

Analyse des Kreuzungstyp-Locus des filamentösen Ascomyceten *Sordaria macrospora*

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
"Doctor rerum naturalium"
der Georg-August-Universität
Göttingen

vorgelegt von

Volker Klix

aus Essen

Göttingen 2010

Mitglieder des Betreuungsausschusses:

Prof. Dr. Stefanie Pöggeler

Prof. Dr. Gerhard Braus

Referentin: Prof. Dr. Stefanie Pöggeler

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Braus

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2010

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Stefanie Pöggeler für ihre exzellente Betreuung dieser Doktorarbeit, für die aktuelle und interessante Themenstellung und ihr aufrichtiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Nicht zuletzt möchte ich mich für ihre zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und der Bereitstellung von Laborplatz und Arbeitsmitteln bedanken.

Ein großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Gerhard Braus für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Am Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik in Bochum möchte ich mich bei Frau Swenja Elbel für ihre Hilfe und Anleitung bei der RNA-Präparation für die Microarray Experimente bedanken. Frau Dr. Minou Nowrousian war eine unschätzbare Hilfe bei der Auswertung eben jener Experimente. Herrn Jay C. Dunlap und Frau Jennifer J. Loros (Dartmouth Medical School, NH, USA) möchte ich für die Bereitstellung der Microarray Chips danken und Frau Carol Ringelberg für die Durchführung der Screens.

Ein Dankeschön gilt allen wissenschaftlichen, technischen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Genetik eukaryotischer Mikroorganismen für das gute Arbeitsklima. Ganz besonders möchte ich mich hiermit bei Herrn Oliver Voigt und Herrn Ronny Lehneck für die Durchsicht dieser Arbeit und ihre hilfreichen Kommentaren bedanken. Frau Sabine Riedel gebührt mein Dank für ihre Hilfe bei den Yeast-Two-Hybrid Analysen.

Mein ganzer Dank gilt meiner Familie für die außergewöhnliche Unterstützung auch in schwierigen Zeiten. Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, meiner Großmutter und Frau Madeleine Hübenthal ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Leider reicht der Platz hier nicht aus um allen Menschen zu danken, die mit Rat, Tat und Unterstützung zu dieser Arbeit beigetragen haben. Allen nicht Namentlich erwähnten sage ich hiermit: **Danke**.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung.....	5
1.1.	Einleitung	5
1.2.	Zygomyceten: <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	8
1.3.	Ascomyceten	9
1.3.1.	Unizelluläre Ascomyceten: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.3.2.	Filamentöse heterothallische Ascomyceten: <i>Neurospora crassa</i>	14
1.3.3.	Filamentöse Ascomyceten: <i>Sordaria macrospora</i>	17
1.3.4.	Filamentöse Ascomyceten: <i>Penicillium chrysogenum</i>	18
1.4.	Zusammenfassung	20
2.	Problemstellung.....	22
2.1.	<i>Sordaria macrospora</i>	22
2.2.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	23
3.	Material und Methoden	25
3.1.	Material	25
3.1.1.	Verwendete Organismen	25
3.1.2.	Plasmide	27
3.1.3.	Oligonukleotide.....	28
3.1.4.	Chemikalien	30
3.1.5.	Kits	31
3.1.6.	Enzyme.....	31
3.1.7.	Nährmedien	32
3.1.8.	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	33
3.2.	Methoden.....	33
3.2.1.	Kulturbedingungen.....	33
	Kreuzungsexperimente.....	33
3.2.2.	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	34
3.2.3.	Präparation von Nukleinsäuren	35
	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	35
	Isolierung von Gesamt-Nukleinsäuren aus <i>S. macrospora</i>	35
	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	35
	Fällung von Nukleinsäuren	35
	Mikrodialyse wässriger DNA-Lösungen	36
	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. macrospora</i>	36
3.2.4.	Modifizierung von Nukleinsäuren	36
	Polymerasekettenreaktion	36
	Reverse Transkription	36
	real-Time-PCR	36
	Hydrolyse von Nukleinsäuren.....	37
	Dephosphorylierung	37
	Ligation	37
	Starteroligonukleotidsynthese	37
	Sequenzierung	37
3.2.5.	Erstellung rekombinanter Plasmide mittels homologer Rekombination.....	38
3.2.6.	Gelelektrophorese.....	38

	DNA	38
	RNA	38
3.2.7.	Blotverfahren und nicht-radioaktiver Nachweis von Nukleinsäuren.....	38
	Herstellung nicht-radioaktiv markierter Nukleinsäuren.....	38
	Southern Hybridisierung	38
3.2.8.	Microarray Hybridisierung.....	39
3.2.9.	Hefe-Zwei-Hybrid Analyse.....	39
3.2.10.	Mikroskopie	39
3.2.11.	Bilder.....	40
3.2.12.	Analyse von Pheromon-Rezeptor-Interaktionen.....	40
3.2.13.	Sicherheitsmaßnahmen.....	40
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Untersuchung der <i>MAT1-1</i> -Kreuzungstyp-Gene in <i>S. macrospora</i>	41
4.1.1.	Herstellung der <i>MAT1-1</i> Deletionsmutanten.....	41
4.1.2.	Phänotypische Untersuchung der Deletionsmutanten.....	44
4.1.3.	Untersuchung der funktionellen Domäne des <i>MAT1-1-2</i> Gens mittels Komplementationsanalyse	47
4.1.4.	Transkriptionelle Expression der Pheromon- und Rezeptor-Gene	50
4.1.5.	Microarray Analyse von Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2	52
4.1.6.	Lokalisation der Kreuzungstyp-Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	57
4.1.7.	Interaktionspartner des Kreuzungstyp-Proteins SMTA-2.....	59
4.2.	Analyse der Pheromone und Rezeptoren aus <i>P. chrysogenum</i>	66
5.	Diskussion	70
5.1.	Ein HMG-Domänen Protein und ein PPF-Domänen Protein sind die Hauptregulatoren der sexuellen Entwicklung in <i>S. macrospora</i>	70
5.2.	SMTA-2 besitzt mindestens eine funktionelle Domäne im C-Terminus, unabhängig von der PPF-Domäne	73
5.3.	Die Proteine MAT1-1-2 und MAT1-1-3 lokalisieren im Cytosol	74
5.4.	Die Proteine SMTA-1 und SMTA-2 sind an der Regulation der Expression von Pheromon-Genen beteiligt.....	75
5.5.	Die Kreuzungstyp-Proteine SMTA-1 und SMTA-2 regulieren die Expression verschiedener Gene	78
5.6.	SMTA-2 interagiert mit verschiedenen regulatorischen Proteinen.....	82
5.7.	Zusammenfassung der Untersuchung der <i>MAT1-1</i> spezifischen Gene aus <i>S. macrospora</i>	89
5.7.1.	Das α -Domänen Protein SMTA-1 ist nicht essentiell für die sexuelle Entwicklung in <i>S. macrospora</i>	89
5.7.2.	Das Protein SMTA-3 zeigt keine Funktion in <i>S. macrospora</i>	90
5.7.3.	Das PPF-Domänen Protein SMTA-2 ist essentiell für die postmeiotische Entwicklung in <i>S. macrospora</i>	90
5.8.	Der asexuelle Ascomycet <i>P. chrysogenum</i> besitzt funktionelle Pheromone und Rezeptoren.....	93
6.	Literaturverzeichnis.....	95
7.	Anhang	113
7.1.	Überprüfung der Integration der Komplementationskonstrukte	113
7.2.	Überprüfung der Integration der Fluoreszenzkonstrukte	114
7.3.	<i>Curriculum vitae</i> V.Klix	115

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Einzelsporisolat
h	Stunde
kb	Kilobasen
<i>N.c.</i>	<i>Neurospora crassa</i>
min	Minuten
ORF	offener Leserahmen
<i>P.c.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>P.a.</i>	<i>Podospora anserina</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.m.</i>	<i>Sordaria macrospora</i>
Tab.	Tabelle
ü.N.	über Nacht
Wt	Wildtyp

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen sowie übliche Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

1. Einführung

1.1. Einleitung

Die sexuelle Reproduktion stellt einen der zentralen Prozesse innerhalb des Lebenszyklus der meisten Eukaryoten dar. Dieser Prozess dient der Aufrechterhaltung der genetischen Varianz innerhalb einer Spezies und ist stark reguliert. Es existieren Mechanismen zur Erkennung kompatibler Partner, der richtigen Umweltbedingungen und auch der Prozess des eigentlichen Austausches von genetischem Material zwischen Individuen, Zellen, Zellkernen und Chromosomen unterliegt einer komplexen Regulationsmaschinerie. Zusätzlich haben sich in vielen Organismen im Laufe der Evolution Barrieren entwickelt, welche eine Selbstung und damit einen Austausch von genetischem Material zwischen Kernen eines Individuums ausschließen.

In niederen Eukaryoten, wie Pilzen, existieren meist simple Zell-Identitäts-Mechanismen, welche den sexuellen Austausch regulieren (Souza, *et al.*, 2003). Grundsätzlich können Pilze dabei in homothallisch, selbst-fertil, und heterothallisch, selbst-steril, unterteilt werden (Lin und Heitman, 2007). Morphologische Unterscheidungen wie in höheren Eukaryoten sind dabei selten. Die physiologische Unterscheidung in verschiedene Kreuzungstypen beruht hier genetisch auf einer Kreuzungstyp-spezifischen Region innerhalb des Genoms, Kreuzungstyp-Locus („mating type locus“, „MAT-Locus“) genannt (Casselton L.A., 2008). Die genetische Sequenz innerhalb der beiden MAT-Loci ist dabei so polymorph, dass der Begriff „Idiomorph“ anstatt „Allel“ eingeführt wurde (Metzenberg und Glass, 1990). Eine einheitliche Nomenklatur der Kreuzungstyp-Loci und -Gene wurde eingeführt (Turgeon und Yoder, 2000) auf der Grundlage, dass ein Idiomorph aller bisher untersuchten heterothallischen Ascomyceten immer ein Gen enthält, welches für ein Protein mit einer $\alpha 1$ -Domäne kodiert, bekannt aus dem $\alpha 1p$ Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Astell, *et al.*, 1981). Dieser Idiomorph wird als *Mat1-1* bezeichnet. Der andere Idiomorph, bezeichnet als *Mat1-2*, ist charakterisiert durch einen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF) welcher für ein Protein mit einer „high-mobility-group“-Domäne (HMG-Domäne) (Grosschedl, *et al.*, 1994) kodiert.

Für einige Spezies, als Beispiele die Ascomyceten *S. cerevisiae*, *Neurospora crassa* oder *Podospora anserina*, werden immer noch die ursprünglichen Bezeichnungen der Kreuzungstypen und der entsprechenden Gene verwendet. In diesen Organismen wurden die MAT-Loci vor der Entwicklung

Einführung

der Standardnomenklatur untersucht. So wird der *MAT1-1* Locus jeweils als *MAT α* , *MAT A* oder *MAT(-)*, der *MAT1-2* Locus als *MAT α* , *MAT a* oder *MAT(+)* bezeichnet (Pöggeler, 2001).

Homothallische Pilze besitzen häufig ebenfalls Kreuzungstyp-Loci, wobei diese im Gegensatz zu heterothallischen Arten genetisch nicht unterscheidbar sind (Glass N.L., *et al.*, 1990b). Meist existieren Homologe zu den *MAT*-Genen eines oder beider Kreuzungstypen verwandter, heterothallischer Arten (Abb. 1).

Eine Besonderheit der Gruppe der *Sordariomyceten* ist das Gen *MAT1-1-2*. Dieses kodiert für ein Protein ohne bekannte funktionelle Domäne. Es konnte jedoch ein in allen *Sordariomyceten* konserviertes Sequenzmotiv, bestehend aus den drei invariablen Aminosäuren Prolin, Prolin und Phenylalanin, gefunden werden. Dieses Sequenzmotiv wurde nach den drei Aminosäuren als PPF-Domäne benannt (Debuchy, *et al.*, 2010).

Ursprünglich wurde die konservierte Domäne in *MAT1-1-2* Proteinen als HPG-Domäne, nach den Aminosäuren Histidin, Prolin und Glycin bezeichnet (Debuchy und Turgeon, 2006). Bei einer Untersuchung von Vertretern der Gattung *Diaporthe* wurde dieses Sequenzmotiv dagegen nicht gefunden (Kanematsu, *et al.*, 2007). Stattdessen konnten zwei Proline und ein Phenylalanin als invariabel identifiziert werden. Daraufhin wurde die Domäne in PPF-Domäne umbenannt (Debuchy, *et al.*, 2010).

