung:

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
45 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
in $H_2O_{bid.}$

Entfärbe-Lösung:

45 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
in $H_2O_{bid.}$

4.4.3 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P von Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit $H_2O_{bid.}$ gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 1 mA/cm^2) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

Zur Detektion der immobilisierten Proteine wurde die Nitrozellulose-Membran nach Protein-Transfer für 10 min in Ponceaurot-Färbelösung gefärbt.

Anodenpuffer 1:

300 mM Tris-Cl, pH 10,4
15 % (v/v) Methanol
in $H_2O_{bid.}$

Anodenpuffer 2:

30 mM Tris-Cl, pH 10,4
15 % (v/v) Methanol
in $H_2O_{bid.}$

Kathodenpuffer:

25 mM Tris-Cl, pH 9,4
40 mM ε-Aminocapronsäure
15 % (v/v) Methanol
in $H_2O_{bid.}$

Ponceaurot-Färbelösung:

Essigsäure (v/v) 0,01 %
Trichloressigsäure (w/v) 0,15 %
Sulfonsalicylsäure (w/v) 0,15 %
Ponceaurot (w/v) 0,2 %
in $H_2O_{bid.}$

4.4.4 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst für 1 h mit 5 % Magermilch-pulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 45 min mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 0,5 % Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST und dreimal für 10 min mit PBS gewaschen.

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Kaninchen PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:2000, P-2026 Sigma, zur Detektion des TAP-Epitops; kein sekundärer Antikörper nötig!); monoklonaler Maus-Anti-Myc (Antikörper 9E10, in einer Verdünnung von 1:500) mit Ziege-Anti-Maus (HRP-gekoppelt, Prod. #W402B; Promega, in einer Verdünnung von 1:4000).

Zur Detektion wurden die frisch angesetzten Lösungen ECL I und ECL II zu gleichen Teilen gemischt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 5 min Exposition deutliche Banden zu erkennen.

TBST:

20 mM Tris-Cl, pH 7,6
136 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween 20
in $H_2O_{bid.}$

PBS:

20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
150 mM NaCl
1 mM Na_2-EDTA
in $H_2O_{bid.}$

ECL I:

100 mM Tris-Cl, pH 8,0
0,44% (v/v) p-Coumarinsäure (Sigma) in DMSO
1% (v/v) Luminol (Fluka) in DMSO
in $H_2O_{bid.}$

ECL II:

100 mM Tris-Cl, pH 8,0
0,018 % (v/v) H_2O_2
in $H_2O_{bid.}$

4.4.5 Immunpräzipitation

Kultivierung der *U. maydis*-Zellen und Proteinextraktion

U. maydis-Zellen wurden in IP-Medium bis zu einer OD_{600} = 0,5 inkubiert und Proteine wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben extrahiert.

Für die Immunpräzipitation wurde das gesamte Proteinextrakt verwendet, das aus 500 ml *U. maydis*-Kultur OD_{600} = 0,5 gewonnen wurde.

IP-Medium:

30 mM L-Glutamin
1 % (v/v) Vitaminlösung nach Holliday
6,25 % Salzlösung nach Holliday
1,5 % Glucose
in $H_2O_{bid.}$
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und sterilfiltriert

Kovalente Vernetzung von an Dynabeads gebundenen Antikörpern mit spezifischen Zweitantikörpern

Pro Reaktion wurden 50 µl Dynabead-Suspension mit immobilisierten Schaf-Anti-Maus Antikörpern verwendet (Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG). Jeweils 50 µl Dynabead-Suspension wurden in Eppendorfgefäßen 1 min bei RT mit einer Magnetvorrichtung der Firma Dynal isoliert und der Überstand verworfen. Die Eppendorfgefäße wurden aus der Magnetvorrichtung genommen und die Dynabeads mit KL-Puffer 1 resuspendiert.

Pro Reaktion wurden 5 µl des zu koppelnden Zweitantikörpers (Kaninchen-Anti-Schaf IgG, Z 0138, DAKO) mit 45 µl KL-Puffer 1 gemischt. Jeweils 50 µl Dynabead-Suspension wurden mit 50 µl Zweitantikörper-Lösung gemischt und 20 min bei RT auf einem Roller mit 40 Upm inkubiert. Danach wurden die Dynabeads über die Magnetvorrichtung isoliert, der Überstand verworfen und die Dynabeads in 100 µl KL-Puffer 1 resuspendiert. Die Dynabeads wurden abermals über die Magnetvorrichtung isoliert, der Überstand verworfen und in 100 µl 0,2 M Triethanolamin-Lösung, pH 8,2 resuspendiert. Nach einer weiteren Isolierung und Resuspension in 0,2 M Triethanolamin-Lösung, pH 8,2 wurden pro Reaktion 2,5 mg Dimethylphthalat (DMP; Carl Roth) zugegeben und die Eppendorfgefäße 30 min bei RT auf einem Roller bei 40 Upm inkubiert. Die Dynabeads wurden danach isoliert und in 100 µl 50 mM Tris pH 7,5 resuspendiert um die Vernetzungsreaktion zu stoppen. Danach wurden die Dynabeads dreimal mit KL-Puffer 2 gewaschen und schließlich in 50 µl KL-Puffer 2 resuspendiert.

KL-Puffer 1:

0,1 M PBS
0,1 % BSA
in $H_2O_{bid.}$
pH 8,2

KL-Puffer 2:

0,1 M PBS
0,1 % BSA
in $H_2O_{bid.}$
pH 7,5

Immunpräzipitation

Alle Arbeitsschritte für die Immunpräzipitation wurden bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Pro Reaktion wurden 10 µl 10 % BSA in TBST, pH 7,5 zu den Dynabeads gegeben. Danach wurde die Probe (Proteinextrakt) zugegeben und 30 min auf einem Drehrad bei 40 Upm inkubiert. Danach wurden die Dynabeads mit der Magnetvorrichtung isoliert und der Überstand verworfen. Nach vier Waschschritten mit 4 °C kaltem KL-Puffer 2 wurden die Dynabeads abermals isoliert, der Überstand verworfen und mit 30 µl 94 °C heißem 1x Auftragspuffer versetzt. Die Proben wurden 5 sec bei 13.000 g zentrifugiert und die Überstände direkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

4.5 Transkriptomanalyse

Wachstumsbedingungen

Um *U. maydis*-Zellen für eine Transkriptom-Analyse zu kultivieren, wurden auf Vollmedium frisch ausgestrichene *U. maydis*-Stämme in Array-Minimalmedium zunächst als Vorkultur über Nacht bei 28 °C in einem Volumen von 20 ml bei 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und im selben Medium mit einer Konzentration von etwa drei OD_{600}-Werten pro ml resuspendiert. Die Hauptkultur wurde in einem Gesamtvolumen von 100 ml bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 28 °C und 200 Upm inkubiert. Zellen wurden anschließend pelletiert und zusammen mit Glaskugeln in 2 ml Eppendorf-Gefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

RNA-Isolierung nach Trizol-Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präpatation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen in Flüssigmedium verwendet. Zum tiefgefrorenen Zellpellet im Eppendorfgefäß wurde 1 ml Trizol zugegeben. Der Ansatz wurde kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen (150212 microns; Sigma) für 5 min auf einer Retsch-Kugelmühle bei 30 Hz homogenisiert. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben, kurz gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 15 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (13.000 Upm, 4 °C, 15 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) wurde die pelletierte RNA mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500 g, 4 °C, 5 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 10 min bei RT getrocknet, in 50-100 µl RNAse-freiem H_2O aufgenommen und bei 55 °C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch Auftrag auf ein Agarosegel, photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spetrophotometer, sowie Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer®. Details zum Agilent 2100-Bioanalyzer® siehe Herstellerangaben bzw. Herstellerprotokoll.

RNA-Aufreinigung nach RNeasy-Protokoll

100 µl gelöste RNA wurde mit 350 µl Puffer RLT und 250 µl 100 % EtOH gemischt. Dieser Ansatz wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE wurde die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt bei 10.000 Upm, 2 min. Anschließend wurde die Säule erneut zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix gegeben und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Das Eluat wurde für eine Wiederholung des Schrittes eingesetzt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll der Firma hervor.

cDNA-Synthese nach dem Affymetrix-Protokoll: Ein-Schritt-Amplifikation

Alle nachfolgenden Schritte der Ein-Schritt-Amplifikation sind im "GeneChip® Expression Analysis Technical Manual" der Firma Affymetrix näher beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

Zur Synthese eines cDNA-Erststranges wurden 5 µg gereinigte RNA (nach photometrischer Konzentrationsbestimmung) und 100 pmol T7(dT)-Primer in einem Volumen von 20 µl für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Ansatz auf Eis gestellt, mit 4 µl 5x Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und für 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl SuperScript II RT (Gibco) wurde die Mischung für 1 h bei 50 °C inkubiert.

Zur Zweitstrangsynthese wurde der oben beschriebene Ansatz mit 91 µl H_2O, 30 µl 5x Zweitstrangpuffer, 3 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *E. coli*-DNA-Ligase (10 U/ml), 4 µl *E. coli*-DNA-Polymerase I und 1 µl *E. coli*-RNaseH versetzt und für 2 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase zugegeben, der Ansatz für weitere 5 min bei 16 °C inkubiert und die

Reaktion mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Diese Methode orientiert sich an den Protokollen der Firmen Affymetrix und Invitrogen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

cDNA-Aufreinigung

600 µl cDNA-Bindepuffer wurden zu 162 µl cDNA gegeben, der Ansatz kurz gevortext und auf eine cDNA-Reinigungssäule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 Upm, RT wurde die Säule mit 750 µl cDNA-Waschpuffer gewaschen und erneut für 1 min bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Die Elution der cDNA erfolgte mit 14 µl cDNA-Elutionspuffer und einminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm, RT. Eine Qualitätskontrolle der cDNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer®. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

cRNA-Synthese, *in vitro*-Transkription

Die in vitro-Transkription erfolgte mit dem BioArray-HighYield-RNA Transcript Labelling Kit (Enzo). Dabei wurde die Gesamtmenge der verfügbaren cDNA (12 µl) mit 4 µl 10x HY-Puffer, 4 µl 10x RNase-Inhibitoren und 2 µl 20x T7-RNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 40 µl versetzt. Die Komponenten wurden kurz gevortext, abzentrifugiert und anschließend bei 37 °C für 16 h inkubiert. Nach jeweils 30 min wurde der Ansatz bei 750 Upm für 30 sec geschüttelt. Diese Methode oreintiert sich am Protokoll der Firma Enzo; die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll der Firma hervor.

cRNA-Aufreinigung

60 µl H2O wurden zum Gesamtvolumen der in vitro-Transkripions-Reaktion pipettiert und für 3 sec gevortext. Der Ansatz wurde mit 350 µl IVT-cRNA-Bindepuffer versetzt und erneut für 3 sec gevortext. Anschließend wurden 250 µl 100 % EtOH zugegeben und die Lösung durch Pipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde auf IVT-cRNA-Säulen aufgetragen und für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl IVT-cRNA-Waschpuffer wurden die Säulen erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Es wurden 500 µl 80 % EtOH zugegeben und die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen der Flüssigkeit wurde die Säule für 5 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Zur Elution der cRNA wurden 11 µl H_2O auf die Matrix pipettiert, die Säule für 1 min bei RT inkubiert, für 1 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert, erneut mit 10 µl H_2O versetzt, erneut für 1 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Eine Qualitätskontrolle der cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer® und durch photometrische Messung. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Quiagen; die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll der Firma hervor.

cRNA-Fragmentierung

20 µl cRNA wurden für eine cRNA-Fragmentierungsreaktion eingesetzt, die sich am Protokoll der Firma Affymetrix orientiert. 20 µl cRNA wurden dafür mit 8 µl Mg^{2+}-haltigem 5x Fragmentations-Puffer und H_2O in einem Gesamtvolumen von 40 µl gemischt. Dieser Ansatz wurde 35 min bei 94 °C inkubiert und anschließend auf Eis gehalten. Eine Qualitätskontrolle der fragmentierten cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer®. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll der Firma hervor.

Array-Hybridisierung

15 µl fragmentierte cRNA wurden mit 5 µl Kontrolloligo B2, 15 µl 20x Hybridisierungskontrollen, 3 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 3 µl BSA und 150 µl 2x Hybridisierungspuffer in einem Gesamtvolumen von 300 µl gemischt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 99 °C erhitzt, dann für 5 min bei 45 °C inkubiert und 5 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. 200 µl des Überstands wurden in den Mikrochip pipettiert, der zuvor mit 200 µl 1x Hybridisierungspuffer bei 45 °C für 10 min äquilibriert worden war. Nach Verschließen der Chip-Septen mit Klebeband wurde der Chip bei 45 °C und 60 Upm für 16-18 h hybridisiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

Array-Detektionsreaktion

Nach der Hybridisierung wurde der Chip entleert und mit 300 µl Waschpuffer A befüllt. Die Nachweisreaktionen wurden mit einem SAPE-Mix, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl, sowie einer Antikörpermischung, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Ziegen-IgG (10 mg/ml) und 3,6 µl biotinyliertem Antikörper (0,5 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl durchgeführt. Es wurde das EuGE-WS2v4-Programm für sämtliche Wasch- und Detektionsschritte verwendet. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll der Firma hervor.

Datenanalyse

Nach Abschluss der Wasch- und Markierungsschritte wurden die Arrays mit Hilfe eines GeneArray Scanners (Agilent/Affymetrix) bzw. eines Affymetrix GeneChip Scanners (Affymetrix) eingelesen. Das resulterende Bild wurde zunächst durch Verwendung des Programms AFFYMETRIX MICROARRAY SUITE 5.0 (Affymetrix) ausgewertet, normalisiert und die Expressionswerte kalkuliert. Ein Auswertung der Transkriptom-Vergleich wurde mit Hilfe des Programms dChip 2004 (Li und Hung Wong, 2001) durchgeführt. Bei der vergleichenden Analyse der Experiment-Microarrays mit den Kontroll-Microarrays wurden Gene herausgefiltert, die mindestens zweifach hoch- oder runterreguliert waren. Bei der Berechnung der faktoriellen Veränderung der Genexpression wurde ein Vertrauensintervall von 90% ("lower confidence bound of fold change") vorgegeben, welches unter anderem den Standardfehler der Expressionswerte berücksichtigt und eine eher konservative Beurteilung der faktoriellen Veränderung darstellt (Li und Hung Wong, 2001).

5 Literaturverzeichnis

Aasland, R., Gibson, T. J. and Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* **20**, 56-59.

Agulnik, M., Mattei, Borsani, Avner, Lerner, Bishop. (1994). A novel X gene with a widely transcribed Y-linked homologue escapes X-inactivation in mouse and human. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 879-884.

Ahmed, S., Palermo, C., Wan, S. and Walworth, N. C. (2004). A novel protein with similarities to Rb binding protein 2 compensates for loss of Chk1 function and affects histone modification in fission yeast. *Mol Cell Biol* **24**, 3660-3669.

Ahringer, J. (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* **16**, 351-356.

Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Strukl, K. (1987). Current Protokols in Molecular Biology. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Ayoub, N., Noma, K., Isaac, S., Kahan, T., Grewal, S. I. and Cohen, A. (2003). A novel jmjC domain protein modulates heterochromatization in fission yeast. *Mol Cell Biol* **23**, 4356-4370.

Bailey, T. L. and Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems für Molecular Biology*, 28-36.

Bailey, T. L. and Gribskov, M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* **14**, 48-54.

Balciunas, D. and Ronne, H. (2000). Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors. *Trends Biochem Sci* **25**, 274-276.

Banks, G. R., Shelton, P. A., Kanuga, N., Holden, D. W. and Spanos, A. (1993). The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-124.

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

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

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

Barrett, A., Madsen, B., Copier, J., Lu, P. J., Cooper, L., Scibetta, A. G., Burchell, J. and Taylor-Papadimitriou, J. (2002). PLU-1 nuclear protein, which is upregulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? *Int J Cancer* **101**, 581-588.

Benevolenskaya, E. V., Murray, H. L., Branton, P., Young, R. A. and Kaelin, W. G., Jr. (2005). Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. *Mol Cell* **18**, 623-635.

Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 142-148.

Bernstein, B. E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas, E. J., 3rd, Gingeras, T. R. *et al.* (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**, 169-181.

Bernstein, B. E., Tong, J. K. and Schreiber, S. L. (2000). Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13708-13713.

Bjorses, P., Halonen, M., Palvimo, J. J., Kolmer, M., Aaltonen, J., Ellonen, P., Perheentupa, J., Ulmanen, I. and Peltonen, L. (2000). Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet* **66**, 378-392.

Bohlmann, R. (1996). Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. and Kahmann, R. (1995). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* **73**, 320-325.

Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.

Borges, A. C. and Gomes, S. L. (2000). PEST sequences in cAMP-dependent protein kinase subunits of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* are necessary for in vitro degradation by endogenous proteases. *Mol Microbiol* **36**, 926-939.

Borges-Walmsley, M. I. and Walmsley, A. R. (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* **8**, 133-141.

Börner, H. (1997). Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.

Bottin, A., Kämper, J. and Kahmann, R. (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.

Bottomley, M. J., Stier, G., Pennacchini, D., Legube, G., Simon, B., Akhtar, A., Sattler, M. and Musco, G. (2005). NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* **280**, 11505-11512.

Brachmann, A. (1995). Suche nach frühen *b*-regulierten Genen in *Ustilago maydis* mit Hilfe der Methode des "Differential Display". Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Brachmann, A. (2001a). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. and Kahmann, R. (2001b). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.

Brefeld, O. (1883). Botanische Untersuchungen über Hefenpilze. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Leipzig.

Bürglin, T. R. (1994). A comprehensive classification of homeobox genes. In *Guidebook to the homeobox genes*, (ed. D. Duboule), pp. 27-71. Oxford: Oxford University Press.

Capili, A. D., Schultz, D. C., Rauscher, I. F. and Borden, K. L. (2001). Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *Embo J* **20**, 165-177.

Carrozza, M. J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S. K., Lee, K. K., Shia, W. J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M. P. *et al.* (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**, 581-592.

Chan, S. W. and Hong, W. (2001). Retinoblastoma-binding protein 2 (Rbp2) potentiates nuclear hormone receptor-mediated transcription. *J-Biol. Chem,* **276**, 28402-28412.

Chen, Z., Zang, J., Whetstine, J., Hong, X., Davrazou, F., Kutateladze, T. G., Simpson, M., Mao, Q., Pan, C. H., Dai, S. *et al.* (2006). Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* **125**, 691-702.

Christensen, J. J. (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am Phytopathol Soc Monogram* **2**.

Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O. and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.

Clayton, A. L., Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (2006). Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol Cell* **23**, 289-296.

Clissold, P. M. and Ponting, C. P. (2001). JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends Biochem Sci* **26**, 7-9.

Cloos, P. A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K. H. and Helin, K. (2006). The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* **442**, 307-311.

Cohen, S., Chang, A. C. Y. and Hse, C. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E.coli* R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2110-2114.

Cokol, M., Nair, R. and Rost, B. (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* **1**, 411-415.

Collins, R. T., Furukawa, T., Tanese, N. and Treisman, J. E. (1999). Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *Embo J* **18**, 7029-7040.

Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. *et al.* (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545-553.

Dallas, P. B., Pacchione, S., Wilsker, D., Bowrin, V., Kobayashi, R. and Moran, E. (2000). The human SWI-SNF complex protein p270 is an ARID family member with non-sequence-specific DNA binding activity. *Mol Cell Biol* **20**, 3137-3146.

Dann, C. E., 3rd, Bruick, R. K. and Deisenhofer, J. (2002). Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15351-15356.

Davie, J. R. and Chadee, D. N. (1998). Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**, 203-213.

De Nadal, E., Zapater, M., Alepuz, P. M., Sumoy, L., Mas, G. and Posas, F. (2004). The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature* **427**, 370-374.

Deckert, J. and Struhl, K. (2001). Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* **21**, 2726-2735.

Defeo-Jones, D., Huang, P. S., Jones, R. E., Haskell, K. M., Vuocolo, G. A., Hanobik, M. G., Huber, H. E. and Oliff, A. (1991). Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **352**, 251-254.

Deplus, R., Brenner, C., Burgers, W. A., Putmans, P., Kouzarides, T., de Launoit, Y. and Fuks, F. (2002). Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res* **30**, 3831-3838.

Dora, E. G., Rudin, N., Martell, J. R., Esposito, M. S. and Ramirez, R. M. (1999). RPD3 (REC3) mutations affect mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **35**, 68-76.

Dürrenberger, F., Laidlaw, R. D. and Kronstad, J. W. (2001). The *hgl1* gene is required for dimorphism and teliospore formation in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **41**, 337-348.

Dyson, M. H., Rose, S. and Mahadevan, L. C. (2001). Acetyllysine-binding and function of bromodomain-containing proteins in chromatin. *Front Biosci* **6**, D853-D865.

Dyson, M. H., Thomson, S., Inagaki, M., Goto, H., Arthur, S. J., Nightingale, K., Iborra, F. J. and Mahadevan, L. C. (2005). MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *J Cell Sci* **118**, 2247-2259.

Elkins, J. M., Hewitson, K. S., McNeill, L. A., Seibel, J. F., Schlemminger, I., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. and Schofield, C. J. (2003). Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *J Biol Chem* **278**, 1802-1806.

Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M. and Harrison, S. C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* **8**, 970-980.

Fair, K., Anderson, M., Bulanova, E., Mi, H., Tropschug, M. and Diaz, M. O. (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* **21**, 3589-3597.

Fattaey, A. R., Helin, K., Dembski, M. S., Dyson, N., Harlow, E., Vuocolo, G. A., Hanobik, M. G., Haskell, K. M., Oliff, A., Defeo-Jones, D. *et al.* (1993). Characterization of the retinoblastoma binding proteins RBP1 and RBP2. *Oncogene* **8**, 3149-3156.

Fazzio, T. G., Kooperberg, C., Goldmark, J. P., Neal, C., Basom, R., Delrow, J. and Tsukiyama, T. (2001). Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **21**, 6450-6460.

Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C. D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**, 475-479.

Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J. and Perez-Martin, J. (2006). Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**, 2369-2387.

Fodor, B. D., Kubicek, S., Yonezawa, M., O'Sullivan, R. J., Sengupta, R., Perez-Burgos, L., Opravil, S., Mechtler, K., Schotta, G. and Jenuwein, T. (2006). Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev* **20**, 1557-1562.

Forneris, F., Binda, C., Dall'Aglio, A., Fraaije, M. W., Battaglioli, E. and Mattevi, A. (2006). A highly specific mechanism of histone H3-K4 recognition by histone demethylase LSD1. *J Biol Chem* **281**, 35289-35295.

Forsberg, E. C., Downs, K. M., Christensen, H. M., Im, H., Nuzzi, P. A. and Bresnick, E. H. (2000). Developmentally dynamic histone acetylation pattern of a tissue-specific chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14494-14499.

Fotheringham, S. and Holloman, W. K. (1989). Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes. *Mol Cell Biol* **9**, 4052-4055.

Fukuda, M. and Itoh, T. (2004). Slac2-a/melanophilin contains multiple PEST-like sequences that are highly sensitive to proteolysis. *J Biol Chem* **279**, 22314-22321.

Garcia-Muse, T., Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.

Gehring, W. J., Affolter, M. and Bürglin, T. (1994). Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 487-526.

Gibbons, R. J., Bachoo, S., Picketts, D. J., Aftimos, S., Asenbauer, B., Bergoffen, J., Berry, S. A., Dahl, N., Fryer, A., Keppler, K. *et al.* (1997). Mutations in transcriptional regulator ATRX establish the functional significance of a PHD-like domain. *Nat Genet* **17**, 146-148.

Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. and Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.

Gold, S. E., Bakkeren, G., Davies, J. E. and Kronstad, J. W. (1994). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**, 225-230.

Grant, P. A., Eberharter, A., John, S., Cook, R. G., Turner, B. M. and Workman, J. L. (1999). Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 5895-5900.

Gray, S. G., Iglesias, A. H., Lizcano, F., Villanueva, R., Camelo, S., Jingu, H., Teh, B. T., Koibuchi, N., Chin, W. W., Kokkotou, E. *et al.* (2005). Functional characterization of JMJD2A, a histone deacetylase- and retinoblastoma-binding protein. *J Biol Chem* **280**, 28507-28518.

Gregory, P. D., Wagner, K. and Horz, W. (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res* **265**, 195-202.

Gregory, S. L., Kortschak, R. D., Kalionis, B. and Saint, R. (1996). Characterization of the dead ringer gene identifies a novel, highly conserved family of sequence-specific DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **16**, 792-799.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.

Guarro, J., GeneJ and Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **12**, 454-500.

Gutierrez, G. M., Kong, E. and Hinds, P. W. (2005). Master or slave: the complex relationship of RBP2 and pRb. *Cancer Cell* **7**, 501-502.

Hale, R. S. and Thompson, G. (1998). Codon optimization of the gene encoding a domain from human type 1 neurofibromin protein results in a threefold improvement in expression level in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **12**, 185-188.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E.coli*: IRL Press.

Harrison, S. C. (1991). A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* **353**, 715-719.

Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L. and Ayer, D. E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* **89**, 341-347.

Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (2005). Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at c-fos and c-jun. *PLoS Biol* **3**, e393.

Herman, D. and Calderone, R. (2002). Pathogenic Development of *Candida albicans*. *Molecular Biology of Fungal Development*, 477-512.

Herrscher, K., Lelsz, Das, Scheuermann, Tucker. (1995). The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright, a B-cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes Dev* **9**, 3067-3082.

Hoffmann, C. S. and Winston, F. (1987). A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation in *E.coli*. *Gene* **57**, 267-272.

Holden, D. W., Kronstad, J. W. and Leong, S. A. (1989). Mutation in a heat-regulated hsp70 gene of *Ustilago maydis*. *Embo J* **8**, 1927-1934.

Holliday, R. (1961). The genetics of *U. maydis*. *Genet Res Comb* **2**, 204-230.

Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. New York: Plenum Press.

Huber, S. M., Lottspeich, F. and Kämper, J. (2002). A gene that encodes a product with similarity to dioxygenases is highly expressed in teliospores of *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **267**, 757-771.

Huh, S., Hatini, V., Marcus, R. C., Li, S. C. and Lai, E. (1999). Dorsal-ventral patterning defects in the eye of BF-1-deficient mice associated with a restricted loss of shh expression. *Dev Biol* **211**, 53-63.

Hurst, H. C. (1995). Transcription factors1: bZIP proteins. *Protein Profile* **2**, 101-168.

Innis, M. A. and Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs. San Diego: Academic Press.

Irniger, S. and Braus, G. H. (2003). Controlling transcription by destruction: the regulation of yeast Gcn4p stability. *Curr Genet* **44**, 8-18.

Iwahara, J. and Clubb, R. T. (1999). Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *Embo J* **18**, 6084-6094.

Iwase, S., Januma, A., Miyamoto, K., Shono, N., Honda, A., Yanagisawa, J. and Baba, T. (2004). Characterization of BHC80 in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 601-608.

Jamnischek, A. (2003). Charakterisierung von Interaktionspartnern der Homeodomänenproteine bE und bW und Untersuchungen zur chromatinvermittelten Regulation der pathogenen Differenzierung von *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.

Jensen, L. R., Amende, M., Gurok, U., Moser, B., Gimmel, V., Tzschach, A., Janecke, A. R., Tariverdian, G., Chelly, J., Fryns, J. P. *et al.* (2005). Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **76**, 227-236.

Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.

Kadosh, D. and Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89**, 365-371.

Kadosh, D. and Struhl, K. (1998). Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev* **12**, 797-805.

Kahmann, R., Romeis, T., Bölker, M. and Kämper, J. (1995). Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 559-564.

Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Muller, O. *et al*. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.

Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.

Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, R. M., Jang, M. K., Lenardo, M. J. and Ozato, K. (2004). Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol Cell* **13**, 33-43.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. and Zinkernagel, R. M. (1998). Medizinische Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M. and Kirschner, M. W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652-1659.

Klose, R. J., Kallin, E. M. and Zhang, Y. (2006a). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* **7**, 715-727.

Klose, R. J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y. (2006b). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* **442**, 312-316.

Kojic, M. and Holloman, W. K. (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol* **46**, 333-338.

Kornberg, R. D. (1999). Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol* **9**, M46- M49.

Kortschak, R. D., Tucker, P. W. and Saint, R. (2000). ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem Sci* **25**, 294-299.

Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 40-48.

Kronstad, J. (1997). Virulence and cAMP in smuts, blasts and blights. *Trends Plant Sci.* **2**, 193-199.

Kronstad, J. W. and Leong, S. A. (1989). Isolation of two alleles of the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 978-982.

Kronstad, J. W. and Leong, S. A. (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-1395.

Kurdistani, S. K. and Grunstein, M. (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 276-284.

Kurdistani, S. K., Robyr, D., Tavazoie, S. and Grunstein, M. (2002). Genome-wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast. *Nat Genet* **31**, 248-254.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-120.

Ladendorf, O. (2003). Transposition und heterologe Genexpression in *Ustilago maydis*. Dissertation Philipps-Universität, Marburg.

Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R. and Tjian, R. (2003). Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**, 365-376.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-683.

Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E. and Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* **89**, 349-356.

Lee, M. G., Wynder, C., Bochar, D. A., Hakimi, M. A., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2006). Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes. *Mol Cell Biol* **26**, 6395-6402.

Li, C. and Hung Wong, W. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2**, 28-32.

Liang, G., Lin, J. C., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J. C., Nguyen, C. T., Weisenberger, D. J., Egger, G., Takai, D., Gonzales, F. A. *et al.* (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7357-7362.

Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.

Loyola, A. and Almouzni, G. (2004). Bromodomains in living cells participate in deciphering the histone code. *Trends Cell Biol* **14**, 279-281.

Lu, P. J., Sundquist, K., Baeckstrom, D., Poulsom, R., Hanby, A., Meier-Ewert, S., Jones, T., Mitchell, M., Pitha-Rowe, P., Freemont, P. *et al.* (1999). A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *J Biol Chem* **274**, 15633-15645.

Lu, Z., Szafron, D., Greiner, R., Lu, P., Wishart, D. S., Poulin, B., Anvik, J., Macdonell, C. and Eisner, R. (2004). Predicting Subcellular Localization of Proteins using Machine-Learned Classifiers. *Bioinformatics* **20**, 547-556.

Madsen, B., Tarsounas, M., Burchell, J. M., Hall, D., Poulsom, R. and Taylor-Papadimitriou, J. (2003). PLU-1, a transcriptional repressor and putative testis-cancer antigen, has a specific expression and localisation pattern during meiosis. *Chromosoma* **112**, 124-132.

Mao, S., Neale, G. A. and Goorha, R. M. (1997a). T-cell oncogene rhombotin-2 interacts with retinoblastoma-binding protein 2. *Oncogene* **14**, 1531-1539.

Mao, S., Neale, G. A. and Goorha, R. M. (1997b). T-cell proto-oncogene rhombotin-2 is a complex transcription regulator containing multiple activation and repression domains. *J Biol Chem* **272**, 5594-5599.

Marie, N., Lindsay, A. J. and McCaffrey, M. W. (2005). Rab coupling protein is selectively degraded by calpain in a Ca2+-dependent manner. *Biochem J* **389**, 223-231.

Martin, C. and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 838-849.

Martinez, L. O., Agerholm-Larsen, B., Wang, N., Chen, W. and Tall, A. R. (2003). Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J Biol Chem* **278**, 37368-37374.

Matangkasombut, O. and Buratowski, S. (2003). Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol Cell* **11**, 353-363.

Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J. M., Schneider, R., Peters, A. H., Gunther, T., Buettner, R. and Schule, R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**, 436-439.

Neubuser, A., Koseki, H. and Balling, R. (1995). Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev Biol* **170**, 701-716.

Nixon, J. C., Rajaiya, J. and Webb, C. F. (2004). Mutations in the DNA-binding domain of the transciption factor Bright , act as dominant negative proteins and interffere with immunoglobulin transactivation. *J-Biol. Chem,* **278**, 52465-52472.

O'Connell, S., Wang, L., Robert, S., Jones, C. A., Saint, R. and Jones, R. S. (2001). Polycomblike PHD fingers mediate conserved interaction with enhancer of zeste protein. *J Biol Chem* **276**, 43065-43073.

Pamblanco, M., Poveda, A., Sendra, R., Rodriguez-Navarro, S., Perez-Ortin, J. E. and Tordera, V. (2001). Bromodomain factor 1 (Bdf1) protein interacts with histones. *FEBS Lett* **496**, 31-35.

Papenfort, K. (2005). Funktionelle Charakterisierung der PLU-Domäne des Rum1-Proteins aus dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis*. Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg.

Pascual, J., Martinez-Yamout, M., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (2000). Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor. *J Mol Biol* **304**, 723-729.

Patsialou, A., Wilsker, D. and Moran, E. (2005). DNA-binding properties of ARID family proteins. *Nucleic Acids Res* **33**, 66-80.

Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K. and Balling, R. (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* **12**, 2735-2747.

Prochasson, P., Neely, K. E., Hassan, A. H. and Workman, J. L. (2003). Targeting activity is required for SWI/SNF function in vivo and is accompished through two partially redundant activator-interaction domains. *Mol. Cell* **12**, 983-990.

Puhalla, J. E. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-474.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.

Quadbeck-Seeger, C. (1998). Identifizierung eines Regulators für *b*-regulierte Gene in *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Quadbeck-Seeger, C., Wanner, G., Huber, S., Kahmann, R. and Kämper, J. (2000). A protein with similarity to the human retinoblastoma binding protein 2 acts specifically as a repressor for genes regulated by the b mating type locus in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **38**, 154-166.

Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-271.

Reichmann, M. (2002). Isolierung und Analyse haploider *Ustilago maydis* Stämme, die ein *b*-abhängiges Expressionsmuster zeigen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Reichmann, M., Jamnischek, A., Weinzierl, G., Ladendorf, O., Huber, S., Kahmann, R. and Kämper, J. (2002). The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for teliospore development. *Mol Microbiol* **46**, 1169-1182.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1030-1032.

Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N. and Grunstein, M. (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**, 437-446.

Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R. and Kämper, J. (2000). Identification of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.

Rowell, J. B. and DeVay, J. E. (1954). Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**, 356-362.

Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Suka, N., Turner, B. M. and Grunstein, M. (1998). Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* **392**, 831-835.

Saha, V., Chaplin, T., Gregorini, A., Ayton, P. and Young, B. D. (1995). The leukemia-associated-protein (LAP) domain, a cysteine-rich motif, is present in a wide range of proteins, including MLL, AF10, and MLLT6 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9737-9741.

Sakamoto, S., Potla, R. and Larner, A. C. (2004). Histone deacetylase activity is required to recruit RNA polymerase II to the promoters of selected interferon-stimulated early response genes. *J Biol Chem* **279**, 40362-40367.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.

Sanchez-Martinez, C. and Perez-Martin, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* - similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* **4**, 214-221.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulsen, A. R. (1977). DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.

Schauwecker, F., Wanner, G. and Kahmann, R. (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 617-625.

Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. and Kämper, J. (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-2401.

Schlesinger, R., Kahmann, R. and Kämper, J. (1997). The homeodomains of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol Gen Genet* **254**, 514-519.

Schmitt, M. E., Brown, T. A. and Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Acids Res* **18**, 3091-3102.

Schubeler, D., MacAlpine, D. M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D. E., O'Neill, L. P., Turner, B. M., Delrow, J. *et al*. (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* **18**, 1263-1271.

Schultz, D. C., Friedman, J. R. and Rauscher, F. J., 3rd. (2001). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* **15**, 428-443.

Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, 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**, 295-306.

Sgarlata, C. and Perez-Martin, J. (2005). Inhibitory phosphorylation of a mitotic cyclin-dependent kinase regulates the morphogenesis, cell size and virulence of the smut fungus *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **118**, 3607-3622.

Shandala, T., Kortschak, R. D. and Saint, R. (2002). The Drosophila retained/dead ringer gene and ARID gene family function during development. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 423-430.

Shi, Y. J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T. and Shi, Y. (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* **19**, 857-864.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A. and Casero, R. A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953.

Silverstein, R. A. and Ekwall, K. (2005). Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet* **47**, 1-17.

Sims, R. J., 3rd, Nishioka, K. and Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* **19**, 629-639.

Sinha, A., Faller, D. V. and Denis, G. V. (2005). Bromodomain analysis of Brd2-dependent transcriptional activation of cyclin A. *Biochem J* **387**, 257-269.

Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.

Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1993a). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**, 347-355.

Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1993b). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.

Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**, 347-355.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.

Spelling, T., Bottin, A. and Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.

Spencer, V. A. and Davie, J. R. (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**, 1-12.

Spencer, V. A. and Davie, J. R. (2001). Dynamically acetylated histone association with transcriptionally active and competent genes in the avian adult beta-globin gene domain. *J Biol Chem* **276**, 34810-34815.

Spotswood, H. T. and Turner, B. M. (2002). An increasingly complex code. *J Clin Invest* **110**, 577-582.

Stemmer, W. P., Crameri, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. and Heyneker, H. L. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* **164**, 49-53.

Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.

Suka, N., Carmen, A. A., Rundlett, S. E. and Grunstein, M. (1998). The regulation of gene activity by histones and the histone deacetylase RPD3. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 391-399.

Takeuchi, T., Watanabe, Y., Takano-Shimizu, T. and Kondo, S. (2006). Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn* **235**, 2449-2459.

Takeuchi, T., Yamazaki, Y., Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Kondo, S., Motoyama, J. and Higashinakagawa, T. (1995). Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev* **9**, 1211-1222.

Tan, K., Shaw, A. L., Madsen, B., Jensen, K., Taylor-Papadimitriou, J. and Freemont, P. S. (2003). Human PLU-1 Has transcriptional repression properties and interacts with the developmental transcription factors BF-1 and PAX9. *J Biol Chem* **278**, 20507-20513.

Taunton, J., Hassig, C. A. and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411.

Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. and Schreiber, S. L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* **395**, 917-921.

Topp, C. N., Ruiz-Herrera, J., Martinez-Espinoza, A. D. and Gold, S. E. (2002). Integration of the gene for carboxin resistance does not impact the *Ustilago maydis*-maize interaction. *Curr Microbiol* **44**, 67-70.

Torreblanca, J., Stumpferl, S. and Basse, C. W. (2003). Histone deacetylase Hda1 acts as repressor of the *Ustilago maydis* biotrophic marker gene *mig1*. *Fungal Genet Biol* **38**, 22-32.

Truckses, D. M., Garrenton, L. S. and Thorner, J. (2004). Jekyll and Hyde in the microbial world. *Science* **306**, 1509-1511.

Trueheart, J. and Herskowitz, I. (1992). The a locus governs cytoduction in *Ustilago maydis*. *J Bacteriol* **174**, 7831-7833.

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-816.

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

Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-845.

Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchock, B. A. and Blobel, G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* **19**, 381-391.

van Ingen, H., Lasonder, E., Jansen, J. F., Kaan, A. M., Spronk, C. A., Stunnenberg, H. G. and Vuister, G. W. (2004). Extension of the binding motif of the Sin3 interacting domain of the Mad family proteins. *Biochemistry* **43**, 46-54.

Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* **87**, 95-104.

Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1998). Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol* **8**, 96-108.

Wahl, R. (2005). Konstruktion von temperatursensitiven bE/bW Heterodimeren in *Ustilago maydis*. Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg.

Wang, A., Kurdistani, S. K. and Grunstein, M. (2002). Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science* **298**, 1412-1414.

Wang, J., Holden, D. W. and Leong, S. A. (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 865-869.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, L. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y. *et al.* (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. *Science* **306**, 279-283.

Wang, Z., Goldstein, A., Zong, R. T., Lin, D., Neufeld, E. J., Scheuermann, R. H. and Tucker, P. W. (1999). Cux/CDP homeoprotein is a component of NF-muNR and represses the immunoglobulin heavy chain intronic enhancer by antagonizing the bright transcription activator. *Mol Cell Biol* **19**, 284-295.

Weber, H. (1993). Allgemeine Mykologie. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Weinzierl, G. (2001). Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der *b*-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.

Whetstine, J. R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M. *et al.* (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**, 467-481.

Wilsker, D., Patsialou, A., Zumbrun, S. D., Kim, S., Chen, Y., Dallas, P. B. and Moran, E. (2004). The DNA-binding properties of the ARID-containing subunits of yeast and mammalian SWI/SNF complexes. *Nucleic Acids Res* **32**, 1345-1353.

Wilsker, P., Dallas, Moran. (2002). ARID-Proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation and development. *Cell Growth Differ* **13**, 95-106.

Wu, J., Ellison, J., Salido, E., Yen, P., Mohandas, T. and Shapiro, L. J. (1994a). Isolation and characterization of XE169, a novel human gene that escapes X-inactivation. *Hum Mol Genet* **3**, 153-160.

Wu, J., Salido, E. C., Yen, P. H., Mohandas, T. K., Heng, H. H., Tsui, L. C., Park, J., Chapman, V. M. and Shapiro, L. J. (1994b). The murine Xe169 gene escapes X-inactivation like its human homologue. *Nat Genet* **7**, 491-496.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A. J., Chait, B. T., Badenhorst, P. *et al.* (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**, 86-90.

Yamagoe, S., Kanno, T., Kanno, Y., Sasaki, S., Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Humphrey, G., Wang, Y., Nakatani, Y., Howard, B. H. *et al.* (2003). Interaction of histone acetylases and deacetylases *in vivo*. *Mol Cell Biol* **23**, 1025-1033.

Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y. (2006). JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **125**, 483-495.

Yang, L., Mei, Q., Zielinska-Kwiatkowska, A., Matsui, Y., Blackburn, M. L., Benedetti, D., Krumm, A. A., Taborsky, G. J., Jr. and Chansky, H. A. (2003). An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B. *Biochem J* **369**, 651-657.

Yang, X. J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* **26**, 1076-1087.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Yuan, Y. C., Whitson, R. H., Liu, Q., Itakura, K. and Chen, Y. (1998). A novel DNA-binding motif shares structural homology to DNA replication and repair nucleases and polymerases. *Nat Struct Biol* **5**, 959-964.

Zarnack, K., Maurer, S., Kaffarnik, F., Ladendorf, O., Brachmann, A., Kämper, J. and Feldbrugge, M. (2006). Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **43**, 727-738.

Zeng, L. and Zhou, M. M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**, 124-128.

Zhang, D., Yoon, H. G. and Wong, J. (2005). JMJD2A is a novel N-CoR-interacting protein and is involved in repression of the human transcription factor achaete scute-like homologue 2 (ASCL2/Hash2). *Mol Cell Biol* **25**, 6404-6414.

Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D. (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* **89**, 357-364.

Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H. P., Lane, W. S. and Reinberg, D. (1998). The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* **95**, 279-289.

Zofall, M. and Grewal, S. I. (2006). Swi6/HP1 recruits a JmjC domain protein to facilitate transcription of heterochromatic repeats. *Mol Cell* **22**, 681-692.

6 Anhang

6.1 Daten-CD

Tabelle 1: FB1Δ*rum1* vs. FB1

dChip-Tabelle: Verglichen wurden DNA-Microarrays der Stämme FB1Δ*rum1* und FB1. Es wurden Gene herausgefiltert, die in FB1Δ*rum1* im Vergleich zu FB1 mindestens zweifach induziert- oder reprimiert waren. Bei der Berechnung der faktoriellen Änderung der Genexpression wurde ein Vertrauensintervall von 90% ("lower confidence bound of fold change") vorgegeben.

Tabelle 2: FB1Δ*hda1* vs. FB1

dChip-Tabelle: Verglichen wurden DNA-Microarrays der Stämme FB1Δ*hda1* und FB1. Es wurden Gene herausgefiltert, die in FB1Δ*hda1* im Vergleich zu FB1 mindestens zweifach induziert- oder reprimiert waren. Bei der Berechnung der faktoriellen Änderung der Genexpression wurde ein Vertrauensintervall von 90% ("lower confidence bound of fold change") vorgegeben.

Tabelle 3: Koregulierte Gene der Stämme FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1*

In der Tabelle aufgelistet sind die probe sets (Spalte 1), welche eine Identifikation der entsprechenden Gene auf den DNA-Microarrays erlauben, die Accession-Nummer des MIPS (Spalte 2), die Annotation der jeweiligen Gene in der MUMDB des MIPS (Spalte 3), das nächstähnliche Hefehomolog (Spalte 4) und der entsprechende E-Value (Spalte 5). Für die Identifizierung des nächstähnlichen Hefehomologs, wurde als Kriterium ein E-Value ≤ 1e-8 vorgegeben (Stand 10/2006). In dieser Liste wurden nur Gene berücksichtigt die in der MUMDB annotiert sind. Die Tabelle ist nach den Namen der MIPS-Annotation geordnet.

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Jörg Kämper für das Überlassen dieses spannenden Themas und die Ausdauer mit der er mich in den Jahren meiner Promotion unterstützt hat. In diesem Rahmen danke ich auch Frau Prof. Dr. Regine Kahmann für die Möglichkeit in ihrer Abteilung diese interessante Thematik bearbeiten zu dürfen. Für die Übernahme der Zweitkorrektur möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Bölker, und für die freundliche Bereitschaft der Prüfungskomission anzugehören Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während all der Jahre tatkräftig unterstützt hat. Herzlichen Dank! Jürgen, Alena, Joris, Peter, Hannelore, Brunhilde, Erwin, Jens und Bernd!

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Labor-Kollegen deren Anwesenheit stets für ein nettes und fröhliches Arbeitsklima gesorgt hat: Alex – Danke für deine Ehrlichkeit und die Hilfe bei allen größeren und kleineren Labor-Katastrophen! Olli – Danke für die netten Gespräche und die Unterstützung bei Computer-Problemen! Steffi – Danke für deine Hilfe bei allen giftigen Laborangelegenheiten! Mario – Danke für die geduldige Unterstützung in Sachen DNA-Microarrays! Volker – Danke für deine Hilfe, vor allem bei organisatorischen Sachen! Kathi – Danke fürs Korrekturlesen und sonstige Promotionshilfen! Nicole – Danke für viele aufbauende Gespräche während des Zusammenschreibens!

Und zu guter Letzt: Vielen Dank Marion, dass du dich zu Korrekturzwecken durch meine Doktorarbeit gekämpft hast.

Lebenslauf
Martina Treutlein

Persönliche Angaben

Anschrift:	Stadtwaldstrasse 46, 35037 Marburg
Geburtsdatum, -ort:	30.03.1972, Heidelberg

Werdegang

Feb. 2001 – Feb. 2004	Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg. Betreuer: Prof. Dr. Jörg Kämper Thema: „Funktionelle Charakterisierung des Rum1-Proteins aus dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis*“
Jul. 2000	Abschluss als Dipom-Humanbiologin Hauptfächer: Immunologie, Virologie und Humangenetik Thema der Diplomarbeit: „Einfluß immunstimulatorischer Oligodes-oxynukleotide auf das Zytokinnetzwerk humaner Monozyten“ Betreuer: Prof. Dr. Klaus Heeg am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Marburg
Sep. 1995 – Jul. 2000	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg
Sep.1994 – Aug.1995	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen (Vorphysikum)
Sep.1992 – Jul.1994	Ausbildung zur staatlich geprüften veterinärmedizinisch-technischen Assistentin (V-MTA) am Tierhygienischen Institut Freiburg
1990 – 1992	Internationale Gesamtschule Heidelberg, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
1982 – 1990	Helmholtz-Gymnasium Heidelberg
1978 – 1982	Grundschule Leimen

[COMPARE_CRITERIA_V2]
$NUM_OPTION_LINE=5
$ARRAY_LIST_FILE=H:\dchip\dchipexe\dRum1 array list.txt
$COMPARE_ON_GENE_LIST=
$COMPARE_ON_USE_LIST=1
$AVERAGE_USING_STANDARD_ERROR=Yes
$OMIT_AFFY_CONTROL_GENE=Yes
$NUM_CRITERION=1