PPF-Domänen Proteine wurden in allen untersuchten *MAT1-1* Kreuzungstyp-Loci der *Sordariomyceten* gefunden, in homothallischen wie heterothallischen. Außerhalb dieses Taxons sind PPF-Domänen Proteine unbekannt (Turgeon und Debuchy, 2007).

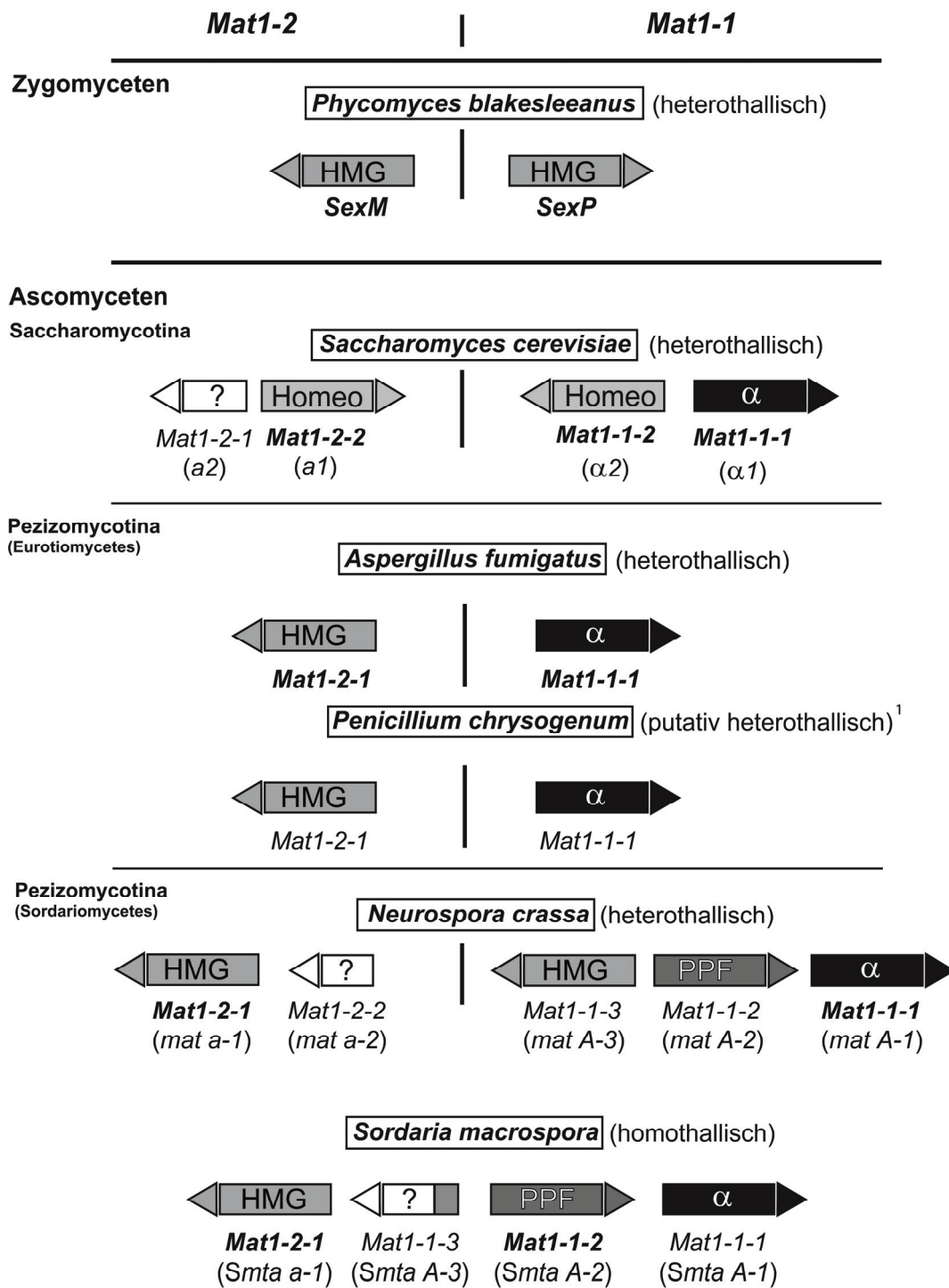


Abbildung 1: Schematischer Vergleich der Kreuzungstyp-Loci verschiedener homo- und heterothallicher Pilze. Die Boxen repräsentieren die Größe und Position der ORFs, die Pfeilspitzen zeigen die Leserichtung an. Die Standardnomenklatur der Gene, ebenso wie Spezies-spezifische Namen sind angegeben. Gene, welche für Proteine mit gleichen funktionellen Domänen kodieren, sind durch gleiche farbliche Kennzeichnung hervorgehoben. α : α -Domäne; HMG: HMG-Domäne; PPF: PPF-Domäne; ?: keine bekannten Domänen. Gene, welche für die sexuelle Entwicklung in den Spezies essentiell sind, sind hervorgehoben. ¹ Kreuzungstyp-Gene in *P. chrysogenum* wurden identifiziert, ein sexueller Zyklus konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

Einführung

Im Gegensatz zu homothallischen Arten, die keinen Kreuzungspartner für die Vollendung des sexuellen Zyklus benötigen, sind heterothallische Arten darauf angewiesen einen Kreuzungspartner zu finden. In vielen Spezies aus dem Reich der Pilze wird die Partner-Erkennung und die anschließende Zellfusion durch sogenannte Pheromone vermittelt.

In Zygomyceten dient ein einfaches Molekül, die Trisporensäure, als Pheromon und vermittelt die Fusion zweier Kreuzungspartner unterschiedlichen Kreuzungstyps (Schimek und Wostemeyer, 2009; van den Ende, 1967).

Die höher entwickelten Ascomyceten besitzen zwei verschiedene lösliche Peptid-Pheromone und korrespondierende G-Protein (GTP-bindendes Protein) gekoppelte Rezeptoren (Bistis, 1981; Bölker und Kahmann, 1993; Dohlman und Thorner, 2001). Die Expression der Pheromon-Gene ist dabei Kreuzungstyp-spezifisch und abhängig von den Transkriptionsfaktoren, die im Kreuzungstyp-Locus kodiert sind, wobei sie selber nicht Teil des *MAT*-Locus sind (Shen W. C., *et al.*, 1999; Zhang, *et al.*, 1998). Die Rezeptoren scheinen dagegen Kreuzungstyp-unabhängig kodiert zu sein. Im Gegensatz zu den Ascomyceten liegen bei den Basidiomyceten häufig die Pheromon-Gene innerhalb des Kreuzungstyp-Idiomorph (Raudaskoski und Kothe, 2010).

Innerhalb der heterothallischen Ascomyceten ist die Struktur und Sequenz der Pheromone und der korrespondierenden Rezeptoren hoch konserviert (Bobrowicz, *et al.*, 2002; Coppin, *et al.*, 2005; Kim H., *et al.*, 2002; Kurjan, 1993; Shen W. C., *et al.*, 1999). Auch in homothallischen Arten wurden Pheromone und Rezeptoren gefunden, auch wenn dort die Notwendigkeit der Partnererkennung nicht gegeben ist. So wurden in den homothallischen Arten *Sordaria macrospora* (Pöggeler, 2000) und *Gibberella zeae* Pheromon- und Rezeptor-Gene identifiziert und untersucht. In *S. macrospora* sind diese essentiell für die sexuelle Entwicklung (Mayrhofer und Pöggeler, 2005; Mayrhofer, *et al.*, 2006), während sie in *G. zeae* an der sexuellen Entwicklung beteiligt, für diese aber nicht essentiell sind (Lee J., *et al.*, 2008). Das am Besten untersuchte Pheromon-Rezeptor-System ist das der Hefe *S. cerevisiae*, welches als Modellsystem aller anderen heterothallischen Ascomyceten dienen kann.

1.2. Zygomyceten: *Phycomyces blakesleeanus*

Zygomyceten (Jochpilze) stellen eine frühe evolutionäre Linie innerhalb der Abteilung der Eumycota dar (Esser, 2000). In dieser Gruppe wurde auch zum ersten Mal das Phänomen des Homo- und Heterothallismus von Blakeslee beschrieben (Blakeslee, 1904). Der Pilz

Phycomyces blakesleeanus, als Beispiel, existiert in zwei verschiedenen Kreuzungstypen, genannt *MAT(-)* und *MAT(+)*. Durch die Verfügbarkeit der Genomsequenz von *P. blakesleeanus* wurde eine Untersuchung der Kreuzungstypen auf genetischer Ebene möglich (Idnurm, *et al.*, 2008). Sequenzanalysen zeigten Bereiche des Genoms, die zwischen Individuen unterschiedlichen Kreuzungstyps polymorph und gekoppelt zu einem speziellen Kreuzungstyp waren. Der *MAT(+)*-Locus ist 5,8 kb groß und enthält einen ORF, welcher für ein HMG-Domänen Protein kodiert. Der *MAT(-)*-Locus ist mit 3,4 kb kleiner, enthält aber ebenfalls ein Gen für ein HMG-Domänen Protein (Grosschedl, *et al.*, 1994; Idnurm, *et al.*, 2008) (Abb. 1). Die beiden Gene wurden als *sexM* (*sexMinus*) und *sexP* (*sexPlus*) bezeichnet. Die Kreuzungstyp-Proteine SexM und SexP zeigen nur eine geringe Aminosäure-Ähnlichkeit, trotzdem sind SexM und SexP die ähnlichsten Proteine zueinander im Genom von *P. blakesleeanus* (Idnurm, *et al.*, 2008). Dies lässt darauf schließen, dass SexM und SexP divergente Homologe darstellen.

All diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ein HMG-Domänen kodierendes Gen den ursprüngliche Zustand des *MAT*-Locus in einem gemeinsamen Vorfahren der Pilze darstellt. Die niederen Zygomyceten repräsentieren damit den ursprünglichen genetischen Zustand, während die höher entwickelten Ascomyceten und Basidiomyceten im Laufe der Evolution weitere Kreuzungstyp-Gene, wie α -Domänen oder Homeodomänen Gene erlangten (Casselton L.A., 2008; Dyer, 2008; Idnurm, *et al.*, 2008).

1.3. Ascomyceten

Ascomyceten gehören zur Gruppe der Pilze (Mycophyta) und bilden die größte Klasse innerhalb dieser Gruppe. Es kommen sowohl einzellige Organismen, wie die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, als auch mehrzellige Organismen mit oftmals verzweigten und septierten Myzelien, wie der Hyphenpilz *Neurospora crassa*, in dieser Klasse vor. Die haploiden Hyphenpilze bilden nach der Paarung dikaryotische Hyphen, in denen Karyogamie und Meiose stattfinden. Aus diesen Hyphen entstehen dann typische Meiosporangien, die Asci, die dieser Klasse ihren Namen gegeben haben (Esser, 2000).

In allen bisher untersuchten, heterothallischen Ascomyceten, besteht der *MAT*-Locus eines Individuums aus einer oder zwei möglichen Sequenzen. Dieses Paarungssystem, mit zwei Kreuzungstypen determiniert durch zwei *MAT*-Idiomorphe, wird als „bipolar“ bezeichnet (Hsueh und Heitman, 2008).

Die meisten homothallischen Arten dagegen besitzen die Sequenzen beider Kreuzungstyp-Idiomorphe in ihrem haploiden Genom, häufig genetisch gekoppelt (Abb. 1). Ein Beispiel für einen homothallischen Ascomyceten mit zwei ungekoppelten *MAT*-Loci in einem Genom ist *Aspergillus nidulans*. Hier liegen die beiden *MAT*-Loci ungekoppelt auf verschiedenen Chromosomen (Galagan, *et al.*, 2005).

Die Kreuzungstyp-Loci der Ascomyceten folgen alle einem ähnlichen Organisationsmuster (Debuchy und Turgeon, 2006; Pöggeler, 2001). Der Standardnomenklatur folgend, besitzt das Protein MAT1-1-1 eine sogenannte α 1-Domäne, welche Ähnlichkeiten mit dem α 1p DNA-Bindeprotein aus *S. cerevisiae* aufweist (Astell, *et al.*, 1981; Turgeon und Yoder, 2000).

Das MAT1-2-1 Protein dagegen weist eine HMG-Domäne auf, welche ebenfalls eine DNA-Bindedomäne darstellt. In den meisten bisher untersuchten, heterothallischen Ascomyceten sind diese beiden Proteine die Hauptregulatoren der sexuellen Entwicklung in Individuen des entsprechenden Kreuzungstyps (Debuchy und Turgeon, 2006; Pöggeler, 2001; Souza, *et al.*, 2003).

Eine Ausnahme dieser Regel stellen die unizellulären Hefen dar. Im Gegensatz zu den filamentösen Ascomyceten werden bei vielen Hefen wie *S. cerevisiae* oder *Candida albicans* keine HMG-Domänen Proteine im *MAT*-Locus kodiert. Statt dessen finden sich hier sogenannte Homeodomänen Proteine (Astell, *et al.*, 1981; Hull und Johnson, 1999).

Zusätzlich können noch weitere Gene in den *MAT*-Loci vorhanden sein. Ein Beispiel hierfür ist das Gen *MATI-1-2*, welches bisher in allen untersuchten *MATI-1* Loci in der Gruppe der *Sordariomyceten* gefunden wurde (Debuchy und Turgeon, 2006).

1.3.1. Unizelluläre Ascomyceten: *Saccharomyces cerevisiae*

Die einzellige Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört taxonomisch zu den Endomycetales aus der Gruppe der Hemiascomyceten (Esser, 2000). Unter natürlichen Bedingungen ist *S. cerevisiae* homothallisch und diploid, wobei unter Laborbedingungen auch haploide Stämme vermehrt werden können. Die Vermehrung findet unter günstigen Wachstumsbedingungen fortlaufend durch vegetative Knospung statt, ungünstige Wachstumsbedingungen dagegen führen zur Meiose und zur Sporulation, bei der vier haploide Ascosporen entstehen (Esser, 2000). Der Lebenszyklus von *S. cerevisiae* ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

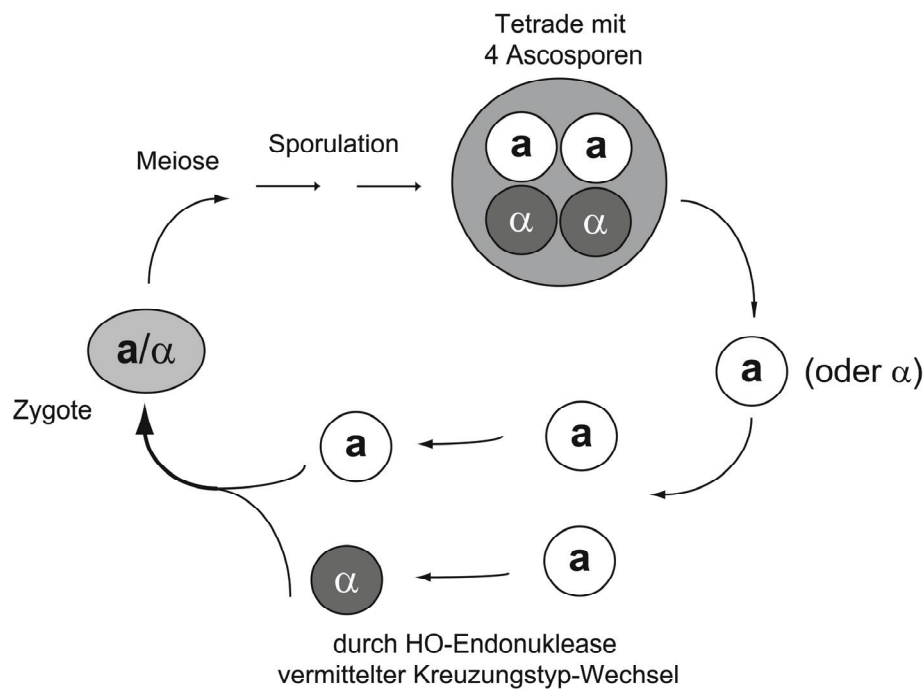


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *S. cerevisiae*. Aus einer diploiden Zygote entstehen nach Meiose und Sporulation vier Ascosporen, je zwei vom Kreuzungstyp a bzw. α. Zwei haploide Zellen unterschiedlichen Kreuzungstyps bilden nach Karyogamie erneut eine diploide Zygote. Innerhalb einer haploiden Zelle kann es zu einem Kreuzungstypwechsel kommen. Weitere Details werden im Text erläutert (verändert nach Esser 2000).

Der Kreuzungstyp-Locus und die sexuelle Vermehrung sind von allen Ascomyceten in der Hefe am Besten untersucht. Die *MAT* Idiomorphe *MATa* und *MATα* kodieren für regulatorische Proteine, welche, zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren, für ein spezifisches Expressionsmuster in allen drei Zelltypen verantwortlich sind: haploide *MATa* oder *MATα* Zellen oder diploide *MATa/α* Zellen (Herskowitz, 1989). Der *MATα* Locus besteht dabei aus zwei Genen, *α1* und *α2* (Astell, *et al.*, 1981) (Abb. 1). Das *α1* Gen kodiert für ein Protein mit einer charakteristischen DNA-Bindedomäne, welche nach diesem Protein als α-Domäne benannt wurde. Das Protein α1p ist ein positiver Regulator der Transkription α-spezifischer Gene in haploiden, *MATα* Zellen. Zusammen mit den Transkriptionsfaktoren STE12 und MCM1 reguliert α1p die Transkription von fünf α-spezifischen Genen (Galgoczy, *et al.*, 2004).

MCM1 ist ein essentielles, sequenz-spezifisches DNA-Bindeprotein und gehört zur Gruppe der MADS Box Transkriptionsfaktoren. MADS Box Transkriptionsfaktoren sind hochkonserviert und spielen eine Rolle bei der Regulation wichtiger biologischer Prozesse in vielen eukaryotischen Organismen von Hefen, Pflanzen über niedere Vertebraten bis zu Säugetieren (Shore und Sharrocks, 1995).

Einführung

STE12 wird als divergentes Protein der Homeodomänen-Superfamilie angesehen und besitzt eine sequenzspezifische DNA-Bindedomäne. Die entsprechende Sequenz wird auch als „Pheromon-Signalantwort“ Sequenz bezeichnet (Dolan und Fields, 1991). Dies zeigt, dass der Homeodomänen Transkriptionsfaktor STE12 einen Regulator von Genen nach Pheromon-Induktion in *S. cerevisiae* darstellt (Johnson, 1995).

Das Genprodukt von $\alpha 2$ ist dagegen ein negativer Regulator der Transkription **a**-spezifischer Gene. Acht Gene werden spezifisch von einem $\alpha 2$ p-MCM1 Dimer reguliert, wovon sechs als **a**-spezifisch bekannt sind (Galgoczy, *et al.*, 2004). Der *MATa* Locus besteht aus zwei Genen, *a1* und *a2*, wovon nur *a1* für ein funktionelles Protein kodiert (Abb. 1). Das Protein **a1p** besitzt eine Homeodomäne, spielt aber keine Rolle bei der Regulation **a**-spezifischer Gene. Diese Gene sind in *MATa* Zellen ohne den Einfluss des $\alpha 2$ p Regulators konstitutiv exprimiert. In diploiden *MATa*/ α dagegen bildet **a1p** ein Heterodimer mit $\alpha 2$ p. Dieses Heterodimer reprimiert die Expression von 23 haploid-spezifischen Genen (Galgoczy, *et al.*, 2004). Das Gen *a2* kodiert für eine nicht-funktionelle Version von $\alpha 2$ (Dolan und Fields, 1991; Herskowitz, 1989).

Eine Besonderheit bei *S. cerevisiae* stellt die Fähigkeit dar, den Kreuzungstyp zu wechseln. Beide Kreuzungstyp-Allele sind als sogenannte Kassetten im Genom vorhanden, wobei der Kreuzungstyp durch die Information der Kasette im *MAT*-Locus bestimmt wird. Die Information beider Kreuzungstypen ist dabei in nicht transkribierten Loci im Genom vorhanden, in *HML α* für den α Kreuzungstyp und *HMRa* für den **a** Kreuzungstyp (Herskowitz, 1988; Nasmyth, 1982). Durch die Aktivität einer spezifischen Endonuklease, der HO-Endonuklease, wird durch Hydrolyse an einer degenerierten, 29 bp langen Sequenz am *MAT*-Locus ein Doppelstrangchnitt eingeführt (Nasmyth, 1982). Durch ein homologes Rekombinationsereignis mit den Kassetten *HML* bzw. *HMR* kommt es zur Genkonversion und damit zu einem Wechsel des Kreuzungstyps (Strathern, *et al.*, 1982). Aus diesem Grund stellt *S. cerevisiae*, trotz Inkompatibilität von Zellen gleichen Kreuzungstyps, einen homothallischen Pilz dar.

Das Pheromon-System in Hefe ist das wohl am Besten untersuchte in allen Ascomyceten (Bölker und Kahmann, 1993). Zellen vom *MATa* Kreuzungstyp produzieren ein Peptid von zwölf Aminosäuren, welches durch Prozessierung aus einem längeren Vorläufermolekül entsteht. Dieses Vorläufermolekül enthält ein sogenanntes CAAX-Motiv im C-Terminus, ein

Einführung

Signal für Carboxymethylierung und Farnesylierung (Anderegg, *et al.*, 1988; Chen P., *et al.*, 1997). Das prozessierte Peptid wird unabhängig vom klassischen Sekretionsweg in Hefe über einen ATP-bindenden Transporter (Ste6p) sekretiert, welcher Homologien zu Membran Glykoproteinen aus Säugetieren zeigt (Kuchler, *et al.*, 1989).

Der α -Faktor, welcher von *MAT α* Zellen hergestellt wird, dagegen ist ein 13 Aminosäurenpeptid (Stötzler, *et al.*, 1976), welches ebenfalls aus Vorläuferproteinen hergestellt wird. Diese Vorläuferpeptide (MF α 1 und MF α 2) bestehen aus 165 bzw. 120 Aminosäuren, welche tandemartig wiederholte Kopien des α -Faktors enthalten (Singh, *et al.*, 1983). Das fertig prozessierte Protein wird über den klassischen Hefe-Sekretionsweg sezerniert. Die Gene beider Pheromonvorläufer Peptide liegen dabei in einem Genom, wobei die Expression der Gene durch die Kreuzungstyp-Proteine reguliert werden.

Die Erkennung der Pheromone durch Zellen des entgegengesetzten Kreuzungstyps geschieht über spezifische Pheromon-Rezeptoren. Beide Rezeptoren (Ste2p, Ste3p) gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Siebentransmembran Domänen Proteine. Ste2p bindet dabei den α -Faktor und wird von *MAT α* Zellen hergestellt. Ste3p kommt in *MAT α* Zellen vor und bindet spezifisch den **a**-Faktor. Die Rezeptoren aktivieren einen G-Protein Komplex, bestehend aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Die beiden Untereinheiten β und γ bilden dabei ein Dimer (Dohlman und Thorner, 2001). Nach Aktivierung dissoziieren die α und $\beta\gamma$ Untereinheit und das Signal wird durch verschiedene Effektor-Moleküle übertragen und verstärkt. Ein Hauptziel des von der G $\beta\gamma$ -Untereinheit übertragenen Signals ist dabei eine MAP („mitogen activated protein“) Kinase Kaskade. Dieser Signalweg ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

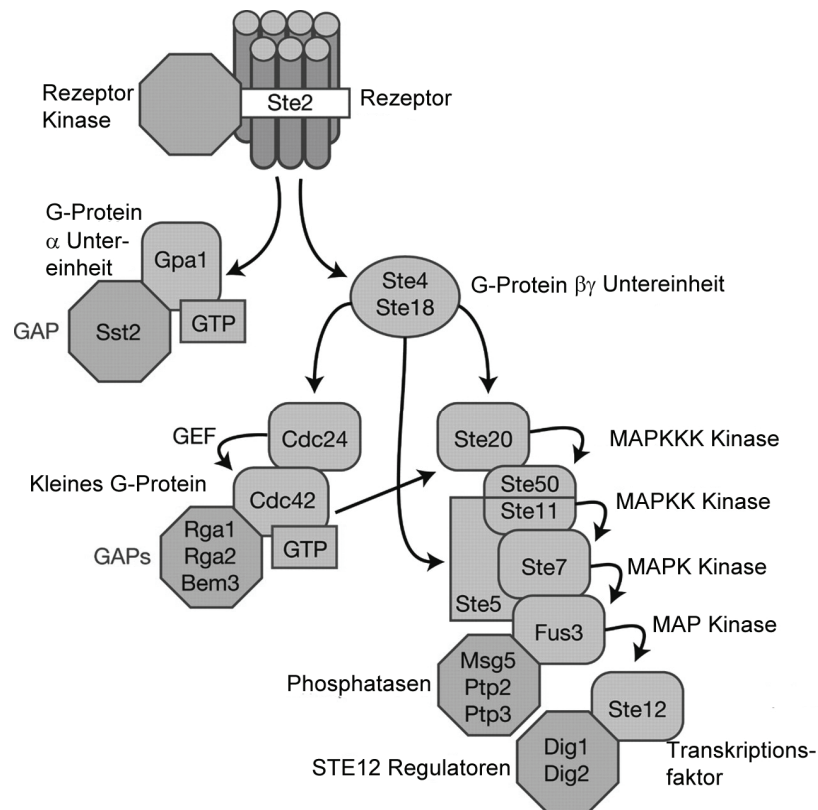


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Pheromon-induzierten MAP Kinase Signalweges in *S. cerevisiae*. Nach der Induktion eines Siebentransmembran-Rezeptors durch das entsprechende Pheromon wird das Signal durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins weitergeleitet. Über die MAP Kinase Kaskade gelangt das Phosphorylierungssignal schließlich zum Transkriptionsfaktor STE12, welcher in der Lage ist, Zielgene zu aktivieren (verändert nach Wang und Dohlman, 2004). GAP: GTPase-aktivierendes Protein; GEF: GTP-Austauschfaktor („GTP-exchange factor“); K: Kinase

Das Signal wird dabei durch die Phosphorylierung verschiedener MAP Kinasen weitergeleitet. Die letzte MAP Kinase dieses Signalweges (Fus3p) aktiviert dabei den Transkriptionsfaktor Ste12p, welcher wiederum an der Regulation Kreuzungs-spezifischer Gene beteiligt ist (Casselton L. A., 2002).