$Parenthesis	Combine	Baseline	Experiment	E/B>	or B/E>	Use	E-B>	or B-E>	P value <=	P call % of B :	and P call % o	Pair P value <=						
$No	and	1,2	3,4	2,00	2,00	Lower Bound	100,00	100,00	NA	NA	NA	NA						
[COMPARE_RESULT]																		
probe set	gene	Accession	LocusLink	Description	FB1 I 031203	FB1 II 031203	baseline mea	baseline mea	MT FB1 delta	MT FB1 delta	experiment m	experiment m	fold change	lower bound o	upper bound of FC	difference of r	filtered	
W15um088G_at	BIFUNCTIONAL P-450:NADPH-P450 REDUCTASE (C			BIFUNCTION	115,70	133,00	124,35	8,65	317,00	316,00	316,50	0,50	2,55	2,28	2,87	192,15	*	
W105um030G_at	EXOGLUCANASE/XYLANASE PRECURSOR [INCLUD			EXOGLUCAN	180,10	174,60	177,35	2,75	488,10	563,70	525,90	37,80	2,97	2,61	3,33	348,55	*	
W100um146G_at	PEROXISOMAL HYDRATASE-DEHYDROGENASE-EP			PEROXISOM	185,80	163,40	174,60	11,20	45,20	21,50	33,35	11,85	-5,24	-3,25	-12,65	-141,25	*	
W50um094G_at	XYLANASE/BETA-GLUCANASE PRECURSOR [INCLU			XYLANASE/B	18,20	27,30	22,75	4,55	197,10	190,00	193,55	3,55	8,51	6,39	12,69	170,80	*	
CLUSTER21_RC_at	(AB020733) 1,4-butanediol diacrylate esterase [Brevibac			(AB020733) 1,	37,30	33,50	35,40	1,90	691,30	688,20	689,75	1,55	19,48	17,90	21,37	654,35	*	
UG14-20g22-75d12_R	(AB022905) O-methyltransferase [Aspergillus parasiticu			(AB022905) O	31,40	15,30	23,35	8,05	1796,40	2240,40	2018,40	222,00	86,44	52,71	202,12	1995,05	*	
UG14-20g22-75d12_R	(AB022905) O-methyltransferase [Aspergillus parasiticu			(AB022905) O	28,40	13,30	20,85	7,55	1842,40	2163,40	2002,90	160,50	96,06	58,81	238,94	1982,05	*	
CLUSTER10_RC_at	(NC_003295) PUTATIVE CHOLINE DEHYDROGENASE			(NC_003295) I	59,20	66,90	63,05	3,85	2748,80	3538,80	3143,80	395,00	49,86	38,84	61,90	3080,75	*	
C122um209G_at	3-DEHYDROSHIKIMATE DEHYDRATASE (EC 4.2.1.-) (			3-DEHYDROS	4,00	5,90	4,95	0,95	115,40	121,70	118,55	3,15	23,95	18,13	35,07	113,60	*	
C90um024G_at	4-HYDROXYPHENYLACETATE CATABOLISM.			4-HYDROXYP	67,00	53,90	60,45	6,55	225,80	181,10	203,45	22,35	3,37	2,60	4,35	143,00	*	
W20um178G_at	5-CARBOXYVANILLATE DECARBOXYLASE.			5-CARBOXYV	58,20	55,00	56,60	1,60	479,00	454,80	466,90	12,10	8,25	7,75	8,79	410,30	*	
W65um209G_at	ACETAMIDASE (EC 3.5.1.4).			ACETAMIDAS	535,70	518,70	527,20	8,50	215,20	196,30	205,75	9,45	-2,56	-2,37	-2,78	-321,45	*	
W85um031G_at	ACETYL XYLAN ESTERASE II (EC 3.1.1.6).			ACETYL XYLA	48,70	61,20	54,95	6,25	268,20	241,90	255,05	13,15	4,64	3,82	5,79	200,10	*	
C125um126G_at	ACID PHOSPHATASE PRECURSOR (EC 3.1.3.2) (PH			ACID PHOSPH	105,70	86,70	96,20	9,50	257,20	275,10	266,15	8,95	2,77	2,35	3,33	169,95	*	
C15um276G_at	ACID PHOSPHATASE PRECURSOR (EC 3.1.3.2).			ACID PHOSPH	89,40	84,70	87,05	2,35	317,60	320,30	318,95	1,35	3,66	3,51	3,84	231,90	*	
C45um086G_at	ACYL-COA DEHYDROGENASE, SHORT/BRANCHED (			ACYL-COA DE	1161,40	1082,70	1122,05	39,35	522,60	501,20	511,90	10,70	-2,19	-2,05	-2,34	-610,15	*	
C85um201G_at	AFLATOXIN EFFLUX PUMP AFLT.			AFLATOXIN E	13,20	11,20	12,20	1,00	392,40	459,00	425,70	33,30	34,89	28,94	42,13	413,50	*	
C160um119G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE (ACCEPTOR) (EC 1.1.9			ALCOHOL DE	51,90	45,40	48,65	3,25	198,20	180,00	189,10	9,10	3,89	3,40	4,47	140,45	*	
C30um080G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE [ACCEPTOR] (EC 1.1.9			ALCOHOL DE	216,50	205,80	211,15	5,35	518,70	505,80	512,25	6,45	2,43	2,32	2,54	301,10	*	
W60um103G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE I (EC 1.1.1.1).			ALCOHOL DE	15,20	12,30	13,75	1,45	226,20	227,20	226,70	0,50	16,49	14,05	19,95	212,95	*	
C5um213G_RC_s_at	ALDEHYDE DEHYDROGENASE, E3 ISOZYME (EC 1.2			ALDEHYDE D	77,60	70,90	74,25	3,35	504,60	441,30	472,95	31,65	6,37	5,56	7,25	398,70	*	
W65um120G_at	ALDO/KETO REDUCTASE.			ALDO/KETO F	537,30	709,10	623,20	85,90	2855,90	3513,20	3184,55	328,65	5,11	3,88	6,90	2561,35	*	
C160um117G_at	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEMBER C4 (EC			ALDO-KETO F	180,30	176,70	178,50	1,80	482,00	544,40	513,20	31,20	2,88	2,58	3,17	334,70	*	
W110um083G_at	ALLERGEN.			ALLERGEN.	6,50	7,60	7,05	0,55	119,80	115,80	117,80	2,00	16,71	14,76	19,22	110,75	*	
C30um217G_at	ALPHA-GALACTOSIDASE (EC 3.2.1.22).			ALPHA-GALA	33,10	28,90	31,00	2,10	438,10	487,00	462,55	24,45	14,92	12,98	17,24	431,55	*	
C140um055G_at	ALPHA-KETOGLUTARATE-DEPENDENT TAURINE DI			ALPHA-KETO	617,90	756,60	687,25	69,35	2602,30	2831,60	2716,95	114,65	3,95	3,34	4,80	2029,70	*	
W90um276G_at	AMINO ACID TRANSPORTER.			AMINO ACID T	407,70	378,20	392,95	14,75	1673,70	1986,40	1830,05	156,35	4,66	3,96	5,39	1437,10	*	
W60um026G_at	ASCORBATE PEROXIDASE (EC 1.11.1.11) (FRAGMEI			ASCORBATE	210,70	216,70	213,70	3,00	82,00	66,60	74,30	7,70	-2,88	-2,45	-3,47	-139,40	*	
W50um083G_at	ATP-BINDING CASSETTE SUPERFAMILY G (WHITE) I			ATP-BINDING	50,30	48,30	49,30	1,00	1597,90	1488,80	1543,35	54,55	31,31	29,24	33,44	1494,05	*	
hyg_at	bacterial hygromycin resistance gene			bacterial hygro	7,80	7,60	7,70	0,10	130,70	123,10	126,90	3,80	16,48	15,60	17,37	119,20	*	
W15um068G_s_at	BETA 1,3-GLUCANASE.			BETA 1,3-GLU	22,70	15,40	19,05	3,65	277,90	242,30	260,10	17,80	13,65	10,11	20,20	241,05	*	
W95um031G_at	BETA 1,3-GLUCANASE.			BETA 1,3-GLU	10,20	7,90	9,05	1,15	208,70	173,80	191,25	17,45	21,13	16,45	27,74	182,20	*	
W30um192G_at	BETA SUBUNIT OF PHOTOACTIVATED ADENYLATE (			BETA SUBUN	30,10	30,60	30,35	0,25	173,70	159,20	166,45	7,25	5,48	5,09	5,89	136,10	*	
C100um031G_at	BETA-1,3-GLUCAN BINDING PROTEIN.			BETA-1,3-GLU	54,70	25,10	39,90	14,80	153,30	137,60	145,45	7,85	3,65	2,24	9,37	105,55	*	
W15um043G_at	BETA-1,3-GLUCAN BINDING PROTEIN.			BETA-1,3-GLU	264,60	205,80	235,20	29,40	1091,10	1196,70	1143,90	52,80	4,86	3,97	6,19	908,70	*	
W60um008G_at	BETA-1,6-GLUCANASE NEG1 (EC 3.2.1.75).			BETA-1,6-GLU	26,70	9,40	18,05	8,65	146,90	155,40	151,15	4,25	8,37	4,67	39,56	133,10	*	
C15um165G_at	BETA-D-GLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE PRECURS			BETA-D-GLUC	34,10	34,00	34,05	0,05	176,10	164,70	170,40	5,70	5,00	4,73	5,28	136,35	*	
W50um126G_at	BETA-GALACTOSIDASE (EC 3.2.1.23).			BETA-GALAC	54,80	39,00	46,90	7,90	243,50	246,60	245,05	1,55	5,22	4,09	7,23	198,15	*	
W5um146G_at	BILE-SALT-ACTIVATED LIPASE PRECURSOR (EC 3.1			BILE-SALT-AC	43,40	40,30	41,85	1,55	384,00	352,80	368,40	15,60	8,80	8,02	9,65	326,55	*	
C75um196G_at	BIPHENYL-2,3-DIOL 1,2-DIOXYGENASE III (EC 1.13.1			BIPHENYL-2,3	170,10	224,40	197,25	27,15	705,30	764,40	734,85	29,55	3,73	3,00	4,85	537,60	*	
C20um110G_at	BW2 PROTEIN.			BW2 PROTEIN	42,50	24,80	33,65	8,85	210,50	243,40	226,95	16,45	6,74	4,60	12,00	193,30	*	
W10um196G_at	CANDIDAPEPSIN 1 PRECURSOR (EC 3.4.23.24) (ASP			CANDIDAPEP	46,50	50,30	48,40	1,90	183,20	208,60	195,90	12,70	4,05	3,56	4,57	147,50	*	
C45um177G_at	CHITIN DEACETYLASE PRECURSOR (EC 3.5.1.41).			CHITIN DEAC	101,50	88,40	94,95	6,55	383,10	368,00	375,55	7,55	3,96	3,53	4,48	280,60	*	
C115um033G_at	CLP1.			CLP1.	13,60	14,60	14,10	0,50	123,50	111,90	117,70	5,80	8,35	7,54	9,21	103,60	*	
W165um005G_s_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.			CONSERVED	73,60	93,50	83,55	9,95	508,60	526,70	517,65	9,05	6,20	5,17	7,72	434,10	*	
W160um021G_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.			CONSERVED	161,50	147,70	154,60	6,90	886,00	942,90	914,45	28,45	5,91	5,42	6,48	759,85	*	
W160um021G_x_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.			CONSERVED	128,90	107,40	118,15	10,75	895,40	907,20	901,30	5,90	7,63	6,63	8,97	783,15	*	
C145um145G_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.			CONSERVED	403,20	395,50	399,35	3,85	2068,20	2283,80	2176,00	107,80	5,45	5,00	5,90	1776,65	*	
W50um063G_at	COPPER TRANSPORT PROTEIN CTR3 (COPPER TR			COPPER TRA	230,90	255,00	242,95	12,05	68,30	83,70	76,00	7,70	-3,20	-2,68	-3,90	-166,95	*	
W85um085G_at	CYCLIN C.			CYCLIN C.	505,80	544,00	524,90	19,10	240,70	242,60	241,65	0,95	-2,17	-2,04	-2,30	-283,25	*	

C135um175G_at	CYTOCHROME C.	CYTOCHROM	199,60	233,00	216,30	16,70	80,50	65,70	73,10	7,40	-2,96	-2,41	-3,68	-143,20 *
C40um015G_at	CYTOCHROME C1 (EC 1.10.2.2).	CYTOCHROM	445,40	391,50	418,45	26,95	149,40	120,20	134,80	14,60	-3,10	-2,54	-3,87	-283,65 *
C60um249G_at	DIBENZOTHIOPHENE DESULFURIZATION ENZYME (	DIBENZOTHIC	568,60	570,50	569,55	0,95	2773,50	2986,30	2879,90	106,40	5,06	4,75	5,36	2310,35 *
C90um073G_at	DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE, MITOCHONDRIAI	DIHYDROXY-/	277,00	269,50	273,25	3,75	129,60	109,90	119,75	9,85	-2,28	-2,01	-2,64	-153,50 *
W25um117G_at	DNA SEGMENT, HUMAN D0S6743E.	DNA SEGMEN	53,80	39,20	46,50	7,30	186,90	179,90	183,40	3,50	3,94	3,13	5,32	136,90 *
W60um167G_at	DNA TOPOISOMERASE I (EC 5.99.1.2).	DNA TOPOISC	55,50	77,60	66,55	11,05	335,60	321,10	328,35	7,25	4,93	3,86	6,80	261,80 *
W55um198G_at	EGGHEAD PROTEIN (ZESTE-WHITE 4 PROTEIN).	EGGHEAD PF	75,80	67,70	71,75	4,05	168,00	188,30	178,15	10,15	2,48	2,17	2,83	106,40 *
C105um146G_at	EMBRYONIC ABUNDANT PROTEIN-LIKE.	EMBRYONIC /	145,90	121,30	133,60	12,30	703,20	1216,30	959,75	256,55	7,18	3,97	10,74	826,15 *
C20um086G_at	ENDOCHITINASE.	ENDOCHITIN/	18,70	28,30	23,50	4,80	1496,80	1436,00	1466,40	30,40	62,40	46,60	94,08	1442,90 *
W155um188G_at	ENDOGLUCANASE 1 PRECURSOR (EC 3.2.1.4) (END	ENDOGLUCA	27,60	16,30	21,95	5,65	366,70	381,40	374,05	7,35	17,04	11,95	29,57	352,10 *
C65um198G_at	ENDOGLUCANASE 1 PRECURSOR (EC 3.2.1.4) (END	ENDOGLUCA	8,50	12,00	10,25	1,75	551,50	626,60	589,05	37,55	57,47	43,78	81,00	578,80 *
C10um084G_at	EPOXIDE HYDROLASE (EC 3.3.2.3).	EPOXIDE HYI	404,30	404,70	404,50	0,20	167,90	171,20	169,55	1,65	-2,39	-2,35	-2,42	-234,95 *
W15um008G_at	EXO-1,3-BETA-GLUCANASE PRECURSOR (EC 3.2.1.:	EXO-1,3-BETA	321,40	328,10	324,75	3,35	847,10	792,00	819,55	27,55	2,52	2,38	2,67	494,80 *
C105um137G_at	EXTRACELLULAR ASPARTIC PROTEINASE PRECUR	EXTRACELLU	13,90	13,40	13,65	0,25	297,20	300,20	298,70	1,50	21,88	21,22	22,59	285,05 *
W95um060G_at	FERULOYL ESTERASE A PRECURSOR (EC 3.1.1.73)	FERULOYL ES	57,20	58,50	57,85	0,65	174,10	212,10	193,10	19,00	3,34	2,80	3,88	135,25 *
W5um163G_at	FLUCONAZOLE RESISTANCE PROTEIN.	FLUCONAZOI	18,10	9,90	14,00	4,10	283,70	324,00	303,85	20,15	21,70	14,38	42,14	289,85 *
W70um024G_at	FORK HEAD DOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR SLF	FORK HEAD I	53,50	47,90	50,70	2,80	167,90	158,40	163,15	4,75	3,22	2,91	3,58	112,45 *
W35um030G_at	G1/S-SPECIFIC CYCLIN PCL1 (CYCLIN HCS26).	G1/S-SPECIFI	115,70	111,60	113,65	2,05	265,00	350,60	307,80	42,80	2,71	2,09	3,34	194,15 *
C55um060G_at	GAMMA-GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE PRECURSOF	GAMMA-GLU	67,00	60,20	63,60	3,40	390,90	370,90	380,90	10,00	5,99	5,44	6,63	317,30 *
C85um108G_at	GLUCAN 1,3-BETA-GLUCOSIDASE PRECURSOR (EC	GLUCAN 1,3-E	6,70	6,50	6,60	0,10	1391,50	1452,90	1422,20	30,70	215,48	206,27	224,97	1415,60 *
C135um119G_at	GLUCOSAMINE-6-PHOSPHATE ISOMERASE (EC 3.5.	GLUCOSAMIN	28,80	7,90	18,35	10,45	137,90	133,30	135,60	2,30	7,39	3,81	116,77	117,25 *
W175um086G_at	GLUTAMINASE (EC 3.5.1.2).	GLUTAMINAS	59,60	47,70	53,65	5,95	185,20	213,70	199,45	14,25	3,72	3,02	4,68	145,80 *
W40um197G_at	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (EC 2.5.1.18).	GLUTATHION	27,30	59,80	43,55	16,25	181,40	180,50	180,95	0,45	4,15	2,57	10,76	137,40 *
C80um152G_at	GLUTATHIONE-DEPENDENT FORMALDEHYDE DEH	GLUTATHION	27,00	32,10	29,55	2,55	351,70	380,50	366,10	14,40	12,39	10,67	14,61	336,55 *
W45um057G_at	GLYXOXYLATE PATHWAY REGULATOR.	GLYXOXYLAT	33,80	40,60	37,20	3,40	270,00	288,00	279,00	9,00	7,50	6,45	8,90	241,80 *
W35um241G_at	GTP CYCLOHYDROLASE II / 3,4-DIHYDROXY-2-BUTA	GTP CYCLOH	813,20	814,80	814,00	0,80	365,30	374,20	369,75	4,45	-2,20	-2,16	-2,25	-444,25 *
W35um023G_at	GUANINE DEAMINASE (EC 3.5.4.3) (GUANASE) (GUA	GUANINE DE/	517,80	501,40	509,60	8,20	214,30	242,30	228,30	14,00	-2,23	-2,02	-2,49	-281,30 *
W160um074G_at	GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE U1 (EC 3.1.27.3)	GUANYL-SPE	14,60	6,10	10,35	4,25	219,40	192,60	206,00	13,40	19,90	11,71	61,49	195,65 *
W89um138G_at	HEAT SHOCK PROTEIN 30.	HEAT SHOCK	60,20	50,10	55,15	5,05	346,90	285,80	316,35	30,55	5,74	4,59	7,15	261,20 *
W135um083G_at	HEAT SHOCK PROTEIN 81-2 (HSP81-2).	HEAT SHOCK	632,90	711,20	672,05	39,15	1888,80	1888,30	1888,55	0,25	2,81	2,56	3,11	1216,50 *
C85um097G_at	HIGH-AFFINITY GLUCOSE TRANSPORTER.	HIGH-AFFINIT	164,90	187,40	176,15	11,25	497,00	532,80	514,90	17,90	2,92	2,60	3,31	338,75 *
C15um209G_at	HIGH-AFFINITY NICOTINIC ACID TRANSPORTER (NI(	HIGH-AFFINIT	72,90	56,30	64,60	8,30	234,00	201,30	217,65	16,35	3,37	2,67	4,39	153,05 *
C20um097G_at	HSP30.	HSP30.	81,90	72,10	77,00	4,90	290,10	352,60	321,35	31,25	4,17	3,42	5,02	244,35 *
W25um068G_s_at	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHETIC.	67,40	77,10	72,25	4,85	501,70	513,60	507,65	5,95	7,03	6,32	7,91	435,40 *
W150um021G_s_at	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHETIC.	92,30	94,60	93,45	1,15	423,40	458,80	441,10	17,70	4,72	4,40	5,05	347,65 *
C90um031G_at	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHETIC.	84,00	79,30	81,65	2,35	351,20	339,70	345,45	5,75	4,23	4,01	4,47	263,80 *
W105um031G_at	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHETIC.	49,50	35,60	42,55	6,95	302,40	248,70	275,55	26,85	6,48	4,82	9,14	233,00 *
W55um034G_at	HYPOTHETICAL 13.8 KDA PROTEIN IN PWP2-SUP61	HYPOTHETIC.	40,80	43,90	42,35	1,55	153,30	133,90	143,60	9,70	3,39	2,97	3,83	101,25 *
C110um002G_at	HYPOTHETICAL 20.7 KDA PROTEIN (FRAGMENT).	HYPOTHETIC.	4,60	4,10	4,35	0,25	106,40	112,20	109,30	2,90	25,13	22,72	27,99	104,95 *
C70um209G_at	HYPOTHETICAL 23.0 KDA PROTEIN (FRAGMENT).	HYPOTHETIC.	154,50	152,80	153,65	0,85	397,10	405,70	401,40	4,30	2,61	2,56	2,66	247,75 *
C40um068G_at	HYPOTHETICAL 42.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHETIC.	34,60	29,80	32,20	2,40	762,40	612,10	687,25	75,15	21,34	16,98	26,36	655,05 *
C20um077G_at	HYPOTHETICAL COILED-COIL PROTEIN.	HYPOTHETIC.	100,30	107,60	103,95	3,65	232,40	225,20	228,80	3,60	2,20	2,07	2,35	124,85 *
C100um138G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN ALL4724.	HYPOTHETIC.	11,30	31,70	21,50	10,20	158,40	184,20	171,30	12,90	7,97	4,40	36,35	149,80 *
W100um124G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN ALL7128.	HYPOTHETIC.	46,30	54,40	50,35	4,05	172,90	190,30	181,60	8,70	3,61	3,11	4,24	131,25 *
C55um259G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN MA1996.	HYPOTHETIC.	860,30	827,90	844,10	16,20	2204,10	1913,30	2058,70	145,40	2,44	2,15	2,74	1214,60 *
C20um071G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN MLR6791.	HYPOTHETIC.	92,50	69,70	81,10	11,40	264,10	268,30	266,20	2,10	3,28	2,66	4,27	185,10 *
C160um086G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN VCA0649.	HYPOTHETIC.	338,20	351,80	345,00	6,80	153,00	159,40	156,20	3,20	-2,21	-2,11	-2,31	-188,80 *
C10um043G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN.	HYPOTHETIC.	625,40	395,00	510,20	115,20	1646,90	1685,10	1666,00	19,10	3,27	2,38	5,20	1155,80 *
W105um049G_at	HYPOTHETICAL SERINE-RICH PROTEIN C13G6.10C	HYPOTHETIC.	20,50	7,40	13,95	6,55	300,30	201,10	250,70	49,60	17,97	8,93	80,14	236,75 *
C65um036G_at	INDOLE-3-ACETALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC '	INDOLE-3-AC	1053,90	1055,00	1054,45	0,55	490,00	494,10	492,05	2,05	-2,14	-2,13	-2,16	-562,40 *
C55um084G_at	KINESIN.	KINESIN.	673,50	685,00	679,25	5,75	314,30	326,20	320,25	5,95	-2,12	-2,05	-2,19	-359,00 *
C20um183G_at	L-ASCORBATE OXIDASE (EC 1.10.3.3).	L-ASCORBAT	24,70	20,60	22,65	2,05	155,30	153,40	154,35	0,95	6,81	5,93	8,01	131,70 *
C146um093G_at	LEUCINE-RICH REPEATS CONTAINING F-BOX PROT	LEUCINE-RIC	54,00	30,80	42,40	11,60	172,10	174,90	173,50	1,40	4,09	2,82	7,44	131,10 *
W140um021G_s_at	LIPOPOLYSACCHARIDE AND BETA-1,3-GLUCAN BIN	LIPOPOLYSA(	5,20	5,10	5,15	0,05	369,20	364,10	366,65	2,55	71,19	69,81	72,61	361,50 *
W55um283G_at	MACROFAGE ACTIVATING GLYCOPROTEIN.	MACROFAGE	136,20	125,20	130,70	5,50	708,10	739,10	723,60	15,50	5,54	5,13	5,99	592,90 *
C80um021G_at	MAJOR ALLERGEN ASP F 2 PRECURSOR (ASP F II).	MAJOR ALLEI	45,20	40,70	42,95	2,25	349,40	333,30	341,35	8,05	7,95	7,25	8,76	298,40 *
W130um086G_at	MANNOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE (EC 5.3.1.8).	MANNOSE-6-I	1478,90	1317,30	1398,10	80,80	270,00	268,70	269,35	0,65	-5,19	-4,70	-5,68	-1128,75 *
W25um110G_at	MATING-TYPE LOCUS ALLELE B1 PROTEIN.	MATING-TYPE	12,20	4,40	8,30	3,90	402,20	424,50	413,35	11,15	49,80	28,03	219,34	405,05 *
C50um097G_at	MEMBRANE PROTEIN.	MEMBRANE F	11,80	10,50	11,15	0,65	149,30	151,90	150,60	1,30	13,51	12,31	14,95	139,45 *
W20um166G_at	METALLOPROTEASE MEP1.	METALLOPRC	9,70	4,60	7,15	2,55	304,60	333,30	318,95	14,35	44,61	27,91	108,12	311,80 *
W65um196G_at	MFS MULTIDRUG EFFLUX TRANSPORTER (FRAGME	MFS MULTIDF	606,20	650,30	628,25	22,05	1607,00	1949,60	1778,30	171,30	2,83	2,36	3,32	1150,05 *
C80um107G_at	MFS-MULTIDRUG-RESISTANCE TRANSPORTER PRE	MFS-MULTIDF	74,70	74,40	74,55	0,15	242,30	214,50	228,40	13,90	3,06	2,76	3,37	153,85 *