Dieses System kann als Modell für die Pheromon-Rezeptor-Systeme aller bisher untersuchten Ascomyceten dienen.

1.3.2. Filamentöse heterothallische Ascomyceten: *Neurospora crassa*

Neurospora crassa ist ein vielzelliger Ascomycet aus der Gruppe der Pyrenomyceten (Esser, 2000; Hawksworth, *et al.*, 1995). Dieser Pilz ist haploid und in der Lage, sich sowohl über vegetative Mitosporen als auch über sexuelle Sporenbildung zu verbreiten. Männliche und weibliche Geschlechtsorgane werden an einem Myzel gebildet, wobei diese nicht in der Lage sind sich gegenseitig zu befruchten. *N. crassa* ist also heterothallisch (Esser, 2000). Der

Einführung

sexuelle Zyklus beginnt unter Stickstoffmangel mit der Bildung eines Vorfruchtkörpers, dem Protoperithezium (Nelson und Metzenberg, 1992; Perkins und Barry, 1977). Die Befruchtung der Ascogonzelle mit einer männlichen Zelle innerhalb des Protoperitheziums erfolgt über eine spezialisierte Hyphe, die Trichogyne, welche aus dem Protoperithezium auswächst und mit der männlichen Zelle fusioniert. Als männliche Zellen (Gameten) können sowohl Mikrokonidien, Makrokonidien, als auch Hyphenfragmente zur Befruchtung dienen. Die Mikro- und Makrokonidien können als vegetative Sporen auch ein neues, haploides Myzel bilden (Esser, 2000).

Als Konidien werden mitotisch gebildete Aplanosporen bezeichnet. Diese unbeweglichen Sporen können ein- bis vielkernig sein und werden exogen an Konidienträgern gebildet (Esser, 2000).

Befruchtete Protoperithezien entwickeln sich zu reifen Perithezien, in denen aus den Ascogonzellen Asci mit je acht linear angeordneten, homokaryotischen Ascosporen entstehen. In Abbildung 4 ist der Lebenszyklus von *N. crassa* schematisch dargestellt.

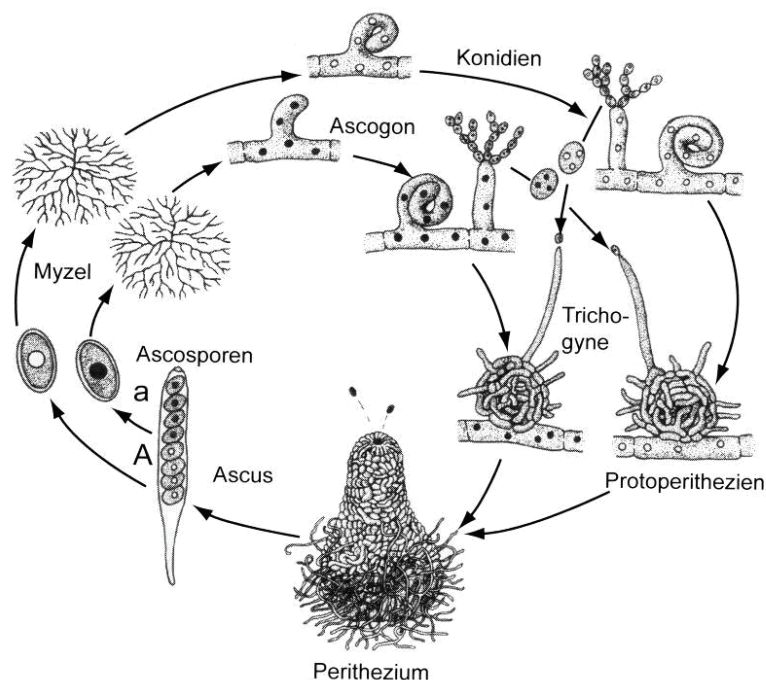


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Neurospora crassa*. Bei *N. crassa* existieren zwei Kreuzungstypen, *A* und *a*, und eine Kreuzung kann nur zwischen Stämmen unterschiedlichen Kreuzungstyps stattfinden. Aus der Ascospore entwickelt sich ein Myzel, an dem Ascogone (weibliche Gametangien) und Konidiosporen (männliche Gameten) entstehen. Aus dem Ascogon entwächst die Trichogyne. Sie kann mit einer Konidie des anderen Kreuzungstyps fusionieren. Die in den Asci enthaltenen Ascosporen entwickeln sich im Fruchtkörper (Perithezium). Nach Reifung werden die Ascosporen aus dem Fruchtkörper geschleudert. Weitere Details werden im Text erläutert (nach Esser 2000)

Einführung

N. crassa besitzt, ähnlich wie *S. cerevisiae*, ein bipolares Kreuzungstyp-System mit zwei verschiedenen Kreuzungstypen, *MAT A* und *MAT a*. Der *MAT1-2* (*MAT a*) Locus besteht aus zwei Genen, *MAT1-2-1* (*mat a-1*) und *MAT1-2-2* (*mat a-2*) (Pöggeler und Kück, 2000; Staben und Yanofsky, 1990) (Abb. 1). Während die Funktion von *MAT1-2-2* noch unbekannt ist, kodiert *MAT1-2-1* für ein HMG-Domänen Protein, welches den Hauptregulator der sexuellen Entwicklung in *MAT a* Stämmen darstellt (Chang und Staben, 1994).

Der *MAT1-1* Idiomorph besteht aus drei Genen, dem α -Domänen Protein *MAT1-1-1* (*mat A-1*), *MAT1-1-2* (*mat A-2*) und dem HMG-Domänen Protein *MAT1-1-3* (*mat A-3*) (Ferreira, *et al.*, 1998; Glass N. L., *et al.*, 1990a) (Abb. 1). In *MAT A* Stämmen stellt das Protein MAT1-1-1, ein Homolog des α 1p Transkriptionsfaktors aus *S. cerevisiae*, den Hauptregulator der sexuellen Entwicklung dar (Bobrowicz, *et al.*, 2002; Ferreira, *et al.*, 1998; Glass N. L., *et al.*, 1990a; Saupe, *et al.*, 1996). Das Gen *MAT1-1-2* kodiert für ein Protein mit einer PPF-Domäne, welche über keine bekannte DNA-Bindefunktion verfügt (Debuchy, *et al.*, 2010; Debuchy und Turgeon, 2006). Das Protein MAT1-1-3 schließlich enthält eine HMG-Domäne (Ferreira, *et al.*, 1996).

Einzeldelationen der Gene *MAT1-1-2* und *MAT1-1-3* führen zu einer leicht verringerten Fertilität und keinem erkennbaren vegetativen Phänotyp in *N. crassa*. Die Deletion beider Gene führt dagegen zu einer drastisch verringerten Fertilität. Trotzdem sind die Mutanten immer noch fertil und in der Lage, wenn auch in geringer Zahl, Perithezieren und Ascosporen zu bilden (Ferreira, *et al.*, 1998).

Wie in *S. cerevisiae* kontrollieren die Kreuzungstyp-Gene in *N. crassa* die Expression von zwei spezifischen Pheromon-Genen (*mfa-1* and *ccg-4*) (Bobrowicz, *et al.*, 2002). Das Protein MFa-1 kodiert für ein 24 Aminosäurepeptid, welches C-Terminal ein CAAX-Motiv beinhaltet. Damit zeigt es Homologien zu MFa-1 aus *S. cerevisiae* (Bobrowicz, *et al.*, 2002). Das Gen *ccg-4*, welches in *MAT A* Zellen exprimiert wird, kodiert für ein Vorläufer-Polypeptid, welches, wie MFa-1 und MFa-2 in *S. cerevisiae*, proteolytisch gespalten wird um fünf reife Pheromon-Polypeptide herzustellen. Die Sequenz dieser reifen Pheromone (QWCRIHGQSCW) ist homolog zu MFa-1 und MFa-2 aus *S. cerevisiae* (Bobrowicz, *et al.*, 2002). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass beide Pheromone essentiell für die männliche Fertilität in *N. crassa* sind (Kim H. und Borkovich, 2006).

Die Expression der Pheromon-Rezeptor Gene ist dagegen Kreuzungstyp-unabhängig reguliert (Pöggeler und Kück, 2001).

1.3.3. Filamentöse Ascomyceten: *Sordaria macrospora*

Der filamentöse Ascomycet *Sordaria macrospora*, ein naher Verwandter von *N. crassa*, ist homothallisch und in der Lage den sexuellen Lebenszyklus ohne einen Kreuzungspartner zu vollenden. An einem vegetativen Myzel entwickeln sich, unter Laborbedingungen, nach 3 Tagen Ascogonien, welche sich im Laufe der Entwicklung zu Protoperithezien und schließlich reifen Perithezien differenzieren. Innerhalb der Perithezien kommt es in den ascogenen Hyphen zur Karyogamie und Meiose. Aus diesem Prozess entstehen dann reife Asci mit acht linear angeordneten Sporen (Esser, 2000; Pöggeler, *et al.*, 2006a). Der Lebenszyklus von *S. macrospora* ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

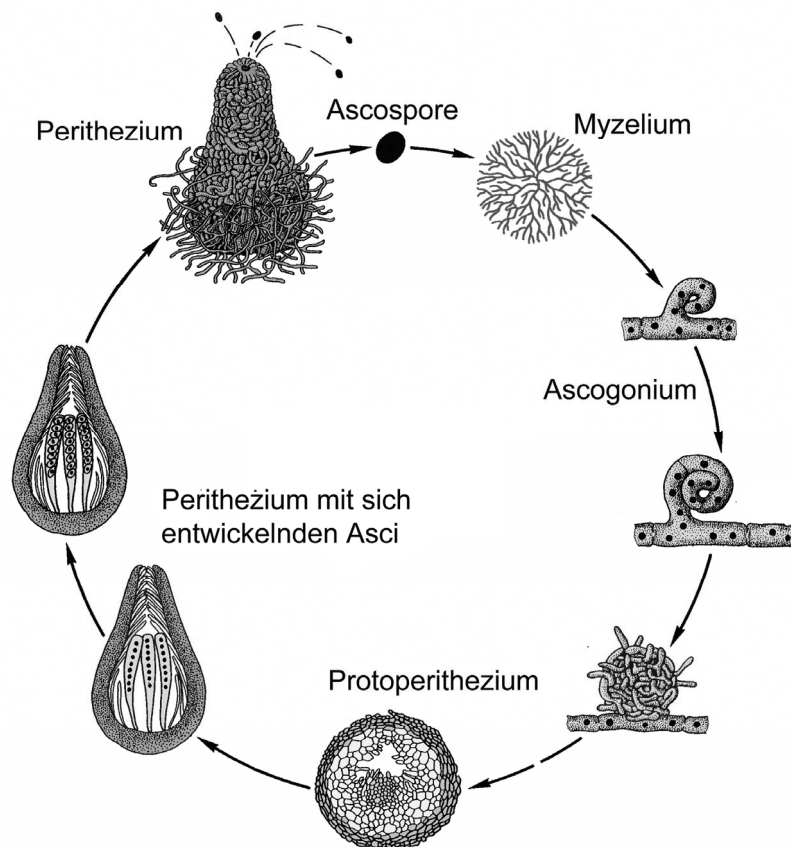


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Sordaria macrospora*. Aus einer Ascospore entwickelt sich zuerst ein Myzel. Während der Entwicklung des Peritheziums kommt es in den Ascogonzellen zur Bildung eines Dikaryons. Zwischen den beiden Kernen kommt es zur Karyogamie und nachfolgend zur meiotischen Teilung. Nach einer Reihe postmitotischer Teilungen sind acht Kerne vorhanden, welche im reifen Ascus in den Sporen vorliegen. Weitere Details werden im Text erläutert (verändert nach Esser, 2000).