W165um209G_at	MFS-MULTIDRUG-RESISTANCE TRANSPORTER PRE	MFS-MULTIDF	57,40	62,40	59,90	2,50	193,30	189,90	191,60	1,70	3,20	2,99	3,44	131,70	*
C45um083G_at	MOLYBDENUM COFACTOR SULFURASE.	MOLYBDENUI	16,00	23,10	19,55	3,55	402,60	353,40	378,00	24,60	19,34	14,53	27,93	358,45	*
C25um119G_at	MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1	MULTIDRUG F	39,10	47,50	43,30	4,20	287,90	324,60	306,25	18,35	7,07	5,90	8,61	262,95	*
W60um250G_at	MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1	MULTIDRUG F	79,20	77,90	78,55	0,65	240,60	273,80	257,20	16,60	3,27	2,92	3,63	178,65	*
W55um097G_at	MULTIDRUG RESISTANT PROTEIN.	MULTIDRUG F	94,10	99,00	96,55	2,45	279,10	264,80	271,95	7,15	2,82	2,65	2,99	175,40	*
W143um119G_at	N-ACETYLGLUCOSAMINE-6-PHOSPHATE DEACETYL	N-ACETYLGLI	90,40	75,40	82,90	7,50	187,20	198,30	192,75	5,55	2,33	2,01	2,75	109,85	*
W75um008G_at	N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE (EC 2.4.1.	N-ACETYLGLI	34,90	39,80	37,35	2,45	181,40	198,80	190,10	8,70	5,09	4,47	5,83	152,75	*
W140um132G_at	NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE (EC	NAD-DEPEND	552,80	588,90	570,85	18,05	1850,60	2199,80	2025,20	174,60	3,55	3,02	4,09	1454,35	*
C15um029G_at	NITRATE TRANSPORTER.	NITRATE TRA	242,00	205,70	223,85	18,15	606,40	610,30	608,35	1,95	2,72	2,40	3,14	384,50	*
W190um281G_at	NITRILOTRIACETATE MONOOXYGENASE COMPONE	NITRILOTRIA	213,90	186,10	200,00	13,90	1506,80	1498,70	1502,75	4,05	7,51	6,74	8,48	1302,75	*
C161um005G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	38,50	48,20	43,35	4,85	256,50	240,40	248,45	8,05	5,73	4,80	7,07	205,10	*
C162um005G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	56,20	71,60	63,90	7,70	226,60	189,30	207,95	18,65	3,25	2,56	4,22	144,05	*
C26um006G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	26,40	19,70	23,05	3,35	134,60	142,80	138,70	4,10	6,02	4,83	7,94	115,65	*
C27um006G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	29,20	9,90	19,55	9,65	128,80	113,10	120,95	7,85	6,19	3,37	32,94	101,40	*
C45um006G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	15,30	18,00	16,65	1,35	149,60	142,70	146,15	3,45	8,78	7,70	10,18	129,50	*
C72um008G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	13,20	12,60	12,90	0,30	196,50	194,80	195,65	0,85	15,17	14,60	15,78	182,75	*
W220um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	65,30	66,60	65,95	0,65	229,70	240,60	235,15	5,45	3,57	3,42	3,71	169,20	*
W225um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	10,70	11,60	11,15	0,45	224,80	226,60	225,70	0,90	20,24	18,98	21,69	214,55	*
C230um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	66,60	71,50	69,05	2,45	741,00	701,80	721,40	19,60	10,45	9,71	11,25	652,35	*
C105um012G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	30,40	12,60	21,50	8,90	232,70	193,90	213,30	19,40	9,92	5,74	31,25	191,80	*
W51um018G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	64,70	80,30	72,50	7,80	177,20	179,70	178,45	1,25	2,46	2,09	2,99	105,95	*
C36um020G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	73,50	75,50	74,50	1,00	389,60	330,30	359,95	29,65	4,83	4,17	5,50	285,45	*
C100um020G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	44,60	38,10	41,35	3,25	184,10	170,10	177,10	7,00	4,28	3,73	4,98	135,75	*
W71um024G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	88,50	93,30	90,90	2,40	456,30	407,40	431,85	24,45	4,75	4,27	5,25	340,95	*
C75um024G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	59,50	58,10	58,80	0,70	273,20	297,60	285,40	12,20	4,85	4,50	5,21	226,60	*
W15um026G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	74,40	77,10	75,75	1,35	173,90	207,10	190,50	16,60	2,51	2,15	2,89	114,75	*
C70um031G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	94,20	82,80	88,50	5,70	316,00	277,20	296,60	19,40	3,35	2,88	3,90	208,10	*
W72um035G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	38,90	40,70	39,80	0,90	252,40	222,80	237,60	14,80	5,97	5,33	6,63	197,80	*
C25um036G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	13,50	13,40	13,45	0,05	151,90	168,60	160,25	8,35	11,91	10,89	12,94	146,80	*
C85um036G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	5,20	5,30	5,25	0,05	125,20	116,60	120,90	4,30	23,03	21,64	24,43	115,65	*
C80um042G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	10,50	13,60	12,05	1,55	384,90	453,20	419,05	34,15	34,78	27,35	45,47	407,00	*
W135um054G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	187,40	169,70	178,55	8,85	76,10	80,00	78,05	1,95	-2,29	-2,08	-2,50	-100,50	*
W6um060G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	9,10	8,70	8,90	0,20	114,00	105,20	109,60	4,40	12,31	11,40	13,26	100,70	*
C65um060G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	100,80	92,00	96,40	4,40	380,40	376,40	378,40	2,00	3,93	3,65	4,25	282,00	*
W45um064G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	7,30	7,50	7,40	0,10	209,20	226,70	217,95	8,75	29,45	27,41	31,52	210,55	*
W1um068G_s_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	28,60	38,90	33,75	5,15	270,00	254,10	262,05	7,95	7,76	6,17	10,40	228,30	*
W55um073G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	269,00	253,00	261,00	8,00	671,40	715,50	693,45	22,05	2,66	2,47	2,86	432,45	*
W60um074G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	16,30	15,70	16,00	0,30	116,60	131,90	124,25	7,65	7,77	6,95	8,60	108,25	*
EST02um075_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	56,90	31,30	44,10	12,80	228,40	189,60	209,00	19,40	4,74	3,09	9,18	164,90	*
C107um076G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	122,80	147,80	135,30	12,50	663,80	458,20	561,00	102,80	4,15	2,82	5,66	425,70	*
C95um078G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	38,80	39,20	39,00	0,20	234,10	275,60	254,85	20,75	6,53	5,66	7,41	215,85	*
C40um084G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	10,70	10,90	10,80	0,10	2625,50	2323,60	2474,55	150,95	229,13	205,92	252,43	2463,75	*
W25um089G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	514,30	527,60	520,95	6,65	204,30	193,80	199,05	5,25	-2,62	-2,50	-2,75	-321,90	*
W10um091G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	4,20	4,70	4,45	0,25	397,80	314,80	356,30	41,50	80,07	63,64	97,87	351,85	*
C75um091G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	71,00	75,90	73,45	2,45	232,90	213,00	222,95	9,95	3,04	2,77	3,32	149,50	*
W110um094G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	67,40	58,90	63,15	4,25	315,70	279,60	297,65	18,05	4,71	4,06	5,48	234,50	*
W40um102G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	27,00	7,90	17,45	9,55	189,30	174,90	182,10	7,20	10,44	5,47	104,58	164,65	*
C25um106G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	16,10	14,40	15,25	0,85	222,40	86,60	154,50	67,90	10,13	2,80	17,63	139,25	*
C15um117G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	94,90	88,20	91,55	3,35	1018,60	1186,20	1102,40	83,80	12,04	10,41	13,76	1010,85	*
W102um124G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	21,20	32,50	26,85	5,65	134,20	152,90	143,55	9,35	5,35	3,88	8,26	116,70	*
C34um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	62,00	54,50	58,25	3,75	289,80	228,20	259,00	30,80	4,45	3,50	5,49	200,75	*
C40um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	20,00	27,80	23,90	3,90	196,10	191,60	193,85	2,25	8,11	6,39	11,09	169,95	*
C55um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	28,50	24,70	26,60	1,90	152,90	149,50	151,20	1,70	5,68	5,08	6,45	124,60	*
C64um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	6,10	4,50	5,30	0,80	151,70	159,00	155,35	3,65	29,31	23,39	39,08	150,05	*
C67um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	7,10	11,30	9,20	2,10	324,50	253,40	288,95	35,55	31,41	21,22	51,91	279,75	*
C80um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	44,10	36,10	40,10	4,00	220,60	180,50	200,55	20,05	5,00	3,95	6,33	160,45	*
W85um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	14,50	17,60	16,05	1,55	188,20	178,80	183,50	4,70	11,43	9,80	13,65	167,45	*
C96um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	28,00	14,40	21,20	6,80	114,60	134,30	124,45	9,85	5,87	3,75	12,52	103,25	*
C100um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	53,00	57,30	55,15	2,15	163,80	195,20	179,50	15,70	3,25	2,75	3,78	124,35	*
C105um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	111,00	105,30	108,15	2,85	326,20	365,70	345,95	19,75	3,20	2,87	3,54	237,80	*
C115um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	9,10	8,40	8,75	0,35	217,70	241,60	229,65	11,95	26,25	23,52	29,20	220,90	*
C120um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	27,90	25,40	26,65	1,25	280,00	276,40	278,20	1,80	10,44	9,68	11,32	251,55	*

W105um126G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	69,20	71,80	70,50	1,30	356,40	405,50	380,95	24,55	5,40	4,81	6,00	310,45 *
C15um137G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	68,90	71,20	70,05	1,15	373,60	348,50	361,05	12,55	5,15	4,83	5,48	291,00 *
C85um139G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	193,20	135,30	164,25	28,95	651,30	850,50	750,90	99,60	4,57	3,21	6,77	586,65 *
W126um140G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	49,00	47,80	48,40	0,60	311,90	313,40	312,65	0,75	6,46	6,33	6,60	264,25 *
W15um144G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	108,70	79,90	94,30	14,40	239,90	234,10	237,00	2,90	2,51	2,01	3,36	142,70 *
W65um146G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	8,30	9,50	8,90	0,60	222,20	207,60	214,90	7,30	24,15	21,41	27,48	206,00 *
W70um148G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	61,40	74,40	67,90	6,50	189,80	173,90	181,85	7,95	2,68	2,27	3,22	113,95 *
W115um150G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	68,00	64,00	66,00	2,00	311,30	326,80	319,05	7,75	4,83	4,54	5,16	253,05 *
W40um152G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	37,90	25,80	31,85	6,05	520,00	552,30	536,15	16,15	16,83	12,76	24,55	504,30 *
C172um153G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	77,30	69,00	73,15	4,15	226,40	243,40	234,90	8,50	3,21	2,88	3,60	161,75 *
C135um157G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	57,20	58,20	57,70	0,50	151,20	180,30	165,75	14,55	2,87	2,46	3,29	108,05 *
W50um159G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	9,30	10,00	9,65	0,35	400,20	422,50	411,35	11,15	42,63	39,60	45,96	401,70 *
W7um163G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	172,30	179,70	176,00	3,70	1296,00	1374,10	1335,05	39,05	7,59	7,14	8,04	1159,05 *
W21um164G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	110,50	131,80	121,15	10,65	299,30	298,30	298,80	0,50	2,47	2,15	2,88	177,65 *
W20um165G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	35,00	44,10	39,55	4,55	213,50	214,40	213,95	0,45	5,41	4,55	6,67	174,40 *
C120um166G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	58,20	50,30	54,25	3,95	191,10	179,00	185,05	6,05	3,41	3,01	3,91	130,80 *
W70um170G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	50,60	11,60	31,10	19,50	558,60	487,60	523,10	35,50	16,82	8,18	100000000,00	492,00 *
W135um172G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	144,60	137,90	141,25	3,35	832,80	805,50	819,15	13,65	5,80	5,53	6,08	677,90 *
C19um179G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	8,50	8,10	8,30	0,20	116,90	142,70	129,80	12,90	15,64	13,03	18,30	121,50 *
C25um179G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	6,40	9,70	8,05	1,65	437,40	393,30	415,35	22,05	51,60	38,01	78,41	407,30 *
C35um179G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	57,70	62,30	60,00	2,30	192,30	210,50	201,40	9,10	3,36	3,04	3,70	141,40 *
W40um179G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	42,30	35,90	39,10	3,20	147,00	136,70	141,85	5,15	3,63	3,15	4,24	102,75 *
W90um188G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	5,60	5,20	5,40	0,20	108,90	119,60	114,25	5,35	21,16	19,15	23,32	108,85 *
W120um188G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	26,50	35,60	31,05	4,55	279,40	289,20	284,30	4,90	9,16	7,36	12,08	253,25 *
W150um188G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	140,50	124,40	132,45	8,05	331,90	325,00	328,45	3,45	2,48	2,25	2,76	196,00 *
C21um189G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	40,90	40,80	40,85	0,05	264,30	239,10	251,70	12,60	6,16	5,65	6,67	210,85 *
C45um195G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	17,40	9,20	13,30	4,10	190,00	148,00	169,00	21,00	12,71	7,92	26,29	155,70 *
W50um196G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	50,50	49,00	49,75	0,75	288,80	222,60	255,70	33,10	5,14	4,04	6,24	205,95 *
C60um196G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	29,50	9,40	19,45	10,05	681,30	658,80	670,05	11,25	34,45	18,61	229,55	650,60 *
W40um198G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	105,10	95,90	100,50	4,60	542,10	497,70	519,90	22,20	5,17	4,67	5,74	419,40 *
C15um206G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	9,90	5,10	7,50	2,40	1298,60	1437,70	1368,15	69,55	182,42	118,31	386,35	1360,65 *
W16um206G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	124,30	116,30	120,30	4,00	1972,60	2200,20	2086,40	113,80	17,34	15,57	19,22	1966,10 *
EST01um208_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	62,20	68,10	65,15	2,95	239,80	235,40	237,60	2,20	3,65	3,39	3,95	172,45 *
W50um208G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	7,00	6,80	6,90	0,10	186,10	181,40	183,75	2,35	26,63	25,80	27,49	176,85 *
W130um209G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	40,80	46,70	43,75	2,95	146,70	141,20	143,95	2,75	3,29	2,95	3,72	100,20 *
C115um211G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	74,70	71,10	72,90	1,80	377,30	345,90	361,60	15,70	4,96	4,56	5,38	288,70 *
W10um213G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	30,00	33,60	31,80	1,80	301,50	294,10	297,80	3,70	9,36	8,55	10,35	266,00 *
W70um213G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	73,70	75,70	74,70	1,00	730,00	666,00	698,00	32,00	9,34	8,61	10,08	623,30 *
W125um220G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	64,50	69,20	66,85	2,35	569,70	478,00	523,85	45,85	7,84	6,64	9,08	457,00 *
W5um222G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	29,70	36,50	33,10	3,40	951,00	873,30	912,15	38,85	27,56	23,19	33,54	879,05 *
C40um236G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	18,00	21,10	19,55	1,55	120,40	146,10	133,25	12,85	6,82	5,52	8,35	113,70 *
W11um240G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	25,70	30,70	28,20	2,50	205,20	245,20	225,20	20,00	7,99	6,48	9,83	197,00 *
W7um241G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	608,90	628,50	618,70	9,80	290,70	298,70	294,70	4,00	-2,10	-2,03	-2,17	-324,00 *
C45um244G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	531,70	474,80	503,25	28,45	201,00	221,80	211,40	10,40	-2,38	-2,10	-2,69	-291,85 *
C10um245G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	32,10	21,90	27,00	5,10	152,50	143,00	147,75	4,75	5,47	4,15	7,96	120,75 *
W25um245G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	70,60	73,70	72,15	1,55	193,20	198,10	195,65	2,45	2,71	2,60	2,83	123,50 *
W65um249G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	281,20	290,30	285,75	4,55	863,90	685,60	774,75	89,15	2,71	2,19	3,23	489,00 *
C55um250G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	5,20	13,50	9,35	4,15	125,30	116,50	120,90	4,40	12,93	7,44	47,93	111,55 *
C50um256G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	101,60	94,90	98,25	3,35	223,20	241,00	232,10	8,90	2,36	2,17	2,57	133,85 *
C65um256G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	44,40	56,50	50,45	6,05	622,40	571,40	596,90	25,50	11,83	9,74	14,88	546,45 *
W69um256G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	138,10	150,80	144,45	6,35	831,20	822,70	826,95	4,25	5,72	5,34	6,17	682,50 *
C65um257G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	5,60	5,60	5,60	0,00	120,80	110,50	115,65	5,15	20,65	20,65	20,65	110,05 *
W40um261G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	88,70	93,30	91,00	2,30	194,40	199,80	197,10	2,70	2,17	2,07	2,27	106,10 *
C35um264G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	84,00	91,80	87,90	3,90	420,40	320,50	370,45	49,95	4,21	3,25	5,22	282,55 *
W5um267G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	41,80	54,90	48,35	6,55	191,90	177,20	184,55	7,35	3,82	3,09	4,95	136,20 *
W40um273G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	140,90	156,80	148,85	7,95	584,20	644,70	614,45	30,25	4,13	3,66	4,66	465,60 *
C5um277G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	61,30	69,50	65,40	4,10	328,00	322,90	325,45	2,55	4,98	4,51	5,55	260,05 *
W90um281G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	8,80	6,70	7,75	1,05	121,20	140,20	130,70	9,50	16,86	13,28	22,21	122,95 *
W120um281G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	41,00	62,50	51,75	10,75	269,20	228,30	248,75	20,45	4,81	3,46	7,43	197,00 *
W191um281G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	444,60	455,00	449,80	5,20	1566,20	1504,60	1535,40	30,80	3,41	3,28	3,54	1085,60 *
W30um283G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	15,50	18,10	16,80	1,30	164,10	143,50	153,80	10,30	9,15	7,74	10,87	137,00 *
W42um283G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	22,60	30,60	26,60	4,00	251,70	276,90	264,30	12,60	9,94	7,85	13,32	237,70 *

UG14-15g12-91e11_R(	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	19,30	9,60	14,45	4,85	1920,20	2424,00	2172,10	251,90	150,32	91,99	340,45	2157,65 *
UG21-14a22-110c6_R(	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOTAT	77,90	76,10	77,00	0,90	1011,50	1020,60	1016,05	4,55	13,20	12,93	13,47	939,05 *
C80um280G_at	OPSIN.	OPSIN.	118,90	123,30	121,10	2,20	699,50	708,70	704,10	4,60	5,81	5,63	6,00	583,00 *
C140um075G_at	PARA-NITROBENZYL ESTERASE (EC 3.1.1.-) (PNB C/	PARA-NITROE	46,20	34,90	40,55	5,65	205,00	215,60	210,30	5,30	5,19	4,20	6,75	169,75 *
W10um264G_at	PEPTIDE TRANSPORTER MTD1.	PEPTIDE TRA	63,50	65,80	64,65	1,15	426,90	438,50	432,70	5,80	6,69	6,45	6,94	368,05 *
C20um182G_at	PHD FINGER PROTEIN.	PHD FINGER	123,20	133,10	128,15	4,95	338,60	356,70	347,65	9,05	2,71	2,52	2,93	219,50 *
W80um196G_at	PHENYLACETATE HYDROXYLASE (EC 1.14.14.1).	PHENYLACET	65,80	63,70	64,75	1,05	323,40	328,50	325,95	2,55	5,03	4,89	5,19	261,20 *
W5um156G_at	PHYTASE PRECURSOR (EC 3.1.3.26).	PHYTASE PRI	81,60	92,80	87,20	5,60	369,80	365,20	367,50	2,30	4,21	3,81	4,71	280,30 *
C95um126G_at	PISATIN DEMETHYLASE (EC 1.14.-.-) (CYTOCHROME	PISATIN DEM	30,60	22,60	26,60	4,00	198,20	184,20	191,20	7,00	7,19	5,71	9,60	164,60 *
C5um083G_C68um24(	PROBABLE PHOSPHO-2-DEHYDRO-3-DEOXYHEPTC	PROBABLE PI	1312,00	1257,30	1284,65	27,35	618,20	575,50	596,85	21,35	-2,15	-2,01	-2,31	-687,80 *
C90um078G_at	PROTEOPHOSPHOGLYCAN (FRAGMENT).	PROTEOPHO	11,00	9,60	10,30	0,70	125,50	127,90	126,70	1,20	12,30	11,05	13,86	116,40 *
W40um208G_at	PUTATIVE 2-DEHYDROPANTOATE 2-REDUCTASE (E	PUTATIVE 2-D	1186,00	1165,70	1175,85	10,15	492,20	548,30	520,25	28,05	-2,26	-2,07	-2,48	-655,60 *
W65um117G_at	PUTATIVE 5 NUCLEOTIDASE FAMILY PROTEIN, POS	PUTATIVE 5 I	77,40	80,10	78,75	1,35	215,90	257,90	236,90	21,00	3,01	2,56	3,46	158,15 *
W55um098G_at	PUTATIVE CELL ADHESION PROTEIN SYM32.	PUTATIVE CE	71,80	68,80	70,30	1,50	224,60	269,70	247,15	22,55	3,52	2,98	4,06	176,85 *
W85um010G_at	PUTATIVE DNA POLYMERASE X.	PUTATIVE DN	70,40	73,80	72,10	1,70	244,20	227,60	235,90	8,30	3,27	3,05	3,50	163,80 *
C59um169G_at	PUTATIVE SECRETED PROTEIN.	PUTATIVE SE	1174,90	1072,60	1123,75	51,15	274,90	223,20	249,05	25,85	-4,51	-3,78	-5,51	-874,70 *
C15um214G_at	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.	PUTATIVE TR	25,20	9,90	17,55	7,65	198,90	224,90	211,90	13,00	12,07	6,95	42,75	194,35 *
W5um229G_at	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.	PUTATIVE TR	7,30	5,80	6,55	0,75	188,50	203,00	195,75	7,25	29,89	24,86	37,11	189,20 *
W95um166G_at	RDS1 PROTEIN.	RDS1 PROTE	29,00	30,90	29,95	0,95	171,00	166,30	168,65	2,35	5,63	5,32	5,97	138,70 *
C65um260G_at	REGULATOR USTILAGO MAYDIS 1 PROTEIN.	REGULATOR	275,40	230,90	253,15	22,25	30,70	31,10	30,90	0,20	-8,19	-7,01	-9,38	-222,25 *
W125um040G_at	RELATED TO STRESS RESPONSE PROTEIN RDS1P.	RELATED TO	171,50	168,70	170,10	1,40	388,90	394,10	391,50	2,60	2,30	2,26	2,34	221,40 *
W120um002G_at	REPELLENT PROTEIN.	REPELLENT F	54,30	51,20	52,75	1,55	1316,90	1693,50	1505,20	188,30	28,53	22,56	34,64	1452,45 *
W50um018G_at	REPRESSED BY TUP1 PROTEIN 4.	REPRESSED	61,90	42,50	52,20	9,70	433,50	492,60	463,05	29,55	8,87	6,64	12,93	410,85 *
C135um025G_at	REPRESSIBLE ALKALINE PHOSPHATASE PRECURS	REPRESSIBLI	173,90	174,10	174,00	0,10	560,20	575,30	567,75	7,55	3,26	3,19	3,33	393,75 *
W45um025G_at	RHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS 3-OXOACYL-[ACYL-(	RHAMNOLIPII	58,40	34,90	46,65	11,75	404,10	403,70	403,90	0,20	8,66	6,12	14,78	357,25 *
W40um185G_at	RIBOFLAVIN ALDEHYDE-FORMING ENZYME (FRAG	RIBOFLAVIN A	242,10	229,20	235,65	6,45	501,30	515,90	508,60	7,30	2,16	2,05	2,27	272,95 *
C145um120G_at	RIBONUCLEASE T2 PRECURSOR (EC 3.1.27.1) (RNA	RIBONUCLEA	84,50	97,40	90,95	6,45	514,80	558,60	536,70	21,90	5,90	5,18	6,79	445,75 *
W85um021G_at	ROOT IRON TRANSPORTER PROTEIN.	ROOT IRON T	11,90	5,10	8,50	3,40	719,30	625,60	672,45	46,85	79,11	46,93	232,07	663,95 *
C25um039G_at	S-ADENOSYLMETHIONINE:DIACYLGLYCEROL 3-AMI	S-ADENOSYL	8,10	8,70	8,40	0,30	500,50	535,80	518,15	17,65	61,68	56,88	66,92	509,75 *
W25um026G_at	SEXUAL DIFFERENTIATION PROCESS PROTEIN ISP.	SEXUAL DIFF	50,40	43,50	46,95	3,45	179,40	160,70	170,05	9,35	3,62	3,12	4,23	123,10 *
W200um019G_at	SODIUM/POTASSIUM-TRANSPORTING ATPASE ALPI	SODIUM/POT/	11,50	15,80	13,65	2,15	250,20	277,00	263,60	13,40	19,31	15,08	26,32	249,95 *
C150um120G_at	SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE PR1C.	SUBTILISIN-LI	12,00	13,10	12,55	0,55	151,10	147,00	149,05	2,05	11,88	11,04	12,84	136,50 *
W25um193G_at	SULFOLIPID SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCEROL	SULFOLIPID S	45,50	45,40	45,45	0,05	264,30	280,90	272,60	8,30	6,00	5,70	6,30	227,15 *
C105um086G_at	T SNARE COMPLEX SUBUNIT, SYNTAXIN-LIKE.	T SNARE COM	672,10	774,70	723,40	51,30	281,80	268,50	275,15	6,65	-2,63	-2,31	-2,96	-448,25 *
W20um050G_at	T10F20.2 PROTEIN (T10F20.1 PROTEIN) (AT1G18010	T10F20.2 PRO	92,80	103,50	98,15	5,35	280,60	227,60	254,10	26,50	2,59	2,11	3,11	155,95 *
W20um050G_x_at	T10F20.2 PROTEIN (T10F20.1 PROTEIN) (AT1G18010	T10F20.2 PRO	114,70	106,60	110,65	4,05	293,00	255,50	274,25	18,75	2,48	2,17	2,80	163,60 *
C10um255G_x_at	T10F20.2 PROTEIN (T10F20.1 PROTEIN) (AT1G18010	T10F20.2 PRO	41,50	55,70	48,60	7,10	160,50	164,70	162,60	2,10	3,35	2,69	4,41	114,00 *
W180um019G_at	THIAMINE-REPRESSIBLE ACID PHOSPHATASE PRE(	THIAMINE-RE	42,20	33,30	37,75	4,45	311,10	311,10	311,10	0,00	8,24	8,24	8,24	273,35 *
W15um006G_at	TRANSCRIPTION FACTOR FST12.	TRANSCRIPT	52,40	55,30	53,85	1,45	174,10	176,70	175,40	1,30	3,26	3,11	3,41	121,55 *
C87um085G_x_at	TRANSCRIPTION INITIATION PROTEIN.	TRANSCRIPT	614,40	743,30	678,85	64,45	280,50	254,80	267,65	12,85	-2,54	-2,11	-3,00	-411,20 *
C45um125G_at	TRANSPOSASE.	TRANSPOSAS	19,50	21,60	20,55	1,05	147,20	127,40	137,30	9,90	6,68	5,75	7,70	116,75 *
W5um192G_at	TRIACYLGLYCEROL LIPASE (EC 3.1.1.3) (FRAGMEN	TRIACYLGLY(	63,40	48,80	56,10	7,30	201,20	202,00	201,60	0,40	3,59	2,96	4,57	145,50 *
W70um185G_at	UPSTREAM STIMULATORY FACTOR 1 (MAJOR LATE	UPSTREAM S	11,90	10,50	11,20	0,70	200,30	186,10	193,20	7,10	17,25	15,36	19,51	182,00 *
W45um084G_at	UREA ACTIVE TRANSPORTER.	UREA ACTIVE	13,70	13,30	13,50	0,20	505,10	503,20	504,15	0,95	37,34	36,45	38,28	490,65 *
W105um138G_at	UREA ACTIVE TRANSPORTER.	UREA ACTIVE	574,70	486,40	530,55	44,15	1533,90	1368,30	1451,10	82,80	2,74	2,33	3,25	920,55 *
W95um035G_at	VTPJ-THERM PROTEIN.	VTPJ-THERM	47,80	41,10	44,45	3,35	148,20	161,00	154,60	6,40	3,48	3,03	4,03	110,15 *
W30um169G_at	WAX SYNTHASE-LIKE PROTEIN.	WAX SYNTHA	59,20	69,30	64,25	5,05	182,40	192,20	187,30	4,90	2,92	2,56	3,37	123,05 *
C30um082G_at	WHITE COLLAR 1 PROTEIN (WC1).	WHITE COLL/	125,60	126,50	126,05	0,45	323,60	358,60	341,10	17,50	2,71	2,48	2,94	215,05 *
UG12-12b17-77h4_RC	XYNA_ASPAK ENDO-1,4-BETA-XYLANASE A PRECUI	XYNA_ASPAK	158,90	193,70	176,30	17,40	2036,90	2618,10	2327,50	290,60	13,20	10,04	17,08	2151,20 *
C95um165G_at	ZN-DEPENDENT HYDROLASES.	ZN-DEPENDE	44,10	40,30	42,20	1,90	163,30	146,80	155,05	8,25	3,67	3,27	4,12	112,85 *
UM_26Src-3_s_at			1363,60	831,10	1097,35	266,25	33,90	76,90	55,40	21,50	-19,81	-9,75	-57,11	-1041,95 *
UM_26Src-3M_s_at			460,50	190,60	325,55	134,95	5,10	30,30	17,70	12,60	-18,39	-4,70	-100000000,00	-307,85 *

[COMPARE_CRITERIA_V2]
$NUM_OPTION_LINE=5
$ARRAY_LIST_FILE=H:\dchip\dchipexe\dHda1 array list.txt
$COMPARE_ON_GENE_LIST=
$COMPARE_ON_USE_LIST=1
$AVERAGE_USING_STANDARD_ERROR=Yes
$OMIT_AFFY_CONTROL_GENE=Yes
$NUM_CRITERION=1

$Parenthesis	Combine	Baseline	Experiment	E/B>	or B/E>	Use	E-B>	or B-E>	P value <=	P call % of B :	and P call % (	Pair P value <=
$No	and	1,2	3,4	2,00	2,00	Lower Bound	100,00	100,00	NA	NA	NA	NA

[COMPARE_RESULT]

probe set	gene	Accession	LocusLink	Description	FB1 I 031203	FB1 II 031203	baseline mea	baseline mea	FB1_Dhda1_I	FB1_Dhda1_I	experiment m	experiment m	fold change	lower bound o	upper bound of	difference of r	filtered
CLUSTER21_RC_at	(AB020733)	1,4-butanediol diacrylate este		(AB020733)	37,30	33,50	35,40	1,90	586,90	630,80	608,85	21,95	17,20	15,49	19,18	573,45	*
UG14-20g22-75d12_	(AB022905)	O-methyltransferase [Aspergil		(AB022905)	31,40	15,30	23,35	8,05	180,10	149,10	164,60	15,50	7,05	4,35	16,43	141,25	*
UG14-20g22-75d12_	(AB022905)	O-methyltransferase [Aspergil		(AB022905)	28,40	13,30	20,85	7,55	164,40	152,20	158,30	6,10	7,59	4,73	18,80	137,45	*
CLUSTER35_RC_at	(NC_001139)	Nicotinamide/nicotinic acid n		(NC_00113	871,30	928,80	900,05	28,75	382,20	359,80	371,00	11,20	-2,43	-2,26	-2,61	-529,05	*
CLUSTER10_RC_at	(NC_003295)	PUTATIVE CHOLINE DEHY		(NC_00329	59,20	66,90	63,05	3,85	467,60	387,70	427,65	39,95	6,78	5,60	8,11	364,60	*
CLUSTER42_RC_at	(NC_003421)	nad-specific glutamate dehy		(NC_00342	417,50	450,30	433,90	16,40	1088,70	1129,70	1109,20	20,50	2,56	2,39	2,74	675,30	*
CLUSTER27_RC_at	(U04436)	putative polyketide synthase [An		(U04436)	pu 8,80	7,10	7,95	0,85	115,40	102,40	108,90	6,50	13,70	11,30	16,97	100,95	*
W17um036G_at	2-OXOISOVALERATE DEHYDROGENAS			2-OXOISOV	220,80	250,70	235,75	14,95	95,70	83,60	89,65	6,05	-2,63	-2,26	-3,07	-146,10	*
W25um135G_at	3 (2),5 -BISPHOSPHATE NUCLEOTIDAS			3 (2),5 -BIS	72,70	83,10	77,90	5,20	177,50	194,40	185,95	8,45	2,39	2,10	2,74	108,05	*
C30um269G_at	3-DEHYDROSHIKIMATE DEHYDRATASE			3-DEHYDR(	46,00	37,30	41,65	4,35	194,30	183,50	188,90	5,40	4,54	3,84	5,50	147,25	*
W115um070G_at	4930586I02RIK PROTEIN.			4930586I02	115,20	115,50	115,35	0,15	290,40	370,80	330,60	40,20	2,87	2,29	3,44	215,25	*
C200um003G_at	4-COUMARATE:COA LIGASE (EC 6.2.1.1			4-COUMAR	349,80	332,70	341,25	8,55	86,70	91,90	89,30	2,60	-3,82	-3,59	-4,07	-251,95	*
W20um178G_at	5-CARBOXYVANILLATE DECARBOXYLA			5-CARBOX'	58,20	55,00	56,60	1,60	389,40	309,00	349,20	40,20	6,17	4,98	7,39	292,60	*
CLUSTER69_RC_at	AC037426_1 (AC037426)	putative flavin-c		AC037426_	55,30	65,30	60,30	5,00	179,40	154,30	166,85	12,55	2,77	2,30	3,34	106,55	*
C15um276G_at	ACID PHOSPHATASE PRECURSOR (EC			ACID PHOS	89,40	84,70	87,05	2,35	316,90	297,70	307,30	9,60	3,53	3,30	3,78	220,25	*
W10um227G_at	ACYL-COA DEHYDROGENASE, SHORT-			ACYL-COA	59,90	70,00	64,95	5,05	228,20	292,20	260,20	32,00	4,01	3,10	5,04	195,25	*
W35um190G_at	ACYL-COA THIOESTERASE II (EC 3.1.2.-			ACYL-COA	79,60	90,40	85,00	5,40	192,10	222,00	207,05	14,95	2,44	2,07	2,85	122,05	*
C75um003G_at	ACYL-COENZYME A OXIDASE 1, PERO			ACYL-COEI	10,00	6,50	8,25	1,75	115,80	116,30	116,05	0,25	14,07	10,43	21,60	107,80	*
W100um054G_at	ADP-RIBOSYLATION FACTOR-LIKE PRC			ADP-RIBOS	331,80	302,40	317,10	14,70	109,30	114,60	111,95	2,65	-2,83	-2,59	-3,08	-205,15	*
C85um201G_at	AFLATOXIN EFFLUX PUMP AFLT.			AFLATOXIN	13,20	11,20	12,20	1,00	201,20	118,50	159,85	41,35	13,10	7,44	19,25	147,65	*
C160um119G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE (ACCEPT			ALCOHOL I	51,90	45,40	48,65	3,25	501,70	472,80	487,25	14,45	10,02	8,92	11,36	438,60	*
C20um268G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE (EC 1.1.1			ALCOHOL I	11,90	11,60	11,75	0,15	213,90	261,50	237,70	23,80	20,23	16,88	23,60	225,95	*
W25um268G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE (EC 1.1.1			ALCOHOL I	144,90	189,50	167,20	22,30	666,30	753,30	709,80	43,50	4,25	3,39	5,53	542,60	*
C30um080G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE [ACCEPT			ALCOHOL I	216,50	205,80	211,15	5,35	639,00	729,50	684,25	45,25	3,24	2,87	3,62	473,10	*
W60um103G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE I (EC 1.1.			ALCOHOL I	15,20	12,30	13,75	1,45	362,80	310,00	336,40	26,40	24,47	19,80	30,65	322,65	*
C70um043G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE II (EC 1.1.			ALCOHOL I	6,30	5,30	5,80	0,50	96,00	117,80	106,90	10,90	18,43	14,70	22,92	101,10	*
C110um281G_at	ALCOHOL DEHYDROGENASE.			ALCOHOL I	88,60	101,70	95,15	6,55	316,60	303,20	309,90	6,70	3,26	2,91	3,69	214,75	*
C5um213G_RC_s_a	ALDEHYDE DEHYDROGENASE, E3 ISO			ALDEHYDE	77,60	70,90	74,25	3,35	249,40	188,00	218,70	30,70	2,95	2,25	3,68	144,45	*
C75um157G_at	ALDEHYDE REDUCTASE II (EC 1.1.1.2).			ALDEHYDE	303,10	352,40	327,75	24,65	105,00	110,20	107,60	2,60	-3,05	-2,65	-3,45	-220,15	*
W65um120G_at	ALDO/KETO REDUCTASE.			ALDO/KET(	537,30	709,10	623,20	85,90	2690,30	2796,50	2743,40	53,10	4,40	3,58	5,70	2120,20	*
C160um117G_at	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEI			ALDO-KET(	180,30	176,70	178,50	1,80	453,40	470,50	461,95	8,55	2,59	2,50	2,68	283,45	*
W30um062G_at	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEI			ALDO-KET(	216,20	241,30	228,75	12,55	1536,60	1606,10	1571,35	34,75	6,87	6,25	7,60	1342,60	*
W35um225G_at	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEI			ALDO-KET(	163,30	190,60	176,95	13,65	534,30	613,10	573,70	39,40	3,24	2,74	3,85	396,75	*
W5um166G_at	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEI			ALDO-KET(	901,60	1009,30	955,45	53,85	235,60	207,40	221,50	14,10	-4,31	-3,75	-4,97	-733,95	*
W110um083G_at	ALLERGEN.			ALLERGEN	6,50	7,60	7,05	0,55	176,60	168,80	172,70	3,90	24,50	21,58	28,23	165,65	*
W20um235G_at	ALPHA-1,3-MANNOSYLTRANSFERASE I			ALPHA-1,3-	900,70	1026,90	963,80	63,10	368,20	350,80	359,50	8,70	-2,68	-2,38	-2,99	-604,30	*
C30um217G_at	ALPHA-GALACTOSIDASE (EC 3.2.1.22).			ALPHA-GAL	33,10	28,90	31,00	2,10	222,50	172,60	197,55	24,95	6,37	4,94	7,97	166,55	*
W35um074G_at	ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDASE A P			ALPHA-L-AI	22,60	16,50	19,55	3,05	333,90	342,50	338,20	4,30	17,30	13,75	23,29	318,65	*
C20um146G_at	ALPHA-METHYLACYL-COA RACEMASE			ALPHA-MET	66,70	65,70	66,20	0,50	191,90	199,80	195,85	3,95	2,96	2,85	3,06	129,65	*
C10um223G_at	ALTERNATIVE NADH-DEHYDROGENAS			ALTERNATI	92,00	78,30	85,15	6,85	266,80	280,90	273,85	7,05	3,22	2,82	3,73	188,70	*
W135um117G_at	AMINO ACID TRANSPORTER.			AMINO ACII	465,40	362,70	414,05	51,35	143,40	99,40	121,40	22,00	-3,41	-2,41	-5,08	-292,65	*
C20um006G_at	AMYLASE (EC 3.2.1.-).			AMYLASE (	417,80	397,10	407,45	10,35	1456,40	1589,40	1522,90	66,50	3,74	3,43	4,06	1115,45	*
W66um286G_at	ANTHRANILATE PHOSPHORIBOSYLTRA			ANTHRANIL	506,00	461,60	483,80	22,20	210,00	194,40	202,20	7,80	-2,39	-2,17	-2,64	-281,60	*
C200um074G_at	ARYL-ALCOHOL DEHYDROGENASE [N/			ARYL-ALCC	62,90	53,80	58,35	4,55	190,90	185,00	187,95	2,95	3,22	2,85	3,70	129,60	*
W50um083G_at	ATP-BINDING CASSETTE SUPERFAMIL			ATP-BINDIN	50,30	48,30	49,30	1,00	505,30	466,90	486,10	19,20	9,86	9,15	10,59	436,80	*
W55um146G_at	ATP-BINDING COMPONENT OF MOLYBI			ATP-BINDIN	629,70	582,30	606,00	23,70	188,60	153,00	170,80	17,80	-3,55	-2,99	-4,32	-435,20	*
hyg_at	bacterial hygromycin resistance gene			bacterial hyg	7,80	7,60	7,70	0,10	388,40	445,20	416,80	28,40	54,13	47,98	60,33	409,10	*
C40um209G_at	BENZOATE 4-MONOOXYGENASE (EC 1			BENZOATE	38,80	34,70	36,75	2,05	131,50	151,40	141,45	9,95	3,85	3,31	4,45	104,70	*
C70um146G_at	BERBERINE BRIDGE ENZYME (EC 1.5.3			BERBERINE	46,90	41,40	44,15	2,75	174,40	180,90	177,65	3,25	4,02	3,63	4,50	133,50	*
W15um068G_s_at	BETA 1,3-GLUCANASE.			BETA 1,3-G	22,70	15,40	19,05	3,65	162,20	139,90	151,05	11,15	7,93	5,85	11,76	132,00	*

W155um021G_s_at	BETA-1,3 EXOGLUCANASE PRECURSO	BETA-1,3 E	6,50	7,60	7,05	0,55	209,10	207,40	208,25	0,85	29,54	26,17	33,89	201,20 *
C15um165G_at	BETA-D-GLUCOSIDE GLUCOHYDROLA	BETA-D-GL	34,10	34,00	34,05	0,05	160,30	149,20	154,75	5,55	4,54	4,28	4,81	120,70 *
C35um250G_at	BETA-GLUCAN SYNTHESIS-ASSOCIATE	BETA-GLUC	9,00	7,10	8,05	0,95	132,90	143,80	138,35	5,45	17,19	14,21	21,51	130,30 *
C65um167G_at	BILE-SALT-ACTIVATED LIPASE PRECUF	BILE-SALT-	23,50	9,90	16,70	6,80	170,20	137,30	153,75	16,45	9,21	5,30	28,09	137,05 *
W5um146G_at	BILE-SALT-ACTIVATED LIPASE PRECUF	BILE-SALT-	43,40	40,30	41,85	1,55	245,10	180,10	212,60	32,50	5,08	3,78	6,42	170,75 *
C90um145G_at	BIOTIN CARBOXYLASE (EC 6.3.4.14) (A	BIOTIN CAF	118,20	122,60	120,40	2,20	297,80	275,00	286,40	11,40	2,38	2,21	2,55	166,00 *
C20um110G_at	BW2 PROTEIN.	BW2 PROT	42,50	24,80	33,65	8,85	211,00	159,00	185,00	26,00	5,50	3,52	10,01	151,35 *
W155um138G_at	CALNEXIN PRECURSOR.	CALNEXIN	505,90	492,80	499,35	6,55	1883,90	2065,70	1974,80	90,90	3,95	3,65	4,27	1475,45 *
W85um192G_at	CARBONIC ANHYDRASE (EC 4.2.1.1).	CARBONIC	306,20	320,90	313,55	7,35	706,00	756,60	731,30	25,30	2,33	2,18	2,50	417,75 *
C100um074G_at	CARBONYL REDUCTASE [NADPH] 1 (EC	CARBONYL	141,60	144,20	142,90	1,30	596,50	617,30	606,90	10,40	4,25	4,11	4,38	464,00 *
W57um276G_at	CARBOXYLASE.	CARBOXYL	5,00	7,20	6,10	1,10	135,50	134,90	135,20	0,30	22,16	17,09	31,51	129,10 *
W10um056G_at	CARBOXYPEPTIDASE CPDS PRECURS	CARBOXYF	995,10	874,20	934,65	60,45	340,10	306,50	323,30	16,80	-2,89	-2,52	-3,31	-611,35 *
C70um096G_at	CARBOXYPEPTIDASE S1 PRECURSOR	CARBOXYF	207,10	202,50	204,80	2,30	81,40	74,80	78,10	3,30	-2,62	-2,45	-2,82	-126,70 *
C80um195G_at	CARNITINE ACETYL TRANSFERASE FA	CARNITINE	231,30	204,20	217,75	13,55	664,00	567,90	615,95	48,05	2,83	2,39	3,33	398,20 *
W50um087G_at	CARNITINE/ACYL CARNITINE CARRIER.	CARNITINE	413,10	363,40	388,25	24,85	1040,90	1094,00	1067,45	26,55	2,75	2,47	3,09	679,20 *
C133um220G_at	CELL WALL SURFACE ANCHOR FAMIL	CELL WALL	489,50	499,40	494,45	4,95	188,40	190,10	189,25	0,85	-2,61	-2,57	-2,66	-305,20 *
W55um185G_at	CELL WALL SURFACE ANCHOR FAMIL	CELL WALL	408,30	334,70	371,50	36,80	133,70	103,90	118,80	14,90	-3,13	-2,41	-4,12	-252,70 *
W15um272G_at	CHOLINE DEHYDROGENASE (EC 1.1.99	CHOLINE D	433,10	381,30	407,20	25,90	165,80	144,40	155,10	10,70	-2,63	-2,25	-3,07	-252,10 *
C100um172G_s_at	CINNAMYL-ALCOHOL DEHYDROGENAS	CINNAMYL-	24,10	33,80	28,95	4,85	304,00	212,70	258,35	45,65	8,92	5,87	13,45	229,40 *
C111um183G_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	CONSERVE	50,30	39,40	44,85	5,45	553,50	523,50	538,50	15,00	12,01	9,94	15,07	493,65 *
C140um074G_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	CONSERVE	124,80	97,00	110,90	13,90	318,90	385,80	352,35	33,45	3,18	2,47	4,17	241,45 *
C145um145G_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	CONSERVE	403,20	395,50	399,35	3,85	1293,60	1391,80	1342,70	49,10	3,36	3,15	3,57	943,35 *
C16um254G_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	CONSERVE	139,20	160,30	149,75	10,55	405,10	506,90	456,00	50,90	3,05	2,42	3,75	306,25 *
C25um126G_at	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	CONSERVE	494,00	432,60	463,30	30,70	202,60	136,20	169,40	33,20	-2,73	-2,02	-4,09	-293,90 *
C40um005G_at	CONSERVED PROTEIN.	CONSERVE	210,60	221,10	215,85	5,25	587,80	665,10	626,45	38,65	2,90	2,59	3,22	410,60 *
UM_cbx-5_s_at	Control cbx-5	Control cbx-	152,90	145,60	149,25	3,65	415,20	414,60	414,90	0,30	2,78	2,67	2,90	265,65 *
C10um082G_at	COPIA-LIKE POLYPROTEIN.	COPIA-LIKE	161,40	205,00	183,20	21,80	70,30	65,80	68,05	2,25	-2,69	-2,15	-3,25	-115,15 *
W175um175G_at	CYCLIN.	CYCLIN.	951,60	872,60	912,10	39,50	346,70	218,00	282,35	64,35	-3,23	-2,33	-5,19	-629,75 *
C60um186G_at	CYTOCHROME B2, MITOCHONDRIAL PI	CYTOCHRO	59,60	47,50	53,55	6,05	203,90	216,60	210,25	6,35	3,93	3,29	4,85	156,70 *
C40um015G_at	CYTOCHROME C1 (EC 1.10.2.2).	CYTOCHRO	445,40	391,50	418,45	26,95	1146,20	1470,10	1308,15	161,95	3,13	2,44	3,88	889,70 *
C96um214G_at	CYTOCHROME P450 3A31 (EC 1.14.14.1	CYTOCHRO	99,20	109,00	104,10	4,90	225,30	235,10	230,20	4,90	2,21	2,04	2,41	126,10 *
W115um119G_at	CYTOCHROME P450 52A1 (EC 1.14.14.-)	CYTOCHRO	40,70	47,60	44,15	3,45	231,90	234,30	233,10	1,20	5,28	4,68	6,06	188,95 *
W145um056G_at	CYTOCHROME P450 94A1 (EC 1.14.-.-) (	CYTOCHRO	6,20	7,20	6,70	0,50	109,90	106,40	108,15	1,75	16,14	14,33	18,45	101,45 *
W60um040G_at	CYTOKINESIS PROTEIN DON1.	CYTOKINES	245,50	257,60	251,55	6,05	109,00	108,50	108,75	0,25	-2,31	-2,22	-2,41	-142,80 *
C35um206G_at	DIAMINOPROPIONATE AMMONIA-LYASI	DIAMINOPF	1194,80	1242,20	1218,50	23,70	507,90	422,00	464,95	42,95	-2,62	-2,27	-3,10	-753,55 *
C60um249G_at	DIBENZOTHIOPHENE DESULFURIZATIC	DIBENZOTH	568,60	570,50	569,55	0,95	2242,80	2646,30	2444,55	201,75	4,29	3,71	4,87	1875,00 *
C65um025G_at	DIK6.	DIK6.	120,60	144,20	132,40	11,80	426,60	435,40	431,00	4,40	3,26	2,84	3,82	298,60 *
W160um281G_at	DIK6.	DIK6.	47,60	63,40	55,50	7,90	167,60	155,00	161,30	6,30	2,91	2,33	3,82	105,80 *
W10um099G_at	DNA PHOTOLYASE.	DNA PHOT	7,70	7,80	7,75	0,05	101,60	117,40	109,50	7,90	14,13	12,45	15,81	101,75 *
W80um213G_at	DNA SEGMENT, CHR 11, WAYNE STATE	DNA SEGM	412,90	377,40	395,15	17,75	135,10	97,50	116,30	18,80	-3,40	-2,65	-4,66	-278,85 *
W25um117G_at	DNA SEGMENT, HUMAN D0S6743E.	DNA SEGM	53,80	39,20	46,50	7,30	201,20	231,70	216,45	15,25	4,65	3,58	6,39	169,95 *
C110um068G_at	DNA-BINDING PROTEIN CREA (CARBOI	DNA-BINDI	672,00	569,30	620,65	51,35	264,50	244,60	254,55	9,95	-2,44	-2,08	-2,82	-366,10 *
W10um018G_at	ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN	ELECTRON	26,50	20,20	23,35	3,15	131,40	151,20	141,30	9,90	6,05	4,78	7,95	117,95 *
C45um069G_at	ENDO-1,3(4)-BETA-GLUCANASE (EC 3.2	ENDO-1,3(4	1985,70	2083,00	2034,35	48,65	815,50	712,70	764,10	51,40	-2,66	-2,38	-3,01	-1270,25 *
C20um086G_at	ENDOCHITINASE.	ENDOCHIT	18,70	28,30	23,50	4,80	2205,60	2110,30	2157,95	47,65	91,83	68,56	138,47	2134,45 *
C65um198G_at	ENDOGLUCANASE 1 PRECURSOR (EC	ENDOGLUC	8,50	12,00	10,25	1,75	1992,80	2194,70	2093,75	100,95	204,27	157,23	286,28	2083,50 *
W155um188G_at	ENDOGLUCANASE 1 PRECURSOR (EC	ENDOGLUC	27,60	16,30	21,95	5,65	475,90	488,70	482,30	6,40	21,97	15,42	38,12	460,35 *
W75um022G_at	EXO-BETA-1,3-GLUCANASE (EC 3.2.1.5	EXO-BETA-	141,90	133,40	137,65	4,25	370,50	317,90	344,20	26,30	2,50	2,17	2,85	206,55 *
C15um170G_at	EXTENSIN CLASS II PRECURSOR (CELI	EXTENSIN	313,30	297,50	305,40	7,90	99,70	67,80	83,75	15,95	-3,65	-2,77	-5,32	-221,65 *
C105um137G_at	EXTRACELLULAR ASPARTIC PROTEINA	EXTRACEL	13,90	13,40	13,65	0,25	371,50	327,50	349,50	22,00	25,60	22,87	28,39	335,85 *
C25um056G_at	FATTY ACID SYNTHASE (EC 2.3.1.85) [I	FATTY ACI	82,90	77,70	80,30	2,60	301,30	297,90	299,60	1,70	3,73	3,54	3,94	219,30 *
W115um019G_at	FATTY ACID SYNTHASE (EC 2.3.1.85) [I	FATTY ACI	60,60	80,20	70,40	9,80	328,40	376,00	352,20	23,80	5,00	3,94	6,62	281,80 *
C125um060G_at	FATTY OXIDATION COMPLEX ALPHA SU	FATTY OXI	77,90	79,30	78,60	0,70	230,10	178,80	204,45	25,65	2,60	2,06	3,14	125,85 *
C70um071G_at	FATTY OXIDATION COMPLEX ALPHA SU	FATTY OXI	50,70	64,30	57,50	6,80	157,10	160,70	158,90	1,80	2,76	2,31	3,43	101,40 *
W27um222G_at	FERRIC REDUCTASE TRANSMEMBRAN	FERRIC RE	2744,50	2662,70	2703,60	40,90	786,20	546,80	666,50	119,70	-4,06	-3,13	-5,76	-2037,10 *
W25um222G_at	FERRIC REDUCTASE TRANSMEMBRAN	FERRIC RE	1822,20	1830,90	1826,55	4,35	402,90	243,80	323,35	79,55	-5,65	-4,02	-9,49	-1503,20 *
C65um153G_at	FHA-HIT.	FHA-HIT.	296,10	295,60	295,85	0,25	138,80	125,60	132,20	6,60	-2,24	-2,07	-2,44	-163,65 *
W5um163G_at	FLUCONAZOLE RESISTANCE PROTEIN	FLUCONAZ	18,10	9,90	14,00	4,10	146,10	102,60	124,35	21,75	8,88	5,28	17,85	110,35 *
W55um030G_at	FRUITING BODY PROTEIN SC4 PRECUI	FRUITING E	6,80	19,10	12,95	6,15	712,40	683,50	697,95	14,45	53,90	30,22	246,30	685,00 *
W140um013G_at	GABA-SPECIFIC PERMEASE (GABA-SPI	GABA-SPE	1250,40	1133,40	1191,90	58,50	205,90	121,60	163,75	42,15	-7,28	-5,06	-12,68	-1028,15 *
C55um060G_at	GAMMA-GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE	GAMMA-GL	67,00	60,20	63,60	3,40	394,30	412,50	403,40	9,10	6,34	5,78	7,00	339,80 *
W30um130G_at	GATA-BINDING FACTOR-C (TRANSCRIF	GATA-BIND	482,90	420,60	451,75	31,15	148,30	120,70	134,50	13,80	-3,36	-2,76	-4,16	-317,25 *