Obwohl *S. macrospora* homothallisch ist und keinen zweiten Kreuzungspartner benötigt, wurde im Genom ein Kreuzungstyp-Locus entdeckt (Pöggeler, *et al.*, 1997). Dieser Locus zeigt Sequenzähnlichkeiten zu den *MAT*-Idiomorphen, sowohl *MAT a* als auch *MAT A*, aus *N. crassa* auf. Der Kreuzungstyp-Locus von *S. macrospora* besteht aus vier Genen (Abb. 1), dem HMG-Domänen Gen *Smta-1* (*MAT1-2-1*), dem Gen *SmtA-3* (*MAT1-1-3*), dem PPF-Domänen Gen *SmtA-2* (*MAT1-1-2*) und dem α -Domänen Gen *SmtA-1* (*MAT1-1-1*) und zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den Kreuzungstyp-Genen aus *N. crassa* und anderen *Sordariaceae* (Pöggeler und Kück, 2000; Pöggeler, *et al.*, 1997). Eine Besonderheit stellt dabei das Protein SMTA-3 dar, welches einen chimären Charakter zeigt und Ähnlichkeiten sowohl zu MAT1-2-2 als auch MAT1-1-3 aus *N. crassa* aufweist. Dabei fehlt SMTA-3 die für MAT1-1-3 Proteine typische HMG-Domäne und weist auch sonst keine bekannten funktionellen Domänen auf.

Wie in *S. cerevisiae* und *N. crassa* wurden in *S. macrospora* Pheromonvorläufer-Gene (*ppg-1*, *ppg-2*) und Rezeptor-Gene (*pre-1*, *pre-2*) gefunden (Pöggeler, 2000). Obwohl *S. macrospora* nicht darauf angewiesen ist einen kompatiblen Kreuzungspartner zu finden und mit diesem über Pheromonsignale einen Austausch von genetischem Material zu koordinieren, werden die Pheromon- und Rezeptor-Gene exprimiert und sind in die sexuelle Entwicklung involviert (Mayrhofer und Pöggeler, 2005; Mayrhofer, *et al.*, 2006; Pöggeler, 2000). Mindestens ein funktionelles Pheromon-Rezeptor-Paar (PPG-1 / PRE-2 oder PPG-2 / PRE-1) muss für die normale sexuelle Entwicklung vorhanden sein. Stämme, welche ausschließlich funktionelle Rezeptoren tragen, sind ebenfalls in der Lage sich sexuell fortzupflanzen, im Vergleich zum Wildtyp (Wt) ist die Fertilität aber deutlich reduziert (Mayrhofer, *et al.*, 2006).

1.3.4. Filamentöse Ascomyceten: *Penicillium chrysogenum*

Der Hyphenpilz *Penicillium chrysogenum* gehört zur Ordnung der Eurotiales innerhalb der Klasse der Ascomyceten (Esser, 2000). *P. chrysogenum* ist haploid und vermehrt sich ausschließlich über mitotisch gebildete Konidiosporen. Für die gesamte Gattung *Penicillium* ist die Form der Konidienträger namensgebend („Pinselschimmel“). Ein sexueller Zyklus ist für *P. chrysogenum* nicht bekannt.

Interessant, sowohl für Forschung als auch Industrie und Medizin, ist *P. chrysogenum* dagegen durch die Produktion von Inhibitoren bakteriellen Wachstums. Dieses Antibiotikum

Einführung

wurde 1928 von Alexander Fleming entdeckt und, abgeleitet vom Gattungsnamen des Pilzes, als „Penicillin“ bezeichnet (Fleming, 1929).

Von Fleming selbst wurde der Stamm als *Penicillium notatum* beschrieben (Fleming, 1929). Spätere Untersuchungen führten dazu, mehrere, bis dahin als einzelne Arten beschriebene *Penicillium* spp., als eine Art *Penicillium chrysogenum* (Thom) zusammenzufassen (Samson, *et al.*, 1977).

Im Jahre 1944 wurde in Illinois, USA, ein neuer Stamm von *P. chrysogenum* (NRRL1951) von einer Melone isoliert (Raper, *et al.*, 1944). Dieser Stamm war in der Lage, bedeutend größere Mengen an Penicillin zu produzieren als das ursprüngliche Isolat von Fleming (NRRL1249B21). Derivate dieses Stammes werden noch heute in der biotechnologischen Industrie als Produzenten von Penicillin in großem Maßstab genutzt (Demain und Elander, 1999; Keller, *et al.*, 2005).

Durch das Fehlen eines bekannten sexuellen Zyklus in *P. chrysogenum* sind der genetischen Analyse und der Optimierung der produzierten Antibiotika-Mengen in den Stämmen Grenzen gesetzt. In anderen Pilzen, mit bekanntem sexuellen Zyklus, ist die sexuelle Fortpflanzung ein bekanntes Mittel zur konventionellen genetischen Analyse (Pöggeler, 2001), welches in *P. chrysogenum* nicht angewendet werden kann.

Nichtsdestoweniger wurde vor kurzer Zeit in einer Studie die Existenz von exprimierten Kreuzungstyp-Genen in *P. chrysogenum* nachgewiesen (Hoff, *et al.*, 2008) (Abb. 1). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Homologe zu Pheromon- und Rezeptor-Genen vorhanden sind, welche in anderen Spezies in die sexuelle Fortpflanzung involviert sind.

Damit erinnert *P. chrysogenum* an den nahe verwandten Pilz *Aspergillus fumigatus*. Dieser humanpathogene Ascomycet wurde lange ebenfalls als asexuell angesehen. Nach der Sequenzierung des Gesamtgenoms von *A. fumigatus* konnten allerdings ebenfalls Gene gefunden werden, welche in anderen Pilzen in den sexuellen Zyklus involviert sind (Galagan, *et al.*, 2005) (Abb. 1). Darunter wurden auch Gene gefunden, welche für HMG-Domänen bzw. α -Domänen Proteine kodieren (Paoletti, *et al.*, 2005). Diese Gene wurden niemals zugleich in einem Genom gefunden, sondern waren in einem 1:1 Verhältnis innerhalb der verschiedenen Isolate verteilt, welches typisch für Kreuzungstyp-Gene ist und auf eine latente Sexualität innerhalb von *A. fumigatus* hindeutete. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass zwei *A. fumigatus* (*MATI-1* und *MATI-2*) unter den richtigen Wachstumsbedingungen in der Lage ist, sich sexuell fortzupflanzen (O’Gorman, *et al.*, 2009).

Ein sexueller Zyklus konnte für *P. chrysogenum* bisher nicht beschrieben werden, das Vorhandensein von Kreuzungstyp-Gene, Pheromonen und Rezeptoren lassen jedoch auf das Vorhandensein eines Solchen, wie im Fall *A. fumigatus*, schließen.

1.4. Zusammenfassung

Die Gruppe der Pilze lässt sich nach der Art der sexuellen Fortpflanzung grob in zwei Klassen unterteilen: die heterothallischen, selbst-sterilen, und die homothallischen, selbst-fertilen, Pilze (Lin und Heitman, 2007). Heterothallische Pilze benötigen zur sexuellen Vermehrung einen kompatiblen Kreuzungspartner unterschiedlichen Kreuzungstyps. Die Gene, welche für die Kreuzungstyp-Identität verantwortlich sind, liegen in speziellen Loci, den sogenannten *MAT*-Loci. In Ascomyceten wird für die unterschiedlichen Versionen der *MAT*-Loci der Begriff Idiomorph anstatt Allel verwendet, da die Loci an der gleichen Stelle in homologen Chromosomen liegen, die Nukleinsäuresequenzen jedoch hoch polymorph sind und für unterschiedliche Proteine kodieren (Metzenberg und Glass, 1990).

Homothallische Arten besitzen häufig ebenfalls Kreuzungstyp-Gene. Hier besitzt jedoch jedes Individuum die gleiche Art *MAT*-Locus, weswegen der Begriff Idiomorph hier nicht verwendet wird. Die Gene im Kreuzungstyp-Locus homothallischer Arten zeigen häufig Homologien zu Genen beider Kreuzungstyps aus nahe verwandten, heterothallischen Arten (Pöggeler, 2001).

Die Proteine, welche im Kreuzungstyp-Locus kodiert werden, stellen putative Transkriptionsfaktoren dar und es wird angenommen, dass sie Gene der sexuellen Entwicklung direkt oder indirekt kontrollieren. Auch eine Beteiligung an vegetativen Vorgängen konnte bereits nachgewiesen werden (Ferreira, *et al.*, 1998; Ferreira, *et al.*, 1996; Glass N. L., *et al.*, 1990a; Glass N. L. und Lee, 1992; Glass N. L. und Smith, 1994).

Bekannte Gene, deren Expression durch die *MAT*-Proteine reguliert wird, sind Pheromon- und Rezeptor-Gene (Herskowitz, 1989). Gene für zwei Pheromonvorläufer und entsprechende G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind weit verbreitet in der Klasse der Ascomyceten und konnten bisher in vielen heterothallischen, homothallischen und sogar asexuellen Spezies nachgewiesen werden (Bistis, 1981; Bölker und Kahmann, 1993; Dohlman und Thorner, 2001; Lee J., *et al.*, 2008; Pöggeler, 2000). Die Struktur und Sequenz dieser Pheromone und Rezeptoren ist hoch konserviert zwischen verschiedenen heterothallischen Ascomyceten wie *S. cerevisiae* (Kurjan, 1993), *N. crassa* (Bobrowicz, *et al.*, 2002; Kim H., *et al.*, 2002),

Einführung

P. anserina (Coppin, *et al.*, 2005) oder *Magnaporthe grisea* (Shen W. C., *et al.*, 1999) und sind essentiell für die sexuelle Entwicklung (Coppin, *et al.*, 2005; Kim H. und Borkovich, 2004).

In homothallischen Spezies konnten Pheromone und G-Protein gekoppelte Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Funktion dieser Proteine ist hier aber unterschiedlich. Während *S. macrospora* und *Aspergillus nidulans* mindestens einen funktionellen Rezeptor und zur vollen Fertilität ein Pheromon-Rezeptor-Paar benötigen (Mayrhofer, *et al.*, 2006; Seo, *et al.*, 2004), ist der Ascomycet *Gibberella zeae* in der Lage den sexuellen Zyklus ohne funktionelle Pheromone oder Rezeptoren zu vollenden (Lee J., *et al.*, 2008).

2. Problemstellung

2.1. *Sordaria macrospora*

Die sexuelle Fortpflanzung ist ein komplexer zellulärer Prozess, der durch viele verschiedene Gene kontrolliert wird. Als Modellorganismus zur Untersuchung entwicklungsbiologischer Prozesse bietet *S. macrospora* mehrere Vorteile. Der Pilz ist nicht infektiös und lässt sich als koprothiler Organismus einfach kultivieren. Ein zusätzlicher Vorteil ist der einfache Lebenszyklus, der unter Laborbedingungen in sieben Tagen durchlaufen wird. Zudem besitzt *S. macrospora* keinen vegetativ-mitotischen Vermehrungszyklus über Konidiosporen, was eine Untersuchung der spezifischen Regelkreisläufe der sexuellen Entwicklung erleichtert (Kück, *et al.*, 2009).

So konnten in *S. macrospora* durch Mutationsexperimente bereits Gene identifiziert werden, die an diesem Prozess beteiligt sind. So sind Mutanten der Gene *inf25* und *inf40* nicht in der Lage, Ascii und Ascosporen zu entwickeln (Nowrousian, *et al.*, 1999). Die Gene *pro1*, *pro11* und *pro40* sind dagegen für eine Weiterentwicklung früher Protoperithezien zu reifen Perithezien essentiell. Mutanten dieser Gene sind daher steril (Masloff, *et al.*, 2002; Masloff, *et al.*, 1999; Pöggeler und Kück, 2004).