W75um223G_at	GLUCAN 1,3-BETA-GLUCOSIDASE GLU	GLUCAN 1,	144,80	170,10	157,45	12,65	441,20	380,10	410,65	30,55	2,61	2,18	3,13	253,20	*
C85um108G_at	GLUCAN 1,3-BETA-GLUCOSIDASE PRE	GLUCAN 1,	6,70	6,50	6,60	0,10	2260,30	2280,30	2270,30	10,00	343,98	335,27	353,13	2263,70	*
C135um119G_at	GLUCOSAMINE-6-PHOSPHATE ISOMER	GLUCOSAM	28,80	7,90	18,35	10,45	126,60	127,80	127,20	0,60	6,93	3,58	109,53	108,85	*
W175um086G_at	GLUTAMINASE (EC 3.5.1.2).	GLUTAMIN/	59,60	47,70	53,65	5,95	207,50	164,20	185,85	21,65	3,46	2,64	4,52	132,20	*
W40um197G_at	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (EC 2.	GLUTATHIC	27,30	59,80	43,55	16,25	262,60	250,50	256,55	6,05	5,89	3,64	15,26	213,00	*
C80um152G_at	GLUTATHIONE-DEPENDENT FORMALD	GLUTATHIC	27,00	32,10	29,55	2,55	158,30	134,20	146,25	12,05	4,95	4,06	6,04	116,70	*
C35um209G_at	GLYCEROPHOSPHORYL DIESTER PHO	GLYCEROF	164,90	118,40	141,65	23,25	387,30	411,50	399,40	12,10	2,82	2,21	3,88	257,75	*
W125um090G_at	GLYOXAL OXIDASE PRECURSOR.	GLYOXAL C	42,00	51,60	46,80	4,80	173,70	141,20	157,45	16,25	3,36	2,64	4,29	110,65	*
C65um192G_at	GLYXOXYLATE PATHWAY REGULATOR	GLYXOXYL	227,80	225,80	226,80	1,00	713,50	794,00	753,75	40,25	3,32	3,03	3,62	526,95	*
W45um057G_at	GLYXOXYLATE PATHWAY REGULATOR	GLYXOXYL	33,80	40,60	37,20	3,40	314,40	312,50	313,45	0,95	8,43	7,32	9,92	276,25	*
C51um184G_at	GTP-BINDING PROTEIN 1 (G-PROTEIN	GTP-BINDI	898,00	828,20	863,10	34,90	227,90	191,10	209,50	18,40	-4,12	-3,54	-4,88	-653,60	*
W35um023G_at	GUANINE DEAMINASE (EC 3.5.4.3) (GU	GUANINE D	517,80	501,40	509,60	8,20	96,30	77,40	86,85	9,45	-5,87	-4,97	-7,16	-422,75	*
W160um074G_at	GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE U1	GUANYL-SI	14,60	6,10	10,35	4,25	167,20	168,30	167,75	0,55	16,21	9,67	49,94	157,40	*
W110um150G_at	HEAT SHOCK 70KD PROTEIN 5 (GLUCC	HEAT SHO(	981,10	970,50	975,80	5,30	2192,10	2327,30	2259,70	67,60	2,32	2,20	2,43	1283,90	*
W89um138G_at	HEAT SHOCK PROTEIN 30.	HEAT SHO(	60,20	50,10	55,15	5,05	454,40	470,70	462,55	8,15	8,39	7,27	9,90	407,40	*
W90um025G_at	HEAT SHOCK PROTEIN 30.	HEAT SHO(	134,50	127,90	131,20	3,30	502,10	562,20	532,15	30,05	4,06	3,65	4,48	400,95	*
W135um083G_at	HEAT SHOCK PROTEIN 81-2 (HSP81-2).	HEAT SHO(	632,90	711,20	672,05	39,15	3595,10	4184,50	3889,80	294,70	5,79	4,93	6,76	3217,75	*
C190um019G_at	HEAT SHOCK PROTEIN HSP104.	HEAT SHO(	236,10	161,20	198,65	37,45	548,80	562,60	555,70	6,90	2,80	2,13	4,06	357,05	*
C25um168G_at	HEAT SHOCK PROTEIN STI1.	HEAT SHO(	293,20	249,10	271,15	22,05	976,20	1196,70	1086,45	110,25	4,01	3,21	4,95	815,30	*
C65um092G_at	HEAT SHOCK PROTEIN.	HEAT SHO(	646,60	583,20	614,90	31,70	3392,70	3918,20	3655,45	262,75	5,94	5,12	6,86	3040,55	*
C63um236G_at	HELICASE.	HELICASE.	248,90	225,10	237,00	11,90	99,70	101,80	100,75	1,05	-2,35	-2,15	-2,55	-136,25	*
C85um097G_at	HIGH-AFFINITY GLUCOSE TRANSPORT	HIGH-AFFI	164,90	187,40	176,15	11,25	650,80	581,50	616,15	34,65	3,50	3,04	4,03	440,00	*
C110um155G_at	HIRA-INTERACTING PROTEIN 5 (MHIRIF	HIRA-INTEF	139,70	138,10	138,90	0,80	345,30	375,70	360,50	15,20	2,60	2,41	2,78	221,60	*
C35um197G_at	HOMOPROTOCATECHUATE CATABOLI	HOMOPRC	14,70	37,80	26,25	11,55	139,40	138,50	138,95	0,45	5,29	3,07	19,16	112,70	*
C15um273G_at	HORMONE-SENSITIVE LIPASE (EC 3.1.1	HORMONE	330,20	252,50	291,35	38,85	40,50	37,70	39,10	1,40	-7,45	-5,78	-9,17	-252,25	*
C20um097G_at	HSP30.	HSP30.	81,90	72,10	77,00	4,90	942,00	1115,00	1028,50	86,50	13,36	11,17	15,84	951,50	*
W20um089G_at	HYDROGENASE REGULATION HOXX.	HYDROGEI	1394,30	1330,00	1362,15	32,15	493,50	389,60	441,55	51,95	-3,08	-2,57	-3,84	-920,60	*
C145um093G_at	HYDROXYACYLGLUTATHIONE HYDROL	HYDROXYA	183,30	205,60	194,45	11,15	686,20	840,20	763,20	77,00	3,92	3,21	4,71	568,75	*
W90um019G_at	HYPOTHETICAL 11.9 KDA PROTEIN.	HYPOTHET	1118,50	1212,30	1165,40	46,90	3220,70	3374,40	3297,55	76,85	2,83	2,62	3,06	2132,15	*
C90um031G_at	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHET	84,00	79,30	81,65	2,35	192,70	175,40	184,05	8,65	2,25	2,05	2,46	102,40	*
W105um031G_at	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHET	49,50	35,60	42,55	6,95	353,20	331,00	342,10	11,10	8,04	6,30	11,04	299,55	*
W150um021G_s_at	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHET	92,30	94,60	93,45	1,15	317,10	281,20	299,15	17,95	3,20	2,88	3,53	205,70	*
W25um068G_s_at	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.	HYPOTHET	67,40	77,10	72,25	4,85	416,00	415,00	415,50	0,50	5,75	5,18	6,46	343,25	*
C125um131G_at	HYPOTHETICAL 27.7 KDA PROTEIN IN L	HYPOTHET	99,00	94,50	96,75	2,25	232,60	229,40	231,00	1,60	2,39	2,30	2,49	134,25	*
W38um103G_at	HYPOTHETICAL 34.6 KDA PROTEIN.	HYPOTHET	1049,70	978,10	1013,90	35,80	427,40	351,70	389,55	37,85	-2,60	-2,22	-3,12	-624,35	*
C55um191G_at	HYPOTHETICAL 34.7 KDA PROTEIN C23	HYPOTHET	995,90	851,10	923,50	72,40	379,00	368,30	373,65	5,35	-2,47	-2,15	-2,80	-549,85	*
C15um018G_at	HYPOTHETICAL 38.5 KDA PROTEIN IN II	HYPOTHET	222,90	220,60	221,75	1,15	631,30	571,20	601,25	30,05	2,71	2,49	2,94	379,50	*
W15um034G_at	HYPOTHETICAL 49.4 KDA PROTEIN.	HYPOTHET	44,70	40,80	42,75	1,95	160,30	159,40	159,85	0,45	3,74	3,48	4,04	117,10	*
W105um010G_at	HYPOTHETICAL 57.5 KDA PROTEIN IN F	HYPOTHET	489,20	446,80	468,00	21,20	209,90	205,80	207,85	2,05	-2,25	-2,08	-2,42	-260,15	*
W70um006G_at	HYPOTHETICAL 59.6 KDA PROTEIN IN (	HYPOTHET	7,60	12,00	9,80	2,20	378,90	378,00	378,45	0,45	38,62	28,20	61,22	368,65	*
W55um278G_at	HYPOTHETICAL 72.7 KDA PROTEIN IN M	HYPOTHET	75,50	65,70	70,60	4,90	220,20	184,50	202,35	17,85	2,87	2,37	3,44	131,75	*
C137um007G_at	HYPOTHETICAL 73.2 KDA PROTEIN.	HYPOTHET	47,00	27,30	37,15	9,85	184,60	177,40	181,00	3,60	4,87	3,39	8,65	143,85	*
W140um188G_at	HYPOTHETICAL 81.2 KDA PROTEIN IN M	HYPOTHET	55,90	80,00	67,95	12,05	194,30	195,60	194,95	0,65	2,87	2,22	4,05	127,00	*
C10um125G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN C32A11.02C I	HYPOTHET	58,20	48,50	53,35	4,85	1306,20	1346,90	1326,55	20,35	24,87	21,58	29,29	1273,20	*
C55um259G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN MA1996.	HYPOTHET	860,30	827,90	844,10	16,20	1804,30	2001,10	1902,70	98,40	2,25	2,05	2,46	1058,60	*
C20um071G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN MLR6791.	HYPOTHET	92,50	69,70	81,10	11,40	292,80	249,30	271,05	21,75	3,34	2,60	4,46	189,95	*
W16um071G_at	HYPOTHETICAL PROTEIN RSP0795.	HYPOTHET	105,70	93,60	99,65	6,05	216,70	250,80	233,75	17,05	2,35	2,00	2,74	134,10	*
C25um178G_at	IAA ACETYLTRANSFERASE (EC 2.3.1.-).	IAA ACETYI	1680,50	1996,30	1838,40	157,90	648,10	534,90	591,50	56,60	-3,11	-2,52	-3,86	-1246,90	*
C65um036G_at	INDOLE-3-ACETALDEHYDE DEHYDROG	INDOLE-3-/	1053,90	1055,00	1054,45	0,55	208,80	139,30	174,05	34,75	-6,06	-4,56	-9,02	-880,40	*
C95um161G_at	INDOLE-3-ACETALDEHYDE DEHYDROG	INDOLE-3-/	436,00	442,90	439,45	3,45	1347,00	1159,40	1253,20	93,80	2,85	2,50	3,21	813,75	*
W130um013G_at	INDOLE-3-ACETALDEHYDE DEHYDROG	INDOLE-3-/	552,10	492,90	522,50	29,60	178,00	124,40	151,20	26,80	-3,46	-2,63	-4,93	-371,30	*
W45um110G_at	K08H10.2A PROTEIN.	K08H10.2A	930,00	987,60	958,80	28,80	2100,30	2306,60	2203,45	103,15	2,30	2,09	2,51	1244,65	*
C10um130G_at	LACTOSE REGULATORY PROTEIN LAC	LACTOSE F	407,80	325,60	366,70	41,10	131,80	114,10	122,95	8,85	-2,98	-2,37	-3,68	-243,75	*
C20um183G_at	L-ASCORBATE OXIDASE (EC 1.10.3.3).	L-ASCORB/	24,70	20,60	22,65	2,05	124,20	139,30	131,75	7,55	5,82	4,90	6,99	109,10	*
W50um103G_at	LIPID-TRANSFER PROTEIN.	LIPID-TRAN	110,40	80,40	95,40	15,00	384,50	306,90	345,70	38,80	3,62	2,66	5,10	250,30	*
W140um021G_s_at	LIPOPOLYSACCHARIDE AND BETA-1,3-	LIPOPOLYS	5,20	5,10	5,15	0,05	151,90	155,10	153,50	1,60	29,81	29,11	30,51	148,35	*
W115um074G_at	LYSOSOMAL ACID PHOSPHATASE PRE	LYSOSOM/	964,80	1011,40	988,10	23,30	373,70	272,80	323,25	50,45	-3,06	-2,42	-4,12	-664,85	*
W55um076G_at	MACROFAGE ACTIVATING GLYCOPRO	MACROFAC	2483,40	2474,10	2478,75	4,65	927,70	802,90	865,30	62,40	-2,86	-2,56	-3,25	-1613,45	*
W55um283G_at	MACROFAGE ACTIVATING GLYCOPRO	MACROFAC	136,20	125,20	130,70	5,50	782,00	849,00	815,50	33,50	6,24	5,66	6,88	684,80	*
W25um110G_at	MATING-TYPE LOCUS ALLELE B1 PROT	MATING-TY	12,20	4,40	8,30	3,90	199,80	243,20	221,50	21,70	26,69	14,61	117,95	213,20	*
C45um007G_at	MEIOTIC EXPRESSION UPREGULATED	MEIOTIC E)	1186,60	1180,20	1183,40	3,20	495,80	412,00	453,90	41,90	-2,61	-2,26	-3,07	-729,50	*
C50um097G_at	MEMBRANE PROTEIN.	MEMBRANI	11,80	10,50	11,15	0,65	156,00	142,70	149,35	6,65	13,39	11,89	15,15	138,20	*

W20um166G_at	METALLOPROTEASE MEP1.	METALLOP	9,70	4,60	7,15	2,55	125,10	100,80	112,95	12,15	15,80	9,54	38,63	105,80 *
C110um210G_at	METHYLCROTONYL-COA CARBOXYLAS	METHYLCR	10,30	9,80	10,05	0,25	129,10	108,10	118,60	10,50	11,80	10,03	13,61	108,55 *
C60um175G_at	MFS DRUG EFFLUX TRANSPORTER OF	MFS DRUG	128,90	130,90	129,90	1,00	328,70	313,50	321,10	7,60	2,47	2,37	2,57	191,20 *
W90um178G_at	MFS PERMEASE.	MFS PERM	109,60	97,60	103,60	6,00	239,80	230,90	235,35	4,45	2,27	2,06	2,52	131,75 *
C80um107G_at	MFS-MULTIDRUG-RESISTANCE TRANS	MFS-MULTI	74,70	74,40	74,55	0,15	196,80	168,30	182,55	14,25	2,45	2,13	2,76	108,00 *
W60um081G_at	MIG1 PROTEIN.	MIG1 PROT	17,70	8,10	12,90	4,80	917,20	1047,90	982,55	65,35	76,17	46,51	197,07	969,65 *
C80um086G_at	MIG2-1.	MIG2-1.	30,00	18,20	24,10	5,90	523,90	398,00	460,95	62,95	19,13	12,51	33,15	436,85 *
C75um086G_at	MIG2-2.	MIG2-2.	6,00	4,70	5,35	0,65	239,30	232,80	236,05	3,25	44,12	36,72	55,20	230,70 *
C70um086G_at	MIG2-4.	MIG2-4.	11,70	15,90	13,80	2,10	641,70	709,00	675,35	33,65	48,94	38,50	65,92	661,55 *
C65um086G_at	MIG2-5.	MIG2-5.	20,20	21,20	20,70	0,50	828,70	923,20	875,95	47,25	42,32	38,27	46,50	855,25 *
W30um211G_at	MOLECULAR CHAPERONE MRJ.	MOLECULA	667,50	637,00	652,25	15,25	302,00	274,00	288,00	14,00	-2,26	-2,08	-2,48	-364,25 *
C45um083G_at	MOLYBDENUM COFACTOR SULFURASI	MOLYBDEN	16,00	23,10	19,55	3,55	277,50	266,40	271,95	5,55	13,91	10,69	19,86	252,40 *
C50um222G_at	MONOCARBOXYLATE TRANSPORTER 4	MONOCAR	71,50	74,20	72,85	1,35	230,50	225,00	227,75	2,75	3,13	3,02	3,24	154,90 *
C50um189G_at	MONOOXYGENASE.	MONOOXY	90,00	101,30	95,65	5,65	274,20	241,70	257,95	16,25	2,70	2,34	3,11	162,30 *
C40um002G_at	MULTIDRUG RESISTANT PROTEIN.	MULTIDRU	406,40	373,10	389,75	16,65	119,80	110,40	115,10	4,70	-3,39	-3,07	-3,73	-274,65 *
W55um097G_at	MULTIDRUG RESISTANT PROTEIN.	MULTIDRU	94,10	99,00	96,55	2,45	226,00	207,10	216,55	9,45	2,24	2,06	2,43	120,00 *
C97um186G_at	MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR-LIK	MULTIPRO	396,20	471,90	434,05	37,85	1064,20	1454,60	1259,40	195,20	2,90	2,10	3,82	825,35 *
C140um209G_at	MYO-INOSITOL OXYGENASE (EC 1.13.9	MYO-INOSI	441,20	458,90	450,05	8,85	7,00	5,10	6,05	0,95	-74,39	-58,97	-100,44	-444,00 *
W60um191G_at	MYOSIN VB (FRAGMENT).	MYOSIN VE	232,60	216,70	224,65	7,95	97,10	103,00	100,05	2,95	-2,25	-2,08	-2,42	-124,60 *
C55um126G_at	NA(+)/H(+) ANTIPORTER 2.	NA(+)/H(+)	44,40	40,80	42,60	1,80	158,20	151,80	155,00	3,20	3,64	3,37	3,94	112,40 *
W6um131G_at	N-ACETYLGLUCOSAMINYL-PHOSPHATI	N-ACETYLG	66,30	69,60	67,95	1,65	221,00	298,00	259,50	38,50	3,82	2,88	4,77	191,55 *
C136um192G_at	N-ACETYLGLUCOSAMINYL-PHOSPHATI	N-ACETYLG	387,80	412,90	400,35	12,55	148,30	136,10	142,20	6,10	-2,82	-2,58	-3,08	-258,15 *
W75um008G_at	N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERA	N-ACETYLG	34,90	39,80	37,35	2,45	234,20	169,70	201,95	32,25	5,41	3,92	7,02	164,60 *
C20um189G_at	NADH DEHYDROGENASE (EC 1.6.99.3).	NADH DEH	316,60	340,70	328,65	12,05	738,60	828,10	783,35	44,75	2,38	2,13	2,66	454,70 *
C151um002G_at	NADH DEHYDROGENASE (UBIQUINONE	NADH DEH	216,10	242,10	229,10	13,00	598,10	691,40	644,75	46,65	2,81	2,41	3,27	415,65 *
W10um013G_at	NADP-DEPENDENT LEUKOTRIENE B4 1	NADP-DEPI	142,10	137,50	139,80	2,30	290,40	293,80	292,10	1,70	2,09	2,03	2,15	152,30 *
W90um228G_at	NADP-DEPENDENT LEUKOTRIENE B4 1	NADP-DEPI	210,90	251,90	231,40	20,50	596,30	574,50	585,40	10,90	2,53	2,20	2,97	354,00 *
W80um124G_at	NITRATE REDUCTASE 1 (EC 1.6.6.1) (NI	NITRATE R	268,20	365,60	316,90	48,70	879,00	1198,70	1038,85	159,85	3,28	2,27	4,73	721,95 *
W190um281G_at	NITRILOTRIACETATE MONOOXYGENAS	NITRILOTR	213,90	186,10	200,00	13,90	891,60	896,20	893,90	2,30	4,47	4,01	5,05	693,90 *
C100um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	995,90	906,60	951,25	44,65	346,10	306,00	326,05	20,05	-2,92	-2,57	-3,32	-625,20 *
C100um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	53,00	57,30	55,15	2,15	220,30	241,70	231,00	10,70	4,19	3,79	4,62	175,85 *
C105um012G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	30,40	12,60	21,50	8,90	228,70	222,60	225,65	3,05	10,50	6,24	32,89	204,15 *
C105um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	111,00	105,30	108,15	2,85	243,20	239,50	241,35	1,85	2,23	2,13	2,34	133,20 *
C105um281G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	23,60	7,30	15,45	8,15	165,80	163,40	164,60	1,20	10,65	5,70	80,51	149,15 *
C107um076G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	122,80	147,80	135,30	12,50	509,50	415,60	462,55	46,95	3,42	2,71	4,28	327,25 *
C10um173G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	83,20	109,10	96,15	12,95	375,80	352,40	364,10	11,70	3,79	3,08	4,89	267,95 *
C10um245G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	32,10	21,90	27,00	5,10	726,80	801,50	764,15	37,35	28,30	21,30	41,35	737,15 *
C115um021G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	1423,50	1394,90	1409,20	14,30	292,40	236,60	264,50	27,90	-5,33	-4,54	-6,45	-1144,70 *
C115um031G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	81,00	87,30	84,15	3,15	240,40	235,70	238,05	2,35	2,83	2,66	3,02	153,90 *
C115um049G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	59,50	58,80	59,15	0,35	258,80	197,10	227,95	30,85	3,85	3,00	4,71	168,80 *
C115um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	9,10	8,40	8,75	0,35	413,60	566,40	490,00	76,40	56,00	41,38	71,10	481,25 *
C115um211G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	74,70	71,10	72,90	1,80	284,70	312,40	298,55	13,85	4,10	3,75	4,46	225,65 *
C120um068G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	883,00	748,00	815,50	67,50	240,70	148,20	194,45	46,25	-4,19	-2,92	-6,99	-621,05 *
C120um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	27,90	25,40	26,65	1,25	202,40	172,00	187,20	15,20	7,02	5,98	8,15	160,55 *
C121um068G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	1351,10	1277,40	1314,25	36,85	551,40	332,30	441,85	109,55	-2,97	-2,11	-5,03	-872,40 *
C140um175G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	455,00	576,50	515,75	60,75	1363,00	1564,20	1463,60	100,60	2,84	2,29	3,61	947,85 *
C15um117G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	94,90	88,20	91,55	3,35	752,30	784,70	768,50	16,20	8,39	7,84	9,01	676,95 *
C15um137G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	68,90	71,20	70,05	1,15	288,50	247,90	268,20	20,30	3,83	3,34	4,32	198,15 *
C15um206G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	9,90	5,10	7,50	2,40	273,50	262,30	267,90	5,60	35,72	23,36	75,45	260,40 *
C15um220G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	32,60	10,40	21,50	11,10	503,40	408,20	455,80	47,60	21,20	11,10	140,95	434,30 *
C15um245G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	6,70	7,10	6,90	0,20	167,70	180,20	173,95	6,25	25,21	23,35	27,18	167,05 *
C15um256G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	56,70	55,90	56,30	0,40	678,60	563,60	621,10	57,50	11,03	9,35	12,72	564,80 *
C15um277G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	15,60	7,70	11,65	3,95	397,40	483,80	440,60	43,20	37,82	23,41	86,38	428,95 *
C166um099G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	9,90	12,50	11,20	1,30	131,20	166,60	148,90	17,70	13,29	10,06	17,53	137,70 *
C172um153G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	77,30	69,00	73,15	4,15	560,70	510,20	535,45	25,25	7,32	6,49	8,28	462,30 *
C175um209G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	698,80	681,20	690,00	8,80	235,40	171,50	203,45	31,95	-3,39	-2,69	-4,58	-486,55 *
C20um222G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	590,70	561,90	576,30	14,40	134,30	104,70	119,50	14,80	-4,82	-3,99	-6,08	-456,80 *
C20um245G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	19,30	29,80	24,55	5,25	283,20	317,60	300,40	17,20	12,24	8,90	19,03	275,85 *
C21um189G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	40,90	40,80	40,85	0,05	359,60	425,40	392,50	32,90	9,61	8,28	10,93	351,65 *
C21um245G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	33,60	21,00	27,30	6,30	168,60	176,30	172,45	3,85	6,32	4,57	10,19	145,15 *
C230um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	66,60	71,50	69,05	2,45	445,30	462,90	454,10	8,80	6,58	6,16	7,04	385,05 *
C256um074G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	54,00	47,20	50,60	3,40	216,50	204,90	210,70	5,80	4,16	3,71	4,72	160,10 *