Wie in *S. cerevisiae* sind die Kreuzungstyp-Gene heterothallischer, filamentöser Ascomyceten in die direkte oder indirekte Regulation Kreuzungstyp-spezifischer Gene, wie von Pheromonen und Rezeptoren, involviert (Bardwell, 2005; Debuchy, *et al.*, 2010; Debuchy und Turgeon, 2006; Kothe, 2008). In dem homothallischen Ascomyceten *S. macrospora* wurde ebenfalls ein Kreuzungstyp-Locus und Gene eines Pheromon-Rezeptor-Systems identifiziert (s. 1.3.3). Der Kreuzungstyp-Locus von *S. macrospora* enthält vier Gene, *Smta-1* (*MAT1-2-1*), *SmtA-1* (*MAT-1-1-1*), *SmtA-2* (*MAT1-2-1*) und *SmtA-3* (*MAT1-1-3*). Die Kreuzungstyp-Gene *SmtA-1* und *Smta-1* kodieren für Proteine mit konservierten DNA-Bindedomänen und in einem Hefereportersystem konnte für SMTA-1 und SMTa-1 die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung bereits nachgewiesen werden (Jacobsen, *et al.*, 2002; Pöggeler, 2001). In einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurde für das Protein SMTa-1 eine Interaktion mit dem Kreuzungstyp-Protein SMTA-1 nachgewiesen (Jacobsen, *et al.*, 2002). SMTA-1 wiederum interagiert mit den Transkriptionsfaktoren STE12 und MCM1 (Nolting und Pöggeler, 2006a; b). Homologe dieser Gene in *S. cerevisiae* sind unter anderem an der Regulation der Expression des α -Faktor Pheromons und des α -Faktor Rezeptors beteiligt

Problemstellung

(Johnson, 1995) und in einer Δ Smta-1 Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass dieses Protein direkt oder indirekt an der positiven Regulation der Expression des Pheromonvorläufer-Gens *ppg-2* aus *S. macrospora* beteiligt ist (Pöggeler, *et al.*, 2006b).

Die Funktion der anderen drei Gene (*MAT1-1-1*, *MAT1-1-2*, *MAT1-1-3*) ist bisher unbekannt. In dieser Studie sollten die *MAT1-1* Gene von *S. macrospora* molekulargenetisch untersucht werden. Dazu wurden Gendeletionen der einzelnen Gene und eine Doppeldeletion von *SmtA-2* und *SmtA-3* erstellt. Die für die Einzeldelationen verwendeten Deletionskonstrukte wurden in vorhergegangene Studien bereits hergestellt (Brzonkalik, 2006; Klix, 2007). Die entstandenen Mutanten wurden hinsichtlich ihres Phänotyps in der sexuellen und vegetativen Entwicklung untersucht.

Zusätzlich wurde die Genexpression in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mittels einer Microarray-Analyse gegen *N. crassa* Oligo-Chips getestet. Die Expression der Pheromon- und Rezeptor-Gene in den Mutanten wurde durch real-Time-PCR mit dem Wildtyp verglichen. Gene, welche in den Microarray Experimenten als unterschiedlich reguliert gefunden wurden, wurden außerdem mittels real-Time-PCR bestätigt. Da für SMTA-1 in einem Hefereportersystem bereits Interaktionspartner gefunden werden konnten, wurde ein solcher Test mit SMTA-2 gegen eine *S. macrospora* cDNA-Bank durchgeführt.

Zum besseren Verständnis der Vorgänge um die Kreuzungstyp-Proteine *in vivo* wurden die Proteine MAT1-1-2 und MAT1-1-3 mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen fusioniert und ihre Lokalisation in der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

2.2. *Penicillium chrysogenum*

Der asexuelle Ascomycet *Penicillium chrysogenum* besitzt in der industriellen Biotechnologie einen hohen Stellenwert als Produzent des Antibiotikums Penicillin mit einem weltweiten Marktwert von etwa 8 Milliarden US\$ (Barber, *et al.*, 2004).

Die Möglichkeit Pilze sexuell unter Laborbedingungen zu kreuzen stellt eine wichtige Methode der genetischen Analyse dar (Pöggeler, 2001). Gerade für die industrielle Nutzung ist es hierbei interessant Stämme zu entwickeln, welche benötigte Metabolite schneller und in größerer Menge herstellen.

Die Gattung *Penicillium* besteht aus vielen, scheinbar asexuellen Spezies. Durch das Fehlen eines sexuellen Zyklus sind die Spezies der Gattung *Penicillium* häufig schwierig durch konventionelle genetische Methoden zu verändern. In den asexuellen, humanpathogenen

Problemstellung

Pilzen *Aspergillus fumigatus* und *Penicillium marneffei*, nahe Verwandte von *P. chrysogenum*, wurden durch Sequenzanalysen des Gesamtgenoms Gene gefunden, welche in Zusammenhang mit sexueller Entwicklung bekannt sind, darunter Kreuzungstyp-Gene und Gene der Pheromonproduktion (Galagan, *et al.*, 2005; Paoletti, *et al.*, 2005; Pöggeler, 2002; Woo, *et al.*, 2006). In *A. fumigatus* konnte kürzlich sogar die Fähigkeit zur sexuellen Fortpflanzung bewiesen werden (O'Gorman, *et al.*, 2009).

In *P. chrysogenum* wurde mittlerweile ebenfalls die Existenz von Kreuzungstyp-Genen und Genen der Pheromon Produktion und Erkennung nachgewiesen (Hoff, *et al.*, 2008). In einer Kooperation mit dem Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik in Bochum, sollte in dieser Arbeit zusätzlich die Funktionalität der Pheromone und Pheromon-Rezeptoren aus *P. chrysogenum* untersucht werden. Dies sollte in einem heterologen System innerhalb von *S. cerevisiae* mittels eines Hemmhof-Tests („Halo-Test“) durchgeführt werden. Dieser Test wurde bereits für die Pheromone und Rezeptoren aus *S. macrospora* durchgeführt und etabliert (Mayrhofer und Pöggeler, 2005).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Organismen

***Escherichia coli* K12**

SURE

e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F', proAB, lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c; Rezipientenstamm für die Vermehrung von Plasmidvektoren und deren Derivaten.

Saccharomyces cerevisiae

PJ69-4A

MATa; trp1-901; leu2-3, 112; ura3-52; his3-200; gal4Δ; gal80Δ; LYS2::GAL1-HIS3; GAL2-ADE2; met2::GAL7-lacZ; Stamm für die Herstellung von Deletionskonstrukten nach Colot, *et al.* (2006) durch homologe Rekombination (James, *et al.*, 1996).

BY4741

MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; Δsst2::KanMX4; Stamm für die Durchführung von Pheromon-Hemmhof-Tests als Wildtyp-Kontrolle; Stammsammlung „EuroScarf“ (Frankfurt).

YDB103

MATa; -leu2; -ura3; -trp1; Δsst2::KanMX4; ste2Δ; Stamm für die Durchführung von Pheromon-Hemmhof-Tests mit heterolog exprimierten Pheromon-Rezeptoren (Ballon, *et al.*, 2006).

YLR452c

MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; Δsst2::KanMX4; Stamm für die Durchführung von Pheromon-Hemmhof-Tests mit heterolog exprimierten Pheromonen; Stammsammlung „EuroScarf“ (Frankfurt).

AH109

MATα; ura3-52; his3-200; ade2-101; trp1-901; leu2-3, 112; gal4Δ; met⁻; gal80Δ; MEL1; URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ; Stamm für die Nutzung in einem Hefereportersystem.

Y187

MATa; trp1-901; leu2-3, 112; ura3-52; his3-200; ade2-101; gal4Δ; gal80Δ; LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3; GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2; URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ; MEL1; Stamm für die Nutzung in einem Hefereportersystem.

Sordaria macrospora

Die verwendeten *S. macrospora* Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten *S. macrospora* Stämme.

Stamm	Charakteristika	Referenz
S48977	Wildtyp	Stammsammlung RUB ¹
S23442 (Fus1-1)	<i>fus1-1</i> ; Farbspormutante, Wildtyp-Phänotyp	Stammsammlung RUB
S67813 (R2)	<i>r2</i> ; Farbspormutante, Wildtyp-Phänotyp	Stammsammlung RUB
S66001	$\Delta ku70::nat1$; Rezipientenstamm mit Defekt im NHEJ-System ²	(Pöggeler und Kück, 2006)
WtRed	<i>dsRed</i> ; Fluoreszenzprotein dsRED in Wildtyp-Hintergrund	diese Arbeit
SmtA-3_Red	<i>SmtA-3_dsRed</i> ; Kreuzungstyp-Gen gekoppelt mit dsRed	diese Arbeit
$\Delta Smta-1$	$\Delta Smta-1::hph$	(Pöggeler, et al., 2006b)
$\Delta SmtA-1$	$\Delta SmtA-1::hph$	(Klix, et al., 2010)
$\Delta SmtA-1fus$	$\Delta SmtA-1fus::hph$	(Klix, et al., 2010)
$\Delta SmtA-2$	$\Delta SmtA-2::hph$	(Klix, et al., 2010)
$\Delta SmtA-2fus$	$\Delta SmtA-2::hph fus1-1$; Farbspormutante in $\Delta SmtA-2$ Hintergrund	(Klix, et al., 2010)
$\Delta SmtA-2/3$	$\Delta SmtA-2/3::hph$	(Klix, et al., 2010)
$\Delta SmtA-2/3::SmtA-2$	$\Delta SmtA-2/3::hph SmtA-2^{ect}$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2/3::SmtA-3$	$\Delta SmtA-2/3::hph SmtA-3^{ect}$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::SmtA-2$	$\Delta SmtA-2::hph SmtA-2^{ect}$	(Klix, et al., 2010)
$\Delta SmtA-3$	$\Delta SmtA-3::hph$	(Klix, et al., 2010)
$\Delta SmtA-3fus$	$\Delta SmtA-3::hph fus1-1$; Farbspormutante in $\Delta SmtA-2$ Hintergrund	(Klix, et al., 2010)
$\Delta SmtA-2::A2-188$	$\Delta SmtA-2::hph pRSn-A2-188$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::A2-199$	$\Delta SmtA-2::hph pRSn-A2-199$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::A2-205$	$\Delta SmtA-2::hph pRSn-A2-205$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::A2-S-N$	$\Delta SmtA-2::hph pRSn-A2-S-N$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::SmtA-2_dsRed$	$\Delta SmtA-2::hph pRHN-A2$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::SmtA-2_GFP$	$\Delta SmtA-2::hph pRSnG-A2$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::mat A2$	$\Delta SmtA-2::hph N. crassa mat A2^{ect}$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::SMR1$	$\Delta SmtA-2::hph P. anserina SMR1^{ect}$	diese Arbeit
$\Delta SmtA-2::GFP$	$\Delta SmtA-2::hph pRSnGFP$	diese Arbeit

¹ Stammsammlung des Lehrstuhls für Allgemeine und Molekulare Botanik, Ruhr-Universität Bochum.

² NHEJ: „Non-homologous end joining“, Reparatursystem für DNA-Doppelstrangbrüche.

^{ect} ektopisch integriert.

3.1.2. Plasmide

In Tabelle 2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Ausgangsplasmide, besondere Charakteristika und Referenzen sind aufgeführt.