C25um036G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	13,50	13,40	13,45	0,05	133,60	122,10	127,85	5,75	9,51	8,80	10,21	114,40 *
C25um139G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	12,70	24,20	18,45	5,75	127,80	126,70	127,25	0,55	6,90	4,56	14,15	108,80 *
C25um179G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	6,40	9,70	8,05	1,65	452,00	540,80	496,40	44,40	61,66	44,21	94,93	488,35 *
C26um006G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	26,40	19,70	23,05	3,35	135,40	144,80	140,10	4,70	6,08	4,87	8,03	117,05 *
C34um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	62,00	54,50	58,25	3,75	259,00	294,10	276,55	17,55	4,75	4,09	5,51	218,30 *
C34um240G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	311,80	314,90	313,35	1,55	139,30	121,70	130,50	8,80	-2,40	-2,16	-2,70	-182,85 *
C34um264G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	46,60	56,50	51,55	4,95	165,40	192,30	178,85	13,45	3,47	2,85	4,27	127,30 *
C35um103G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	1400,20	1571,40	1485,80	85,60	628,20	498,50	563,35	64,85	-2,64	-2,16	-3,31	-922,45 *
C35um179G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	57,70	62,30	60,00	2,30	337,90	302,30	320,10	17,80	5,33	4,76	5,95	260,10 *
C35um211G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	54,20	59,00	56,60	2,40	467,80	485,10	476,45	8,65	8,42	7,82	9,10	419,85 *
C35um264G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	84,00	91,80	87,90	3,90	277,30	203,00	240,15	37,15	2,73	2,02	3,47	152,25 *
C36um020G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	73,50	75,50	74,50	1,00	181,90	214,50	198,20	16,30	2,66	2,30	3,03	123,70 *
C36um130G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	256,60	254,90	255,75	0,85	102,50	115,90	109,20	6,70	-2,34	-2,13	-2,61	-146,55 *
C40um084G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	10,70	10,90	10,80	0,10	4212,40	4310,70	4261,55	49,15	394,59	385,08	404,28	4250,75 *
C40um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	20,00	27,80	23,90	3,90	284,40	297,80	291,10	6,70	12,18	9,57	16,68	267,20 *
C40um236G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	18,00	21,10	19,55	1,55	2230,50	2486,20	2358,35	127,85	120,63	103,38	142,05	2338,80 *
C40um236G_x_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	13,20	14,10	13,65	0,45	1839,50	2317,40	2078,45	238,95	152,27	122,71	182,72	2064,80 *
C45um006G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	15,30	18,00	16,65	1,35	155,60	149,50	152,55	3,05	9,16	8,05	10,61	135,90 *
C45um124G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	19,20	9,80	14,50	4,70	326,40	438,50	382,45	56,05	26,38	15,82	57,89	367,95 *
C45um195G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	17,40	9,20	13,30	4,10	241,80	196,60	219,20	22,60	16,48	10,48	33,89	205,90 *
C50um036G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	42,20	39,60	40,90	1,30	168,70	162,20	165,45	3,25	4,05	3,81	4,31	124,55 *
C50um226G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	397,50	313,90	355,70	41,80	72,80	81,60	77,20	4,40	-4,61	-3,65	-5,64	-278,50 *
C50um227G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	1308,10	1235,70	1271,90	36,20	518,60	406,40	462,50	56,10	-2,75	-2,28	-3,45	-809,40 *
C55um081G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	31,20	21,40	26,30	4,90	172,30	190,00	181,15	8,85	6,89	5,20	10,00	154,85 *
C55um124G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	8,30	7,70	8,00	0,30	254,60	253,90	254,25	0,35	31,78	29,93	33,87	246,25 *
C55um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	28,50	24,70	26,60	1,90	200,80	214,90	207,85	7,05	7,81	6,89	8,95	181,25 *
C5um041G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	444,00	415,70	429,85	14,15	195,90	153,60	174,75	21,15	-2,46	-2,03	-3,09	-255,10 *
C5um241G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	9,50	35,70	22,60	13,10	161,80	162,50	162,15	0,35	7,17	3,67	154,07	139,55 *
C5um277G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	61,30	69,50	65,40	4,10	471,00	624,00	547,50	76,50	8,37	6,34	10,58	482,10 *
C60um063G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	136,60	133,20	134,90	1,70	338,80	458,70	398,75	59,95	2,96	2,22	3,69	263,85 *
C60um070G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	74,20	74,10	74,15	0,05	354,10	460,20	407,15	53,05	5,49	4,31	6,67	333,00 *
C60um177G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	803,20	826,60	814,90	11,70	235,90	232,70	234,30	1,60	-3,48	-3,39	-3,57	-580,60 *
C65um060G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	100,80	92,00	96,40	4,40	257,70	212,60	235,15	22,55	2,44	2,03	2,88	138,75 *
C65um257G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	5,60	5,60	5,60	0,00	118,80	107,30	113,05	5,75	20,19	20,19	20,19	107,45 *
C67um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	7,10	11,30	9,20	2,10	239,40	312,60	276,00	36,60	30,00	20,03	49,81	266,80 *
C70um112G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	261,60	266,40	264,00	2,40	126,50	129,40	127,95	1,45	-2,06	-2,01	-2,11	-136,05 *
C75um024G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	59,50	58,10	58,80	0,70	208,50	220,70	214,60	6,10	3,65	3,47	3,84	155,80 *
C75um069G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	392,60	365,10	378,85	13,75	154,80	154,50	154,65	0,15	-2,45	-2,30	-2,60	-224,20 *
C75um085G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	60,40	76,90	68,65	8,25	356,00	394,40	375,20	19,20	5,47	4,47	6,91	306,55 *
C75um091G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	71,00	75,90	73,45	2,45	310,90	268,20	289,55	21,35	3,94	3,43	4,48	216,10 *
C75um148G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	35,70	30,30	33,00	2,70	155,60	163,00	159,30	3,70	4,83	4,23	5,60	126,30 *
C80um023G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	317,20	248,30	282,75	34,45	1310,10	1246,30	1278,20	31,90	4,52	3,75	5,67	995,45 *
C80um042G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	10,50	13,60	12,05	1,55	190,20	177,20	183,70	6,50	15,24	12,46	19,46	171,65 *
C80um074G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	115,30	116,10	115,70	0,40	723,00	697,10	710,05	12,95	6,14	5,95	6,32	594,35 *
C80um169G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	8,20	7,10	7,65	0,55	190,00	176,00	183,00	7,00	23,92	21,02	27,51	175,35 *
C84um109G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	906,20	788,90	847,55	58,65	237,50	235,60	236,55	0,95	-3,58	-3,17	-3,99	-611,00 *
C85um043G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	388,50	311,00	349,75	38,75	121,90	110,30	116,10	5,80	-3,01	-2,43	-3,64	-233,65 *
C85um109G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	808,30	716,60	762,45	45,85	171,90	146,20	159,05	12,85	-4,79	-4,07	-5,69	-603,40 *
C89um182G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	85,60	103,10	94,35	8,75	261,00	254,30	257,65	3,35	2,73	2,37	3,23	163,30 *
C91um167G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	94,70	97,90	96,30	1,60	248,80	267,20	258,00	9,20	2,68	2,51	2,85	161,70 *
C95um078G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	38,80	39,20	39,00	0,20	258,00	267,10	262,55	4,55	6,73	6,53	6,93	223,55 *
C96um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	28,00	14,40	21,20	6,80	365,80	338,20	352,00	13,80	16,60	10,80	35,21	330,80 *
CLUSTER3_RC_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	135,20	142,60	138,90	3,70	372,40	489,70	431,05	58,65	3,10	2,40	3,82	292,15 *
CLUSTER31_RC_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	299,50	315,80	307,65	8,15	136,00	116,70	126,35	9,65	-2,43	-2,15	-2,80	-181,30 *
CLUSTER64_RC_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	299,80	262,90	281,35	18,45	118,90	115,30	117,10	1,80	-2,40	-2,14	-2,67	-164,25 *
EST01um049_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	268,60	291,30	279,95	11,35	79,70	74,10	76,90	2,80	-3,64	-3,33	-3,98	-203,05 *
EST01um099_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	894,10	855,30	874,70	19,40	392,30	369,50	380,90	11,40	-2,30	-2,16	-2,44	-493,80 *
EST01um145_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	411,90	384,00	397,95	13,95	119,60	118,90	119,25	0,35	-3,34	-3,14	-3,53	-278,70 *
EST01um208_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	62,20	68,10	65,15	2,95	179,90	188,10	184,00	4,10	2,82	2,60	3,08	118,85 *
EST02um075_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	56,90	31,30	44,10	12,80	236,10	323,50	279,80	43,70	6,34	3,88	12,56	235,70 *
UG21-14a22-110c6_	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	77,90	76,10	77,00	0,90	318,50	241,80	280,15	38,35	3,64	2,82	4,46	203,15 *
UG23-15a20-108c6_	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	461,70	471,50	466,60	4,90	204,00	202,80	203,40	0,60	-2,29	-2,25	-2,34	-263,20 *

UG23-1a14-46h7_R	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	104,80	94,10	99,45	5,35	292,70	297,20	294,95	2,25	2,97	2,72	3,26	195,50 *
UG23-1i5-133h4_R(	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	667,60	641,40	654,50	13,10	256,70	230,00	243,35	13,35	-2,69	-2,45	-2,97	-411,15 *
UG24-1d14-47c8_R	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	988,60	1036,90	1012,75	24,15	430,90	392,70	411,80	19,10	-2,46	-2,26	-2,69	-600,95 *
W100um192G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	292,20	343,30	317,75	25,55	817,10	881,60	849,35	32,25	2,67	2,32	3,12	531,60 *
W102um070G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	53,70	66,90	60,30	6,60	465,80	493,80	479,80	14,00	7,96	6,69	9,75	419,50 *
W105um119G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	572,20	612,60	592,40	20,20	1408,80	1522,10	1465,45	56,65	2,47	2,27	2,69	873,05 *
W105um126G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	69,20	71,80	70,50	1,30	854,60	1044,00	949,30	94,70	13,47	11,23	15,73	878,80 *
W10um023G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	51,90	38,90	45,40	6,50	169,90	178,30	174,10	4,20	3,83	3,09	5,03	128,70 *
W10um051G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	7,80	9,10	8,45	0,65	170,30	148,70	159,50	10,80	18,88	15,96	22,41	151,05 *
W10um091G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	4,20	4,70	4,45	0,25	362,10	359,10	360,60	1,50	81,03	74,16	89,30	356,15 *
W10um207G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	94,80	84,70	89,75	5,05	231,70	213,20	222,45	9,25	2,48	2,21	2,79	132,70 *
W10um267G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	29,50	55,50	42,50	13,00	244,90	213,90	229,40	15,50	5,40	3,53	10,93	186,90 *
W10um267G_x_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	75,40	83,10	79,25	3,85	269,70	245,10	257,40	12,30	3,25	2,90	3,63	178,15 *
W110um094G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	67,40	58,90	63,15	4,25	214,80	224,80	219,80	5,00	3,48	3,11	3,94	156,65 *
W110um119G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	73,10	87,40	80,25	7,15	242,10	299,60	270,85	28,75	3,38	2,67	4,23	190,60 *
W115um150G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	68,00	64,00	66,00	2,00	248,60	204,30	226,45	22,15	3,43	2,86	4,02	160,45 *
W115um154G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	9,20	6,50	7,85	1,35	140,10	124,50	132,30	7,80	16,85	12,86	23,77	124,45 *
W11um267G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	60,30	42,00	51,15	9,15	316,80	340,10	328,45	11,65	6,42	4,92	9,14	277,30 *
W120um188G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	26,50	35,60	31,05	4,55	293,20	307,10	300,15	6,95	9,67	7,76	12,77	269,10 *
W120um281G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	41,00	62,50	51,75	10,75	251,00	257,60	254,30	3,30	4,91	3,66	7,47	202,55 *
W123um068G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	1102,20	1226,00	1164,10	61,90	446,50	361,30	403,90	42,60	-2,88	-2,40	-3,55	-760,20 *
W125um220G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	64,50	69,20	66,85	2,35	395,10	398,90	397,00	1,90	5,94	5,61	6,31	330,15 *
W126um140G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	49,00	47,80	48,40	0,60	332,00	314,10	323,05	8,95	6,67	6,34	7,01	274,65 *
W130um209G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	40,80	46,70	43,75	2,95	309,80	257,80	283,80	26,00	6,49	5,34	7,79	240,05 *
W135um012G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	12,00	13,90	12,95	0,95	169,10	171,40	170,25	1,15	13,15	11,72	14,96	157,30 *
W135um172G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	144,60	137,90	141,25	3,35	557,00	534,60	545,80	11,20	3,86	3,67	4,07	404,55 *
W140um005G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	13,40	16,10	14,75	1,35	146,00	158,50	152,25	6,25	10,32	8,82	12,30	137,50 *
W142um055G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	781,60	729,30	755,45	26,15	254,90	176,40	215,65	39,25	-3,50	-2,68	-5,02	-539,80 *
W15um158G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	767,90	844,50	806,20	38,30	285,00	247,00	266,00	19,00	-3,03	-2,64	-3,51	-540,20 *
W15um243G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	253,40	258,60	256,00	2,60	83,40	78,10	80,75	2,65	-3,17	-3,00	-3,36	-175,25 *
W16um206G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	124,30	116,30	120,30	4,00	453,80	380,40	417,10	36,70	3,47	2,94	4,01	296,80 *
W180um175G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	92,40	102,30	97,35	4,95	335,30	364,30	349,80	14,50	3,59	3,23	4,01	252,45 *
W191um281G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	444,60	455,00	449,80	5,20	1328,90	1292,40	1310,65	18,25	2,91	2,83	3,00	860,85 *
W195um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	26,50	10,60	18,55	7,95	236,50	223,90	230,20	6,30	12,41	7,26	42,08	211,65 *
W200um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	25,20	35,80	30,50	5,30	192,40	214,70	203,55	11,15	6,67	5,10	9,44	173,05 *
W205um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	11,90	11,40	11,65	0,25	178,20	172,60	175,40	2,80	15,06	14,41	15,74	163,75 *
W20um165G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	35,00	44,10	39,55	4,55	221,60	232,80	227,20	5,60	5,74	4,81	7,11	187,65 *
W210um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	10,60	13,70	12,15	1,55	368,20	359,40	363,80	4,40	29,94	24,72	37,92	351,65 *
W215um010G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	40,70	31,20	35,95	4,75	308,00	263,60	285,80	22,20	7,95	6,25	10,43	249,85 *
W21um006G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	94,60	111,70	103,15	8,55	272,90	267,10	270,00	2,90	2,62	2,30	3,03	166,85 *
W21um198G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	331,60	377,50	354,55	22,95	136,50	149,20	142,85	6,35	-2,48	-2,17	-2,82	-211,70 *
W235um074G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	742,80	776,80	759,80	17,00	330,90	310,10	320,50	10,40	-2,37	-2,22	-2,53	-439,30 *
W25um245G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	70,60	73,70	72,15	1,55	187,70	164,90	176,30	11,40	2,44	2,17	2,72	104,15 *
W30um085G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	65,40	58,50	61,95	3,45	466,70	487,10	476,90	10,20	7,70	7,00	8,52	414,95 *
W30um089G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	61,30	57,70	59,50	1,80	160,60	173,30	166,95	6,35	2,81	2,59	3,04	107,45 *
W30um283G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	15,50	18,10	16,80	1,30	210,30	231,30	220,80	10,50	13,14	11,37	15,35	204,00 *
W35um085G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	15,60	12,10	13,85	1,75	211,20	204,60	207,90	3,30	15,01	12,40	18,97	194,05 *
W35um102G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	44,40	50,00	47,20	2,80	154,00	142,50	148,25	5,75	3,14	2,80	3,54	101,05 *
W35um122G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	44,90	34,90	39,90	5,00	181,50	186,90	184,20	2,70	4,62	3,82	5,82	144,30 *
W35um255G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	86,10	137,40	111,75	25,65	315,90	349,60	332,75	16,85	2,98	2,13	4,81	221,00 *
W35um261G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	245,80	212,20	229,00	16,80	600,20	582,90	591,55	8,65	2,58	2,30	2,94	362,55 *
W40um064G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	11,10	37,50	24,30	13,20	438,30	470,00	454,15	15,85	18,69	9,84	175,52	429,85 *
W40um102G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	27,00	7,90	17,45	9,55	203,30	174,60	188,95	14,35	10,83	5,60	108,58	171,50 *
W40um152G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	37,90	25,80	31,85	6,05	315,20	308,40	311,80	3,40	9,79	7,45	14,24	279,95 *
W40um179G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	42,30	35,90	39,10	3,20	303,80	231,40	267,60	36,20	6,84	5,17	8,77	228,50 *
W40um198G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	105,10	95,90	100,50	4,60	270,10	283,90	277,00	6,90	2,76	2,53	3,01	176,50 *
W40um264G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	17,60	20,80	19,20	1,60	136,60	134,80	135,70	0,90	7,07	6,21	8,19	116,50 *
W40um273G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	140,90	156,80	148,85	7,95	853,60	973,60	913,60	60,00	6,14	5,33	7,04	764,75 *
W45um020G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	513,90	517,00	515,45	1,55	219,90	182,30	201,10	18,80	-2,56	-2,22	-3,03	-314,35 *
W45um064G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	7,30	7,50	7,40	0,10	301,70	237,10	269,40	32,30	36,41	29,20	43,65	262,00 *
W45um103G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	60,90	90,10	75,50	14,60	313,70	284,90	299,30	14,40	3,96	2,97	5,85	223,80 *
W45um131G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	162,40	198,20	180,30	17,90	431,00	427,70	429,35	1,65	2,38	2,05	2,85	249,05 *

W50um040G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	108,30	110,00	109,15	0,85	291,00	262,50	276,75	14,25	2,54	2,32	2,75	167,60 *
W50um122G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	74,20	83,70	78,95	4,75	385,90	380,40	383,15	2,75	4,85	4,41	5,39	304,20 *
W50um124G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	48,00	42,10	45,05	2,95	832,20	1007,40	919,80	87,60	20,42	16,75	24,57	874,75 *
W50um159G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	9,30	10,00	9,65	0,35	221,50	183,10	202,30	19,20	20,96	17,53	24,55	192,65 *
W51um130G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	45,70	43,10	44,40	1,30	167,50	170,40	168,95	1,45	3,81	3,62	4,01	124,55 *
W55um203G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	379,90	399,20	389,55	9,65	843,40	944,60	894,00	50,60	2,29	2,07	2,53	504,45 *
W56um278G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	112,90	113,90	113,40	0,50	345,90	382,80	364,35	18,45	3,21	2,94	3,48	250,95 *
W5um113G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	102,60	113,90	108,25	5,65	301,20	311,90	306,55	5,35	2,83	2,59	3,11	198,30 *
W5um167G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	10,80	10,50	10,65	0,15	206,90	154,60	180,75	26,15	16,97	12,92	21,04	170,10 *
W5um222G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	29,70	36,50	33,10	3,40	322,70	229,20	275,95	46,75	8,34	5,81	11,35	242,85 *
W65um066G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	9,50	8,40	8,95	0,55	366,40	509,70	438,05	71,65	48,94	35,30	63,60	429,10 *
W65um124G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	42,20	15,60	28,90	13,30	341,10	350,00	345,55	4,45	11,96	6,80	49,20	316,65 *
W65um146G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	8,30	9,50	8,90	0,60	154,10	148,10	151,10	3,00	16,98	15,20	19,17	142,20 *
W65um186G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	426,80	426,30	426,55	0,25	197,20	160,70	178,95	18,25	-2,38	-2,04	-2,86	-247,60 *
W6um060G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	9,10	8,70	8,90	0,20	139,90	132,40	136,15	3,75	15,30	14,42	16,21	127,25 *
W70um036G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	236,50	226,00	231,25	5,25	92,40	66,80	79,60	12,80	-2,91	-2,29	-3,96	-151,65 *
W70um170G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	50,60	11,60	31,10	19,50	1720,40	1948,70	1834,55	114,15	58,99	28,74	100000000,00	1803,45 *
W70um213G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	73,70	75,70	74,70	1,00	888,50	805,00	846,75	41,75	11,34	10,39	12,29	772,05 *
W71um024G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	88,50	93,30	90,90	2,40	293,10	247,70	270,40	22,70	2,97	2,55	3,41	179,50 *
W71um148G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	60,30	41,60	50,95	9,35	194,00	144,30	169,15	24,85	3,32	2,27	5,04	118,20 *
W72um035G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	38,90	40,70	39,80	0,90	237,40	209,40	223,40	14,00	5,61	5,01	6,24	183,60 *
W75um150G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	1044,20	1214,00	1129,10	84,90	459,10	417,10	438,10	21,00	-2,58	-2,21	-2,97	-691,00 *
W75um158G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	153,70	175,30	164,50	10,80	474,00	538,40	506,20	32,20	3,08	2,65	3,58	341,70 *
W7um082G_s_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	154,50	147,90	151,20	3,30	510,70	489,30	500,00	10,70	3,31	3,14	3,48	348,80 *
W7um163G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	172,30	179,70	176,00	3,70	752,30	695,50	723,90	28,40	4,11	3,82	4,42	547,90 *
W80um069G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	994,40	1072,70	1033,55	39,15	323,40	271,90	297,65	25,75	-3,47	-2,99	-4,09	-735,90 *
W80um075G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	498,80	489,60	494,20	4,60	237,40	220,30	228,85	8,55	-2,16	-2,03	-2,30	-265,35 *
W80um084G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	112,80	95,80	104,30	8,50	296,30	335,30	315,80	19,50	3,03	2,57	3,60	211,50 *
W80um148G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	34,30	29,20	31,75	2,55	666,80	702,20	684,50	17,70	21,56	18,90	24,98	652,75 *
W81um084G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	30,60	38,70	34,65	4,05	147,30	162,40	154,85	7,55	4,47	3,68	5,60	120,20 *
W82um213G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	671,70	657,00	664,35	7,35	259,00	277,20	268,10	9,10	-2,48	-2,34	-2,63	-396,25 *
W85um125G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	14,50	17,60	16,05	1,55	141,90	153,90	147,90	6,00	9,21	7,83	11,08	131,85 *
W85um173G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	4,20	7,90	6,05	1,85	152,20	176,70	164,45	12,25	27,18	17,68	55,09	158,40 *
W90um126G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	47,00	47,70	47,35	0,35	209,10	217,20	213,15	4,05	4,50	4,35	4,65	165,80 *
W90um281G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	8,80	6,70	7,75	1,05	130,50	118,80	124,65	5,85	16,08	12,94	20,91	116,90 *
W91um227G_at	NO ANNOTATION AVAILABLE	NO ANNOT	187,60	178,30	182,95	4,65	83,60	78,60	81,10	2,50	-2,26	-2,11	-2,41	-101,85 *
W30um096G_at	NOPP34 NUCLEOLAR PHOSPHOPROTE	NOPP34 NU	155,30	158,70	157,00	1,70	378,90	380,00	379,45	0,55	2,42	2,37	2,46	222,45 *
C80um280G_at	OPSIN.	OPSIN.	118,90	123,30	121,10	2,20	1168,20	1089,30	1128,75	39,45	9,32	8,72	9,93	1007,65 *
W85um157G_at	PARASITIC PHASE-SPECIFIC PROTEIN	PARASITIC	892,70	945,20	918,95	26,25	379,40	285,90	332,65	46,75	-2,76	-2,23	-3,61	-586,30 *
W95um113G_at	P-COUMARIC ACID DECARBOXYLASE.	P-COUMAR	19,00	19,60	19,30	0,30	423,20	408,90	416,05	7,15	21,56	20,75	22,39	396,75 *
W165um013G_at	PECTIN METHYLESTERASE (EC 3.1.1.11	PECTIN ME	22,00	32,10	27,05	5,05	179,00	180,70	179,85	0,85	6,65	5,09	9,60	152,80 *
W10um264G_at	PEPTIDE TRANSPORTER MTD1.	PEPTIDE TI	63,50	65,80	64,65	1,15	244,00	206,20	225,10	18,90	3,48	2,99	3,98	160,45 *
C20um084G_at	PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMER	PEPTIDYL-I	266,90	378,30	322,60	55,70	1526,50	1941,90	1734,20	207,70	5,38	3,85	7,84	1411,60 *
W75um019G_at	PERIPHERAL-TYPE BENZODIAZEPINE F	PERIPHER/	356,40	465,20	410,80	54,40	1221,40	1513,20	1367,30	145,90	3,33	2,53	4,46	956,50 *
C125um013G_at	PEROXISOMAL COPPER AMINE OXIDA	PEROXISOI	893,00	859,90	876,45	16,55	314,50	107,70	211,10	103,40	-4,15	-2,30	-21,37	-665,35 *
C45um082G_at	PEROXISOMAL MEMBRANE PROTEIN P	PEROXISOI	539,60	634,40	587,00	47,40	1465,00	1457,40	1461,20	3,80	2,49	2,20	2,87	874,20 *
C165um054G_at	PHENOL 2-MONOOXYGENASE (EC 1.14	PHENOL 2-	71,60	65,20	68,40	3,20	193,30	199,00	196,15	2,85	2,87	2,65	3,12	127,75 *
C35um108G_at	PHENYLALANYL-TRNA SYNTHETASE, M	PHENYLAL/	498,90	477,30	488,10	10,80	209,60	226,70	218,15	8,55	-2,24	-2,08	-2,41	-269,95 *
W15um222G_at	PHENYLCOUMARAN BENZYLIC ETHER	PHENYLCC	170,30	185,90	178,10	7,80	866,30	908,90	887,60	21,30	4,98	4,60	5,42	709,50 *
W105um156G_at	PHEROMONE-RESPONSIVE MAPKK KIN	PHEROMOI	376,80	317,70	347,25	29,55	113,60	94,40	104,00	9,60	-3,34	-2,72	-4,12	-243,25 *
W5um156G_at	PHYTASE PRECURSOR (EC 3.1.3.26).	PHYTASE F	81,60	92,80	87,20	5,60	215,20	201,90	208,55	6,65	2,39	2,13	2,70	121,35 *
W90um147G_at	PI067 PROTEIN.	PI067 PRO	1343,90	1124,90	1234,40	109,50	509,90	371,60	440,75	69,15	-2,80	-2,12	-3,88	-793,65 *
C120um021G_at	PIMK PROTEIN.	PIMK PROT	262,70	207,70	235,20	27,50	97,00	79,00	88,00	9,00	-2,67	-2,05	-3,45	-147,20 *
C95um126G_at	PISATIN DEMETHYLASE (EC 1.14.-.-) (C	PISATIN DE	30,60	22,60	26,60	4,00	261,40	198,40	229,90	31,50	8,64	6,17	12,24	203,30 *
W25um228G_at	PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACET	PLATELET-	511,80	522,70	517,25	5,45	203,10	197,20	200,15	2,95	-2,58	-2,51	-2,66	-317,10 *
C55um069G_at	POTASSIUM-TRANSPORTING ATPASE /	POTASSIUI	7,40	6,80	7,10	0,30	109,10	129,60	119,35	10,25	16,81	14,24	19,55	112,25 *
W10um103G_at	PREDICTED 2-NITROPROPANE DIOXYG	PREDICTEI	828,00	761,00	794,50	33,50	217,80	202,00	209,90	7,90	-3,79	-3,45	-4,15	-584,60 *
W20um095G_at	PROTEIN KINASE (PROTEIN KINASE, 41	PROTEIN K	21,30	21,30	21,30	0,00	151,00	170,90	160,95	9,95	7,56	7,56	7,56	139,65 *
C140um157G_at	PROTEIN KINASE C.	PROTEIN K	133,20	133,10	133,15	0,05	563,10	496,70	529,90	33,20	3,98	3,57	4,39	396,75 *
C115um175G_at	PROTEOPHOSPHOGLYCAN (FRAGMEN	PROTEOPH	329,80	354,00	341,90	12,10	157,90	159,70	158,80	0,90	-2,15	-2,03	-2,28	-183,10 *
C10um163G_at	PUITATIVE EXOCHITINASE (FRAGMENT	PUITATIVE	263,20	190,60	226,90	36,30	749,10	920,20	834,65	85,55	3,68	2,73	5,17	607,75 *
W140um171G_at	PURINE PERMEASE.	PURINE PE	228,10	182,60	205,35	22,75	80,60	68,00	74,30	6,30	-2,76	-2,18	-3,46	-131,05 *

W40um208G_at	PUTATIVE 2-DEHYDROPANTOATE 2-RE	PUTATIVE 2	1186,00	1165,70	1175,85	10,15	413,50	283,10	348,30	65,20	-3,38	-2,58	-4,88	-827,55	*
W55um098G_at	PUTATIVE CELL ADHESION PROTEIN S	PUTATIVE (	71,80	68,80	70,30	1,50	202,60	191,30	196,95	5,65	2,80	2,64	2,97	126,65	*
W85um010G_at	PUTATIVE DNA POLYMERASE X.	PUTATIVE I	70,40	73,80	72,10	1,70	225,40	210,00	217,70	7,70	3,02	2,81	3,24	145,60	*
W65um126G_at	PUTATIVE METHYLTRANSFERASE RV3	PUTATIVE I	1601,70	1626,40	1614,05	12,35	308,90	318,60	313,75	4,85	-5,14	-5,00	-5,29	-1300,30	*
C59um169G_at	PUTATIVE SECRETED PROTEIN.	PUTATIVE S	1174,90	1072,60	1123,75	51,15	232,00	218,50	225,25	6,75	-4,99	-4,55	-5,45	-898,50	*
C40um028G_at	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN	PUTATIVE T	412,60	364,40	388,50	24,10	106,80	104,90	105,85	0,95	-3,67	-3,29	-4,05	-282,65	*
W30um059G_at	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN	PUTATIVE T	98,80	86,80	92,80	6,00	261,90	218,70	240,30	21,60	2,59	2,14	3,09	147,50	*
W5um229G_at	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN	PUTATIVE T	7,30	5,80	6,55	0,75	109,50	106,10	107,80	1,70	16,46	13,82	20,31	101,25	*
W85um189G_at	QUINONE-OXIDOREDUCTASE QR1 (FR	QUINONE-(	786,60	757,40	772,00	14,60	1696,10	1754,40	1725,25	29,15	2,23	2,14	2,33	953,25	*
W95um166G_at	RDS1 PROTEIN.	RDS1 PROT	29,00	30,90	29,95	0,95	147,10	144,10	145,60	1,50	4,86	4,61	5,14	115,65	*
C15um268G_at	RELATED TO HOST-SPECIFIC AK-TOXI	RELATED T	243,10	211,40	227,25	15,85	83,00	70,70	76,85	6,15	-2,96	-2,49	-3,53	-150,40	*
C11um020G_at	RELATED TO LIGHT INDUCED ALCOHO	RELATED T	35,20	30,40	32,80	2,40	132,20	155,00	143,60	11,40	4,38	3,66	5,23	110,80	*
W125um040G_at	RELATED TO STRESS RESPONSE PRO	RELATED T	171,50	168,70	170,10	1,40	499,80	548,40	524,10	24,30	3,08	2,84	3,32	354,00	*
C50um068G_at	RELATED TO TRANSPORT PROTEIN US	RELATED T	263,70	270,40	267,05	3,35	119,00	118,10	118,55	0,45	-2,25	-2,20	-2,30	-148,50	*
W120um002G_at	REPELLENT PROTEIN.	REPELLENT	54,30	51,20	52,75	1,55	331,80	237,50	284,65	47,15	5,40	3,91	6,90	231,90	*
W50um018G_at	REPRESSED BY TUP1 PROTEIN 4.	REPRESSE	61,90	42,50	52,20	9,70	192,00	206,60	199,30	7,30	3,82	2,90	5,52	147,10	*
C135um025G_at	REPRESSIBLE ALKALINE PHOSPHATAS	REPRESSIB	173,90	174,10	174,00	0,10	612,30	592,30	602,30	10,00	3,46	3,37	3,56	428,30	*
W20um226G_at	RETROELEMENT POL POLYPROTEIN-L	RETROELE	447,50	436,50	442,00	5,50	203,60	191,00	197,30	6,30	-2,24	-2,12	-2,37	-244,70	*
W45um025G_at	RHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS 3-OXO/	RHAMNOLI	58,40	34,90	46,65	11,75	264,50	252,00	258,25	6,25	5,54	3,90	9,46	211,60	*
W40um185G_at	RIBOFLAVIN ALDEHYDE-FORMING ENZ	RIBOFLAVI	242,10	229,20	235,65	6,45	574,40	607,20	590,80	16,40	2,51	2,35	2,67	355,15	*
C145um120G_at	RIBONUCLEASE T2 PRECURSOR (EC 3	RIBONUCLI	84,50	97,40	90,95	6,45	265,00	220,70	242,85	22,15	2,67	2,19	3,22	151,90	*
W130um003G_at	RIBOSOMAL-PROTEIN-SERINE ACETYL	RIBOSOMA	1744,80	1824,90	1784,85	40,05	768,80	682,60	725,70	43,10	-2,46	-2,22	-2,74	-1059,15	*
W85um021G_at	ROOT IRON TRANSPORTER PROTEIN.	ROOT IRON	11,90	5,10	8,50	3,40	119,00	98,70	108,85	10,15	12,81	7,50	37,66	100,35	*
C25um039G_at	S-ADENOSYLMETHIONINE:DIACYLGLY(	S-ADENOS	8,10	8,70	8,40	0,30	330,30	287,80	309,05	21,25	36,79	32,22	41,62	300,65	*
C25um131G_at	SALICYLATE 1-MONOOXYGENASE (EC	SALICYLAT	15,70	8,00	11,85	3,85	174,30	193,20	183,75	9,45	15,51	10,00	33,41	171,90	*
C36um060G_at	SAM-DEPENDENT METHYLTRANSFERA	SAM-DEPEI	1168,20	1344,50	1256,35	88,15	461,90	389,20	425,55	36,35	-2,95	-2,47	-3,56	-830,80	*
W75um033G_at	SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPH	SERINE/TH	408,90	405,90	407,40	1,50	195,30	190,10	192,70	2,60	-2,11	-2,07	-2,16	-214,70	*
C65um276G_at	SEVEN TRANSMEMBRANE PROTEIN 1.	SEVEN TRA	867,50	723,00	795,25	72,25	277,40	291,30	284,35	6,95	-2,80	-2,37	-3,23	-510,90	*
W25um026G_at	SEXUAL DIFFERENTIATION PROCESS	SEXUAL DI	50,40	43,50	46,95	3,45	150,60	146,40	148,50	2,10	3,16	2,81	3,60	101,55	*
W95um249G_at	SHORT CHAIN DEHYDROGENASE FAM	SHORT CH.	5,00	5,50	5,25	0,25	120,00	104,50	112,25	7,75	21,38	18,55	24,47	107,00	*
W15um042G_at	SIGNAL RECOGNITION PARTICLE RECE	SIGNAL RE	164,40	168,00	166,20	1,80	69,00	60,20	64,60	4,40	-2,57	-2,31	-2,90	-101,60	*
C55um112G_at	SIMILAR TO ARABIDOPSIS THALIANA D	SIMILAR TO	922,10	838,60	880,35	41,75	297,40	247,00	272,20	25,20	-3,23	-2,75	-3,88	-608,15	*
W200um019G_at	SODIUM/POTASSIUM-TRANSPORTING /	SODIUM/PO	11,50	15,80	13,65	2,15	170,90	195,90	183,40	12,50	13,44	10,36	18,45	169,75	*
C115um024G_at	SPERMIDINE/SPERMINE N(1)-ACETYLTI	SPERMIDIN	1434,40	1717,80	1576,10	141,70	488,10	488,30	488,20	0,10	-3,23	-2,75	-3,71	-1087,90	*
C90um112G_at	STREPTOCOCCAL HEMAGGLUTININ.	STREPTOC	437,30	334,00	385,65	51,65	129,30	115,40	122,35	6,95	-3,15	-2,42	-3,94	-263,30	*
C150um120G_at	SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE PF	SUBTILISIN	12,00	13,10	12,55	0,55	128,90	101,90	115,40	13,50	9,20	7,35	11,14	102,85	*
C20um064G_at	SUBUNIT NUHM OF PROTEIN NADH:UB	SUBUNIT N	162,40	151,80	157,10	5,30	373,30	523,50	448,40	75,10	2,85	2,06	3,67	291,30	*
W25um064G_at	SUBUNIT NUIM OF PROTEIN NADH:UBI	SUBUNIT N	77,10	87,50	82,30	5,20	292,40	397,90	345,15	52,75	4,19	3,09	5,39	262,85	*
C60um135G_at	SUGAR TRANSPORTER STL1.	SUGAR TRA	223,70	233,90	228,80	5,10	647,10	584,00	615,55	31,55	2,69	2,45	2,94	386,75	*
W25um193G_at	SULFOLIPID SULFOQUINOVOSYLDIAC	SULFOLIPI	45,50	45,40	45,45	0,05	215,00	192,70	203,85	11,15	4,49	4,08	4,89	158,40	*
W60um276G_at	T06D8.9 PROTEIN.	T06D8.9 PR	72,70	91,30	82,00	9,30	250,60	277,40	264,00	13,40	3,22	2,66	4,02	182,00	*
W20um050G_at	T10F20.2 PROTEIN (T10F20.1 PROTEIN)	T10F20.2 PI	92,80	103,50	98,15	5,35	253,50	247,40	250,45	3,05	2,55	2,34	2,81	152,30	*
W20um050G_x_at	T10F20.2 PROTEIN (T10F20.1 PROTEIN)	T10F20.2 PI	114,70	106,60	110,65	4,05	264,20	286,60	275,40	11,20	2,49	2,27	2,72	164,75	*
C110um021G_at	TETRACYCLINE EFFLUX PROTEIN (OX	TETRACYC	1044,50	863,60	954,05	90,45	265,00	232,80	248,90	16,10	-3,83	-3,15	-4,61	-705,15	*
W180um019G_at	THIAMINE-REPRESSIBLE ACID PHOSPH	THIAMINE-F	42,20	33,30	37,75	4,45	262,90	192,90	227,90	35,00	6,04	4,30	8,25	190,15	*
C5um105G_at	THIAZOLE BIOSYNTHETIC ENZYME, MI	THIAZOLE I	1967,70	2006,70	1987,20	19,50	6049,60	6261,90	6155,75	106,15	3,10	3,00	3,20	4168,55	*
C15um211G_at	THIOREDOXIN-LIKE PROTEIN.	THIOREDO	325,20	344,80	335,00	9,80	143,00	106,70	124,85	18,15	-2,68	-2,15	-3,54	-210,15	*
W29um167G_at	TRANSCRIPTION FACTOR SCGATA-6.	TRANSCRIF	435,70	444,00	439,85	4,15	200,40	195,90	198,15	2,25	-2,22	-2,17	-2,27	-241,70	*
C45um125G_at	TRANSPOSASE.	TRANSPOS	19,50	21,60	20,55	1,05	199,30	187,70	193,50	5,80	9,42	8,56	10,41	172,95	*
W41um050G_at	TYROSINASE (EC 1.14.18.1) (MONOPHE	TYROSINAS	33,30	19,50	26,40	6,90	168,70	159,40	164,05	4,65	6,21	4,33	10,92	137,65	*
W53um185G_at	TYROSINASE.	TYROSINAS	38,50	10,80	24,65	13,85	142,30	107,80	125,05	17,25	5,07	2,50	67,06	100,40	*
C180um013G_at	UBIQUINONE/MENAQUINONE BIOSYNT	UBIQUINON	651,70	687,60	669,65	17,95	276,70	221,40	249,05	27,65	-2,69	-2,26	-3,30	-420,60	*
C130um054G_at	UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME (EC	UBIQUITIN	149,80	173,30	161,55	11,75	355,40	390,10	372,75	17,35	2,31	2,01	2,67	211,20	*
W30um243G_at	UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE--DOLICH	UDP-N-ACE	107,80	100,10	103,95	3,85	341,90	399,60	370,75	28,85	3,57	3,07	4,09	266,80	*
C45um150G_at	UNNAMED PROTEIN PRODUCT.	UNNAMED	1027,50	1122,90	1075,20	47,70	447,20	407,40	427,30	19,90	-2,52	-2,26	-2,80	-647,90	*
W105um138G_at	UREA ACTIVE TRANSPORTER.	UREA ACTI	574,70	486,40	530,55	44,15	1446,10	1458,60	1452,35	6,25	2,74	2,41	3,17	921,80	*
W45um084G_at	UREA ACTIVE TRANSPORTER.	UREA ACTI	13,70	13,30	13,50	0,20	664,00	698,70	681,35	17,35	50,47	48,05	52,95	667,85	*
W25um211G_at	UREA ACTIVE TRANSPORTER-LIKE PR	UREA ACTI	1593,10	1528,20	1560,65	32,45	272,50	115,30	193,90	78,60	-8,05	-4,82	-24,16	-1366,75	*
C115um163G_at	URICASE (EC 1.7.3.3).	URICASE (E	1448,00	1396,60	1422,30	25,70	522,60	404,70	463,65	58,95	-3,07	-2,53	-3,89	-958,65	*
W30um169G_at	WAX SYNTHASE-LIKE PROTEIN.	WAX SYNTI	59,20	69,30	64,25	5,05	231,00	244,40	237,70	6,70	3,70	3,25	4,28	173,45	*
W50um094G_at	XYLANASE/BETA-GLUCANASE PRECUF	XYLANASE	18,20	27,30	22,75	4,55	159,40	165,30	162,35	2,95	7,14	5,36	10,64	139,60	*
UG12-12b17-77h4_I	XYNA_ASPAK ENDO-1,4-BETA-XYLANA	XYNA_ASP.	158,90	193,70	176,30	17,40	1241,80	945,10	1093,45	148,35	6,20	4,63	8,11	917,15	*

W105um186G_at	ZINC-FINGER PROTEIN ZPR1.	ZINC-FINGI	328,20	360,90	344,55	16,35	804,30	962,20	883,25	78,95	2,56	2,15	3,01	538,70 *
C95um165G_at	ZN-DEPENDENT HYDROLASES.	ZN-DEPENI	44,10	40,30	42,20	1,90	150,70	188,70	169,70	19,00	4,02	3,24	4,84	127,50 *
UM_26Src-3_s_at			1363,60	831,10	1097,35	266,25	104,10	79,60	91,85	12,25	-11,95	-6,94	-18,16	-1005,50 *
UM_26Src-3M_s_at			460,50	190,60	325,55	134,95	58,00	30,80	44,40	13,60	-7,33	-2,21	-17,44	-281,15 *

Koregulierte Gene der Stämme FB1Δ*rum1* und FB1Δ*hda1*

Probe set	MUMDB Accession-Nr.	MUMDB Annotation	Hefehomolog	E-value
W200um019G_at	um06433	Acu1 K, P-type ATPase	ygl167c	7,3E-207
W25um110G_at	um00577	bE1 b mating type locus, bE1 allele	/	/
C20um110G_at	um00578	bW1 b mating type locus, bW1 allele	/	/
C107um076G_at	um10657	conserved hypothetical protein	/	/
C145um145G_at	um04370	conserved hypothetical protein	ynr044w	1,2E-13
C21um189G_at	um11169	conserved hypothetical protein	/	/
C50um097G_at	um11512	conserved hypothetical protein	/	/
C55um259G_at	um10676	conserved hypothetical protein	/	/
C80um042G_at	um05704	conserved hypothetical protein	/	/
C90um031G_at	um03561	conserved hypothetical protein	ymr317w	2,8E-21
C95um165G_at	um00428	conserved hypothetical protein	ynl283c	9,2E-29
UG21-14a22-110c6_RC_at	um05422	conserved hypothetical protein	/	/
W105um031G_at	um03558	conserved hypothetical protein	/	/
W110um083G_at	um03135	conserved hypothetical protein	yjr151c	6,1E-33
W125um220G_at	um06290	conserved hypothetical protein	/	/
W20um050G_at	um01136	conserved hypothetical protein	/	/
W20um050G_x_at	um01136	conserved hypothetical protein	/	/
W20um165G_at	um00445	conserved hypothetical protein	/	/
W25um068G_s_at	um11155	conserved hypothetical protein	/	/
W25um193G_at	um00167	conserved hypothetical protein	/	/
W40um152G_at	um05276	conserved hypothetical protein	/	/
W40um185G_at	um05495	conserved hypothetical protein	ygl122c	1,7E-08
W40um198G_at	um06336	conserved hypothetical protein	/	/
W45um057G_at	um06085	conserved hypothetical protein	ycr010c	1E-29
W55um283G_at	um00309	conserved hypothetical protein	yol155c	2,5E-43
W5um229G_at	um01897	conserved hypothetical protein	/	/
W40um208G_at	um00283	conserved hypothetical protein	/	/
C105um012G_at	um02086	conserved hypothetical protein	/	/
C20um071G_at	um06370	conserved hypothetical protein	/	/
C75um091G_at	um02419	conserved hypothetical protein	/	/
W135um172G_at	um02877	conserved hypothetical protein	/	/
W30um169G_at	um02325	conserved hypothetical protein	/	/
W50um159G_at	um11886	conserved hypothetical protein	/	/
W5um163G_at	um00696	conserved hypothetical protein	ybr008c	3,1E-98
W7um163G_at	um00696	conserved hypothetical protein	ybr008c	3,1E-98
W150um021G_s_at	um10637	conserved hypothetical protein (N-terminal fragment)	/	/
W25um245G_at	um05928	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
W5um222G_at	um10981	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C105um125G_at	um05301	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C115um125G_at	um05300	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C34um125G_at	um05319	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C35um264G_at	um04035	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C40um125G_at	um05317	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C40um236G_at	um10403	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C55um125G_at	um05314	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C5um277G_at	um05296	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C67um125G_at	um05310	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
W115um150G_at	um00970	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
W120um281G_at	um02230	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
W6um060G_at	um02135	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
C120um125G_at	um05299	conserved hypothetical Ustilago-specific	/	/
W85um010G_at	um01262	DNA polymerase X - putative	ycr014c	3,4E-07
C65um198G_at	um06332	Egl1 Endoglucanase 1 precursor (egl1)	/	/
C100um125G_at	um05302	hypothetical protein	/	/
C10um245G_at	um05932	hypothetical protein	/	/
C115um211G_at	um04557	hypothetical protein	/	/
C15um137G_at	um02615	hypothetical protein	/	/
C172um153G_at	um10301	hypothetical protein	/	/
C25um036G_at	um02775	hypothetical protein	/	/
C25um179G_at	um01377	hypothetical protein	/	/
C26um006G_at	um02298	hypothetical protein	/	/
C35um179G_at	um01375	hypothetical protein	/	/
C36um020G_at	um10565	hypothetical protein	/	/
C40um084G_at	um06255	hypothetical protein	/	/
C45um006G_at	um02293	hypothetical protein	/	/
C45um195G_at	um01844	hypothetical protein	/	/
C65um257G_at	um05760	hypothetical protein	/	/
C75um024G_at	um01524	hypothetical protein	/	/
C95um078G_at	um03294	hypothetical protein	/	/
C96um125G_at	um05303	hypothetical protein	/	/
W105um126G_at	um02194	hypothetical protein	/	/
W110um094G_at	um11839	hypothetical protein	/	/
W126um140G_at	um03751	hypothetical protein	/	/
W16um206G_at	um00826	hypothetical protein	/	/
W30um283G_at	um00303	hypothetical protein	/	/
W40um179G_at	um01374	hypothetical protein	/	/
W65um146G_at	um05948	hypothetical protein	/	/
W70um213G_at	um03651	hypothetical protein	/	/
W72um035G_at	um06114	hypothetical protein	/	/
W85um125G_at	um10556	hypothetical protein	/	/
W60um103G_at	um01984	probable ADH1 - alcohol dehydrogenase I	ymr083w	5,3E-91
C85um201G_at	um00842	probable aflatoxin efflux pump AFLT	ykr105c	2,3E-265
C65um036G_at	um02766	probable aldehyde dehydrogenase	/	/
W65um120G_at	um03006	probable Aldo-keto reductase yakc [NADP+]	ypr127w	1,3E-18
C15um165G_at	um00446	probable beta-glucosidase	/	/
W105um138G_at	um02625	probable DUR3 Urea permease	yhl016c	5,4E-122
W45um084G_at	um06253	probable DUR3 Urea permease	yhl016c	5,4E-122
UG12-12b17-77h4_RC_at	um03411	probable endo-1,4-beta-xylanase	/	/

C80um152G_at	um05264	probable glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase	ylr070c	2,3E-265
C160um117G_at	um11944	probable hexokinase	yor120w	1,4E-81
C85um097G_at	um11514	probable High-affinity glucose transporter	ydr345c	1,1E-62
C135um025G_at	um04114	probable PHO8 - repressible alkaline phosphatase vacuolar	ydr481c	1,3E-82
W160um074G_at	um10881	probable ribonuclease T1	/	/
W40um102G_at	um11505	putative protein	/	/
W40um273G_at	um06266	putative protein	/	/
W45um064G_at	um00628	putative protein	/	/
W90um281G_at	um02238	putative protein	/	/
C15um117G_at	um03065	putative protein	/	/
C15um206G_at	um06497	putative protein	/	/
C230um010G_at	um01234	putative protein	/	/
C65um060G_at	um02117	putative protein	/	/
W10um091G_at	um10155	putative protein	/	/
W120um188G_at	um10692	putative protein	/	/
W130um209G_at	um00027	putative protein	/	/
W55um098G_at	um00144	putative protein	/	/
W5um156G_at	um04282	related to 3-phytase A precursor	/	/
W20um178G_at	um02026	related to 5-carboxyvanillate decarboxylase	/	/
C15um276G_at	um05995	related to Acid phosphatase precursor	ynr044w	1,2E-13
C30um217G_at	um04503	related to Alpha-N-acetylgalactosaminidase precursor	/	/
C80um280G_at	um00371	related to Archaerhodopsin 2 precursor	ybr054w	2E-36
W50um083G_at	um03148	related to ATP-binding cassette protein (ABC) transporter	yol075c	1,7E-50
C95um126G_at	um10070	related to Benzoate 4-monooxygenase	ydr402c	3,3E-10
W140um021G_s_at	um11154	related to beta-1,3-glucan binding protein	/	/
W15um068G_s_at	um03122	related to beta-1,3-glucan binding protein	/	/
C25um039G_at	um11651	related to Betaine lipid synthase	/	/
W25um117G_at	um03067	related to CDC33 - translation initiation factor eIF4E	yol139c	1,3E-31
W50um094G_at	um00891	related to cell wall protein UTR2	yel040w	2,1E-44
C20um086G_at	um06190	related to Chitinase	ydr371w	1,4E-37
C60um249G_at	um02984	related to Dibenzothiophene desulfurization enzyme C	/	/
W190um281G_at	um02215	related to dibenzothiophene desulfurizing enzyme	/	/
W191um281G_at	um02215	related to dibenzothiophene desulfurizing enzyme	/	/
W155um188G_at	um04816	related to Endoglucanase 1 precursor	/	/
W5um146G_at	um05964	related to esterase	/	/
C105um137G_at	um10281	related to extracellular aspartic proteinase	ypl154c	1,7E-112
C55um060G_at	um10055	related to gamma-glutamyltransferase	ylr299w	1,6E-50
C85um108G_at	um01165	related to Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	ybr056w	6,1E-33
C135um119G_at	um01718	related to glucosamine-6-phosphate deaminase	/	/
C160um119G_at	um01711	related to Glucose dehydrogenase [acceptor] precursor	/	/
W175um086G_at	um06158	related to glutaminase A	yjr151c	6,1E-33
W40um197G_at	um10781	related to glutathione s-transferase	ynl229c	2,9E-14
W75um008G_at	um04353	related to glycosyl transferase, group 2 family protein	yjr151c	6,1E-33
W35um023G_at	um02943	related to guanine deaminase	/	/
W135um083G_at	umd106-80	related to heat shock protein 80	ymr186w	1,7E-242
C20um097G_at	um03881	related to Heat shock protein Hsp20	/	/
W70um170G_at	um11562	related to Hydrophobin	/	/
C20um183G_at	um05548	related to L-ascorbate oxidase precursor	yfl041w	5,1E-94
W20um166G_at	um00411	related to metalloprotease MEP1	/	/
C80um107G_at	um01051	related to mfs-multidrug-resistance transporter	yll028w	1,6E-80
C45um083G_at	um03149	related to molybdenum cofactor sulfurase	/	/
W55um097G_at	um03888	related to multidrug resistant protein	ybr043c	8,3E-26
W45um025G_at	um04133	related to NAD(P)H-dependent oxidoreductase	ymr226c	1,6E-59
C59um169G_at	um02319	related to NUP57 nuclear pore protein	/	/
W25um026G_at	um02387	related to oligopeptide transporter	yjl212c	1,9E-130
UG14-20g22-75d12_RC_at	um04106	related to O-methyltransferase B	/	/
UG14-20g22-75d12_RC_x_at	um04106	related to O-methyltransferase B	/	/
W10um264G_at	um11057	related to OPT1 - High-affinity glutathione transporter	yjl212c	1,9E-130
W50um018G_at	um01204	related to PRY1 - strong similarity to the plant PR-1 class of pathogen related proteins	yjl079c	1,5E-32
W95um166G_at	um00395	related to Rds1 protein	/	/
C145um120G_at	um03023	related to Ribonuclease Trv	ypl123c	9,4E-39
W125um040G_at	um00723	related to stress response protein rds1p	ycr089w	3,1E-11
C150um120G_at	um03024	related to subtilisin-like serine protease	/	/
W180um019G_at	um06428	related to Thiamine-repressible acid phosphatase precursor	ybr092c	1,9E-24
CLUSTER21_RC_at	um03398	related to transesterase	/	/
C45um125G_at	um05316	related to transposase, pseudogene	/	/
C30um080G_at	um03246	related to versicolorin b synthase	/	/
CLUSTER10_RC_at	um11112	related to Versicolorin B synthase	/	/
W89um138G_at	um02629	related to YRO2 - putative plasma membrane protein, transcriptionally regulated by Haa1p	ybr054w	2E-36
W85um021G_at	um03110	related to ZRT2 Zinc transporter II	ylr130c	1,2E-63
W120um002G_at	um03924	Rep1 repellent protein 1 precursor	/	/