Plasmid	Ausgangsplasmid	Charakteristika	Referenz
pRS426	---	<i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i> Schaukelvektor; <i>URA3</i> ; <i>Amp^r</i>	(Christianson, <i>et al.</i> , 1992)
p1783	---	<i>gpd(p)::gfp::trpC(t)</i> ; <i>hph</i>	(Pöggeler, <i>et al.</i> , 2003)
pGADT7	---	<i>GAL4</i> Aktivierungsdomäne; <i>Leu2</i> ; <i>Amp^r</i>	Clontech laboratories Inc.
pGBKT7	---	<i>GAL4</i> DNA Bindedomäne; <i>TRP1</i> ; <i>Kan^r</i>	Clontech laboratories Inc.
pPGK	---	<i>PGK</i> Promotor und Terminator; <i>URA3</i>	(Kang, <i>et al.</i> , 1990)
pRHN1	---	<i>gpd(p)::DsRed::trpC(t)</i> ; <i>nat1</i>	(Janus, <i>et al.</i> , 2007)
pRSnat	pRS426	<i>nat1</i>	(Klix, <i>et al.</i> , 2010)
pGAD-ranBPM	pGADT7	<i>ranBPM</i> fusioniert an <i>GAL4</i> - AD	(Tucker, <i>et al.</i> , 2009)
pGB-A2	pGBKT7	<i>SmtA-2</i> fusioniert an <i>GAL4</i> - BD	diese Arbeit
pPGK-SmPPG1	pPGK	<i>S. macrospora ppg-1</i> ORF	(Mayrhofer und Pöggeler, 2005)
pPGK-SmPRE2	pPGK	<i>S. macrospora pre-2</i> ORF	(Mayrhofer und Pöggeler, 2005)
pPGK-PcPPG1	pPGK	<i>P. chrysogenum ppg-1</i> ORF	diese Arbeit
pPGK-PcPRE2	pPGK	<i>P. chrysogenum pre-2</i> ORF	diese Arbeit
pRHN-A3	pRHN1	<i>gpd(p)::SmtA-3- DsRed::trpC(t)</i> ; <i>nat1</i>	diese Arbeit
pRHN-A2	pRHN1	<i>gpd(p)::SmtA-2- DsRed::trpC(t)</i> ; <i>nat1</i>	diese Arbeit
pRS-Ba1	pRS426	<i>S. macrospora SmtA-1</i> ORF	diese Arbeit
pRS-Ba2	pRS426	<i>S. macrospora SmtA-2</i> ORF	(Klix, <i>et al.</i> , 2010)
pRS-Ba3	pRS426	<i>S. macrospora SmtA-3</i> ORF	diese Arbeit
pRSn-A2-188	pRSnat	<i>S. macrospora SmtA-2</i> ORF(Protein AS 1-188)	diese Arbeit
pRSn-A2-199	pRSnat	<i>S. macrospora SmtA-2</i> ORF (Protein AS 1-199)	diese Arbeit
pRSn-A2-205	pRSnat	<i>S. macrospora SmtA-2</i> ORF (Protein AS 1-205)	diese Arbeit
pRSn-A2-S-N	pRSnat	<i>S. macrospora SmtA-2</i> ORF (Protein AS 199-359)	diese Arbeit
pRS-ΔA1	pRS426	<i>SmtA-1(p)::hph::SmtA-1(t)</i>	(Brzonkalik, 2006)
pRS-ΔA2	pRS426	<i>SmtA-2(p)::hph::SmtA-2(t)</i>	(Klix, 2007)
pRS-ΔA3	pRS426	<i>SmtA-3(p)::hph::SmtA-3(t)</i>	(Klix, 2007)
pRS-ΔA2/3	pRS426	<i>SmtA-3(p)::hph::SmtA-2(t)</i>	(Klix, <i>et al.</i> , 2010)

pRS-Ba2-S-N	pRS-Ba2	<i>SmtA-2</i> ORF verkürzt mit <i>SacI</i> + <i>NcoI</i> (AS 199-359)	diese Arbeit
pRSnGFP	pRSnat	<i>gpd(p)::gfp::trpC(t); nat1</i>	Gehsing und Nowrousian, pers. Mitteilung
pRS-NcA2	pRSnat	<i>N. crassa mat A-2; nat1</i>	diese Arbeit
pRS-PaSMR1	pRSnat	<i>P. anserina SMR1; nat1</i>	diese Arbeit
pRSnG-A2	pRSnGFP	<i>gpd(p)::SmtA-2-gfp::trpC(t); nat1</i>	diese Arbeit

AD: Aktivierungsdomäne; **Amp^r:** Ampicillinresistenzkassette; **AS:** Aminosäure; **BD:** Bindedomäne; **hph:** Hygromycin B-Resistenzkassette; **nat1:** Nourseothricinresistenzkassette; **(p):** Promotor; **(t):** Terminator; **URA3, LEU2, TRP1:** Gene der Uracil (Ura), Leucin (Leu) oder Tryptophan (Trp) Biosynthese.

3.1.3. Oligonukleotide

In Tabelle 3 sind alle Oligonukleotide aufgeführt, die als PCR-Startermoleküle eingesetzt worden sind.

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligostarternukleotide. Sequenzen, welche homolog zu Hefe-Vektoren zwecks homologer Rekombination sind, sind hervorgehoben. Spezifische Sequenzen für Restriktionsendonukleasen sind kursiv gehalten, durch die Oligonukleotide eingeführte Punktmutationen sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5' --> 3')
1783-f	GCTACATCCATACTCCATCC
1783-r	GTCTCAACTCCGGAGCTGAC
A1-NcoI-f	<i>CCATGG</i> CCAGCGTCGATCAAA
A1-NcoI-r	<i>CCATGG</i> CTGCTCCTCCATTGAATCC
A2-188-r	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGC TCATGTATGGTCAACATGCC
A2-199-r	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGC TCATGGAGTGCCTGGAACGC
A2-205-r	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGC TCAGCCAAAGAACTTGTGCC
A2-GFP-f	GCTTGACTAACAGCTACAGATCTAAGCTT ATGGAGCTCATCAACACGCA
A2-GFP-r	CCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCAC AATGTGATAAACGTGCTCCT
A2-NcoI-f	<i>CCATGG</i> AGCTCATCAACACGC
A2-NcoI-r	<i>CCATGG</i> CAATGTGATAAACGTGCTC
A2-NcoI-RIPf	AGGCACTCCGTGGCACAAGTTCTTTGGCAATGTGGAAGTT
A2-NcoI-RIPr	AACTTCCACATTGCCAAAGAACTTGTGCCACGGAGTGCCT
A3-NcoI-f	<i>CCATGG</i> CTGCCCCAGACGTTG
A3-NcoI-r	<i>CCATGG</i> CGGCGAGAATGTCTGGGT
Ba1-5f	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG GAGGAGCACGTTTATCACATT

Ba1-5r	CCAAAAATGCTCCTTCAATATCAGTTAAC AGAGGATGGTCATGAAGGGCG
Ba1-3f	GAGTAGATGCCGACCGGGAACCAGTTAAC CAGAGGCAGATGACGTCGCCA
Ba1-3r	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCT GAGGGGTACGTCTTGTACAC
Ba1Ko-f	GGTCTTGCGGATCACTTTGAC
Ba1Ko-r	CGAGGCAACTTTTGGACACGG
Ba1-Wt	GTAATCTTCTTCTCCCGCTGCGCG
Ba2-5f	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG AACGTCTGGGGCAGACATGC
Ba2-5r	CAAAAAATGCTCCTTCAATATCAGTTAAC TGCGTGTTGATGAGCTCCAT
Ba2-3f	GAGTAGATGCCGACCGGGAACCAGTTAAC GTGATCATCCCTGAAACTGC
Ba2-3r	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCT TGATCGACGCTGGACATCG
Ba2Ko-f	CATCACCTGAACCCTGCCAAAG
Ba2Ko-r	GAGGATGGTCATGAAGGGCGA
Ba2-Wt	TGACTGCTGCGTTGCGCTCGCC
Ba3-5f	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG GTGCATCAAGTTGTCTTCCA
Ba3-5r	CAAAAAATGCTCCTTCAATATCAGTTAAC AATTGAACCTTCAGCGCTAC
Ba3-3f	GAGTAGATGCCGACCGGGAACCAGTTAAC AACGTCTGGGGCAGACATGC
Ba3-3r	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCT GCGTGTTGATGAGCTCCAT
Ba3Ko-f	GCCATGGTGGCCCTGAGTTCCG
Ba3Ko-r	TCGTTGCTAGACCCAAACCAGC
Ba3-Wt	TTATGCTTCAAACCCACGTTTG
ctr3-f	CGTCGTTTGCCTCAGCAACAAC
ctr3-r	AGAACTTGCCAATCAGCGCCC
GFP-A2-f	TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG GAGCTCATCAACACGCAACG
GFP-A2-r	TTGATGATTTAGTAACGTTAAGTGGATC TCAAATGTGATAAACGTGCT
hph-3	ACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG
hph-f	GTTAACTGATATTGAAGGAGCATTTTTGG
hph-r	GTTAACTGGTTCCCGGTCCGCATCTACTC
Nat-lig-f	<i>CAATTGCTGCAG</i> CAGCTATGACCATGATTACG
Nat-lig-r	<i>CAATTGCTGCAG</i> CTTTGGTTTAGGGTTAGGGC
NcA2-f	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG TTGTGATAGAGGGGTGCAGA
NcA2-r	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC ATCTGAAACCCATGAAGCCG
orc-f	ACGCTTGACTCGTTCAAGGCAC

orc-r	AGTCCTGCTTTTTCTGCCGCTG
PaSMR1-f	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG TGAGAAGAGGTGAACAGAAG
PaSMR1-r	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC CTGTTCATTTCTGTCCCAGT
pGAD-AD3	AGATGGTGCACGATGCACAG
pkf-f	GGTCATGGGCCACAGTCTCG
pkf-r	CGTGGCTGTTTCATCGTGCAC
ppg1-f	AAGCGCCAGGTTGACGAGC
Ppg1-hom-f	GTAATTATCTACTTTTTACAACAAATAT ATGAAGTTCACCTCCGTCTGTC
Ppg1-hom-r	ATTGATCTATCGATTTCAATTCAATTC TTACTCGTCATCCTCTTCCTC
ppg1-r	CGTCCTTCTTCTCCTCCTCGGT
ppg2-f	CGGTATCTCGCCTCTCAACGT
ppg2-r	GTTGTGCTCCCATTGTGCAGA
pre1-f	GCATTCACGCCACATCAAC
pre1-r	GTTGTGCCGAAGGTGATGCA
pre2-f	TCCACCCGTTCCATACCCTG
Pre2-hom-f	TAATTATCTACTTTTTACAACAAATAT ATGGCGACATCATCTCCAATTC
Pre2-hom-r	ATTGATCTATCGATTTCAATTCAATTC TCACACGATTGAATTGTTCTT
pre2-r	TCGATGCAAGCTAGTTCGCG
pRS-Seq-f	GCGTAACCACCACCCCGCCGC
pRS-Seq-r	CACTCATTAGGCACCCAGG
sdh-f	CGGCTGAGGAGTTCATCCAGA
sdh-r	TGGTGGTAGCCGATGATCTCG
sod2-f	AACCTCAACAACGCCCTGCAAG
sod2-r	AAGCCGTCAAAGCTGCCGAATG
SSU-f	ATCCAAGGAAGGCAGCAGGC
SSU-r	TGGAGCTGGAATTACCGCG
T7	TAATACGACTCACTATAGGGC
teh-f	GGCATCACGGTCAATGGTGT
teh-r	TGCTCAGCCATCATCCTCTCA
tih-f	GTAACAGCGTGCTTGGGCA
tih-r	TCAACATCAACCCCGTGGC
trpC1	TCACCGCCTGGACGACTAAACC

3.1.4. Chemikalien

aad UTP (Sigma-Aldrich, München), Adenin (Fluka Chemie GmbH, Buchs), Agar-Agar (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg), α mating factor (Sigma-Aldrich, München), Ameisensäure (Merck, Darmstadt), Ammoniumsulfat (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Ampicillin (AppliChem, Darmstadt), artifizielles Pheromon (SmPPG1 / PcPPG1) (GenScript

Corporation, Piscataway, USA), Bacto-Pepton/Trypton (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Bacto-Yeast-Extract (Oxoid LTD., Hampshire, UK), Biotin (Sigma-Aldrich, München), Bromphenolblau (Merck, Darmstadt), Borsäure (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Calciumchlorid (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Chloroform (Merck, Darmstadt), CSM-Ade-His-Leu-Trp und CSM-Ade-His-Leu-Ura (MP Biomedicals, Illkirch, F), Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) (Fermentas, St.-Leon-Rot, St.-Leon-Rot), DMSO = Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt), EDTA = Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Dinatriumsalz (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Ethanol (VWR International, Haasrode, B), Ethidiumbromid (Boehringer, Mannheim), Formamid (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Formaldehyd (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, St.-Leon-Rot), GeneScreen Hybridization Transfer Membran (PerkinElmer Lifesciences, Wellesley, USA), Glucose (AppliChem, Darmstadt), Glycerin (VWR International, Haasrode, B), Hefeextrakt (Oxoid, Cambridge, UK), Histidin (Merck, Darmstadt), Hygromycin B (Calbiochem Merck-Gruppe, Darmstadt), Isopropanol (AppliChem, Darmstadt), Kaliumacetat (Merck, Darmstadt), Kanamycin (Fluka Chemie GmbH, Buchs), Leucin (MP Biomedicals, Illkirch, F), Lithiumacetat (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Maismehl (Mühle Levers, Bochum), Malzextrakt (Brau-Partner Kling, Heilbronn), Natriumacetat (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Natriumchlorid (AppliChem GmbH, Darmstadt), Natriumhydroxid (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena), Phenol (AppliChem, Darmstadt), Saccharose (VWR International, Haasrode, B), Salzsäure (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), SDS = Natriumdodecylsulfat (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Sorbit (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Tetrazyklin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), Tris = Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Triton X-100 (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), Xylene Cyanol (Merck, Darmstadt), Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA), Zitronensäure-Monohydrat (Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe)

Bei Firmensitzen außerhalb Deutschlands ist das Land abgekürzt zusätzlich angegeben.

3.1.5. Kits

CloneJet™ PCR Cloning Kit (Fermentas, St.-Leon-Rot), DIG High Prime Labeling and Detection starter Kit® (Roche, Mannheim), Hexamer Primer (Fermentas, St.-Leon-Rot) HiSpeed® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden), HotStarTaq® Master Mix Kit (Qiagen, Hilden), polyATtract mRNA isolation system® (Promega, Mannheim), Qiaquick Gel Extraction Kit® (Qiagen, Hilden), Qiaprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen, Hilden), qPCR MasterMix for SYBR Green® (Eurogentec), SuperScript II Reverse Transcriptase® (Invitrogen, Darmstadt), Transcription High Fidelity cDNA Synthesis Kit® (Roche, Mannheim).

3.1.6. Enzyme

Calf-intestine Alkaline Phosphatase (Fermentas, St.-Leon-Rot), Blunting Enzyme Mix (CloneJet PCR Cloning Kit, Fermentas, St.-Leon-Rot), Glucanex (Schliessman, Schwäbisch Hall), Lysozym (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), Ribonuklease A (Roche, Mannheim), Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St.-Leon-Rot), T4 DNA Ligase (Fermentas, St.-Leon-Rot).

3.1.7. Nährmedien

Escherichia coli

LB: 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7,2; Festmedium mit 1,5% (w/v) Agar; Zusatz von Ampicillin (120 µg/ml) zur Selektion von Transformanten.

SOC: 2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7,5.

Saccharomyces cerevisiae

YEPD: 2% (w/v) Bacto-Pepton, 1% (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose, pH 5,8; Festmedium mit 2% (w/v) Agar, pH 5,8.

YPDA: 1% (w/o) Bacto Yeast Extract, 2% (w/o) Bacto Pepton, 2% (w/o) Glucose, 0,003% (w/o) Adenin-Hemisulfat, pH 5,8.

SD: 0,17% (w/v) Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 2% (w/v) Glucose, 0,5% (w/v) Ammoniumsulfat, 0,064% CSM (-Ade-His-Leu-Ura) oder (-Ade-His-Leu-Trp) (MP Biochemicals, Illkirch, Frankreich), pH 5,8, für Festmedium 2% (w/v) Agar (Serva Electrophoresis).

Sordaria macrospora

BMM: 0,8% (w/v) Biomalz in Maismehlextrakt (25g/l), pH 6,5; Festmedium mit 0,8% (w/v) Agar; zur Selektion von Transformanten Zugabe von 110 U/µl Hygromycin B; zur Herstellung von Einzelsporisolen Zugabe von 5% (w/v) Natriumacetat.

CM: 1% (w/v) Glucose, 0,2% (w/v) Trypton, 0,2% (w/v) Hefeextrakt, 0,15% (w/v) KH₂PO₄, 0,05% (w/v) KCl, 0,05% (w/v) MgSO₄, 0,37% (w/v) NH₄Cl, Spurenelemente (10 mg/l ZnSO₄, 10 mg/l Fe(II)Cl₂, 10 mg/l MnCl₂), pH 6,5.

CMS: CM mit 10,8% (w/v) Saccharose; Festmedium mit 2% (w/v) Agar.

SWG: 1x Westergaard's, 2% (w/v) Glucose, 1% (w/v) Arginin, 0,1% (v/v) Biotin, pH 6,5; Festmedium mit 1,5% (w/v) Agar.

3.1.8. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Birnboim & Doly-Lsg. 1: 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0; vor Gebrauch 2 mg/l Lysozym frisch hinzugeben

Birnboim & Doly-Lsg. 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS

Birnboim & Doly-Lsg. 3: 3 M Kaliumacetat, 1,8 M Ameisensäure

Biotin-Stammlösung: 0,01% (w/v) Biotin, 50% (v/v) Ethanol

dNTP-Mix (10 mM): jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, in H₂O

Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, pH 12-13

DNA-Ladepuffer: 20 mM EDTA, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 60% (w/v) Saccharose

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml EtBr in H₂O

MOPS-Puffer (10x): 200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7,0

Neutralisierungspuffer: 2 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 5,5

Protoplastenpuffer (PPP): 13 mM Na₂HPO₄, 45 mM KH₂PO₄, 600 mM KCl, pH 6,0

Sc-Lysepuffer: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA

Sm-Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% SDS

SSPE (20x): 3,6 M NaCl, 200 mM Natriumphosphat, 20 mM EDTA, pH 7,4

TBE (10x): 1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3

TE(D)(10x): 100 mM Tris, 10 mM EDTA

TE(H): 50 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8,0

Transformationspuffer (TPS): 1 M Sorbit, 80 mM CaCl₂, pH 7,4

Westergaardt's (5x): 0,5% (w/v) KNO₃, 0,5% (w/v) KH₂PO₄, 0,25% MgSO₄*7H₂O, 0,05% (w/v) NaCl, 0,05% (w/v) CaCl₂, 0,5 ml Spurenelemente, 0,1% (w/v) Chloroform

3.2. Methoden

Nicht näher ausgeführte, grundlegende molekularbiologische Methoden wurden nach Sambrook, *et al.* (2001) durchgeführt.

3.2.1. Kulturbedingungen

Escherichia coli

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte bei 37°C auf LB-Festmedium oder in LB-Schüttelkulturen bei 200 rpm.

Saccharomyces cerevisiae

Die Anzucht von *S. cerevisiae*-Kulturen erfolgte bei 30°C auf SD- und YEPD-Festmedium oder in SD- und YEPD-Schüttelkulturen bei 100 rpm.

Sordaria macrospora

Die Anzucht von *S. macrospora*-Kulturen erfolgte bei 24°C auf CMS- und BMM-Festmedium oder in CM-, BMM- und SWG-Flüssigmedium.

Kreuzungsexperimente

S. macrospora Stämme die entweder eine Kreuzungstyp-Gen Deletion oder eine Mutation in der Melanin-Biosynthese (Fus1-1 oder R2) aufwiesen wurden auf entgegengesetzten Seiten einer Petrischale mit BMM-Medium angeimpft. Nach sieben Tagen Inkubation bei 27°C

wurden reife Perithezien aus der Kontaktzone beider Myzelien isoliert. Aus den Perithezien, welche Ascosporen beider Sporenfarbe enthielten (Wt + fus/r2), wurden je 100 Ascosporen isoliert und, nach dem Auskeimen, auf Selektionsmedium mit Hygromycin B überführt. Die so erhaltenen Nachkommen wurden bezüglich ihrer phänotypischen Charakteristika (Sporenfarbe, Resistenz) untersucht und nach dem Protokoll von Lee, *et al.* (2008) analysiert. Kreuzungen zwischen zwei verschiedenen Kreuzungstyp-Mutanten wurden entsprechend durchgeführt, wobei eine Mutante zusätzlich zur Gendeletion eine Farbspormutation (fus/r2) trug.

3.2.2. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Escherichia coli

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde eine *E. coli*-Kultur in LB-Flüssigmedium unter Zugabe von Tetrazyklin (12,5 µg/ml) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 angezogen und dann mehrfach mit A. dest und 10%igem Glycerin gewaschen. Aliquots von jeweils 40 µl wurden bei -80°C gelagert.

Die Transformation der elektrokompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation nach Vorschrift von Dower, *et al.* (1988) mit dem „Electroporator 2510“ (Eppendorf) bei einer Spannung von 2,5 V. Die transformierten Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Festmedium ausplattiert, welches zur Selektion Ampicillin enthielt.

Saccharomyces cerevisiae

Für die Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde eine *S. cerevisiae*-Kultur in YEPD-Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 angezogen. Die Zellen wurden dann bei 5000 rpm pelletiert und in Lithiumacetat und TE(D) aufgenommen. Nach Inkubation mit DTT bei 100 rpm über eine Stunde wurden die Zellen mehrfach mit A. dest und Sorbitol gewaschen und zu 40 µl aliquotiert. Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden mit 100 ng Plasmid-DNA nach Vorschrift von Becker und Lundblad (2001) mit dem „Electroporator 2510“ (Eppendorf) bei einer Spannung von 1,5 V transformiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 M Sorbitol aufgenommen und auf SD-Selektionsmedium ausplattiert.

Sordaria macrospora

Zur Vorbereitung der Transformation wurde eine *S. macrospora*-Kultur nach der Vorschrift von Skatrud, *et al.* (1987) protoplastiert. Dazu wurde die Kultur über drei Tage in CM-Flüssigmedium angezogen, das Myzel geerntet und mit PPP gewaschen. Die Protoplastierung erfolgte bei 90-120 minütiger Inkubation des Myzels bei 27°C und 100 rpm in Glucanex-Lösung (0,02 g/ml in PPP). Die erhaltenen Protoplasten wurden mehrfach mit PPP gewaschen und ein Titer von 2×10^8 Zellen/ml in TPS eingestellt. Die Transformation erfolgte verändert nach Skatrud, *et al.* (1987). Dazu wurden 120 µl Protoplasten-Suspension mit 20 µg der zu transformierenden DNA in PEG 6000-Lösung (25% in TPS) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zur Regeneration auf CMS-Festmedium ausplattiert. Zur Selektion der Transformanten wurde das CMS-Festmedium nach ca. acht Stunden mit Hygromycin-Topagar (0,8 M NaCl, 0,8% (w/v) Agar und 500 µg/ml Hygromycin B) überschichtet. Nach mehrtägiger Inkubation wurden die Transformanten auf BMM-Festmedium mit Hygromycin B bei 27°C überführt.

3.2.3. Präparation von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mittels Mini- oder Midi-Präparation aus *E. coli*-Zellen isoliert. Mini-Präparationen erfolgten nach modifizierter Vorschrift von Birnboim und Doly (1979) oder mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit[®] (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers. Midi-Präparationen wurden mittels QIAGEN HiSpeed MidiPrep Kit[®] nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurde eine einzelne Kolonie über Nacht in 10 ml SD-Kultur angezogen. Die Aufarbeitung erfolgte mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit[®] (Qiagen, Hilden). Aus der angezogenen Kultur wurden 2 ml geerntet. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer A1 aufgenommen und mit 250 µl Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm, säurebehandelt) 5 min unter ständigem Schütteln resuspendiert. Danach wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Alternativ wurde die Plasmid-DNA mittels Phenol-Chloroform Fällung aufgearbeitet (Hoffman, 2001). Die 10 ml Kultur wurde für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 1 ml A. dest gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden 200 µl Sc-Lysepuffer, 200 µl Phenol/Chloroform und 0,3 g Glasperlen (0,25-0,5 mm) hinzugegeben und der Ansatz für 8 min bei 8°C und 1400 rpm geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min wurde die obere Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und getrocknet. Das entstandene Pellet wurde in 30 µl A. dest aufgenommen.

Isolierung von Gesamt-Nukleinsäuren aus *S. macrospora*

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus *S. macrospora* Myzel erfolgte verändert nach Lecellier und Silar (1994). Nach Anzucht in CM- oder BMM-Medium in Petrischalen wurde das Myzel geerntet und mit Sm-Lysepuffer versetzt. Nach Zugabe einer Metallkugel (ca. 1 mm) wurden die Zellen im TissueLyser (Qiagen, Hilden) aufgebrochen. Die Extraktion erfolgte mittels Phenol und Chloroform und anschließender Fällung mit Isopropanol. Das erhaltene DNA-Pellet wurde getrocknet und in A. dest aufgenommen.

Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden).

Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde dem entsprechenden Probenvolumen 1/10 Teil Natriumacetat (3M, pH 7) zugegeben. Nach Zugabe des dreifachen Volumens Ethanol absolut wurde die Probe bei -80°C für 10 min oder bei -20°C ü.N. inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde das entstandene Pellet mit 0,5 ml Ethanol (70%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) wurde das Pellet getrocknet und in A. dest aufgenommen.

Mikrodialyse wässriger DNA-Lösungen

Die Entfernung von Salzen aus wässrigen DNA-Lösungen erfolgte über Mikrodialyse. Dazu wurden Mikrodialysefilter (0,02 µm Porengröße, Millipore) auf die Wasseroberfläche einer mit A. dest gefüllten Petrischale gelegt und die Probe für 15 bis 30 min auf den Filter gegeben.

Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. macrospora*

Gesamt-RNA aus *S. macrospora* wurde nach einem veränderten Protokoll von Yarden, *et al.* (1992) durchgeführt (Nowrousian, *et al.*, 2005). Das Myzel von *S. macrospora*-Stämmen wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert bis es eine pulverförmige Konsistenz aufwies. Anschließend wurde der Extrakt mit RNA-Lysepuffer versetzt und von den Proteinen und übrigen Zellbestandteilen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion getrennt. Die Fällung erfolgte mit Hilfe von Natriumacetat (analog zu 3.2.3) bei -20°C. Die erhaltenen Gesamt-Nukleinsäuren wurden dann mit Desoxyribonuklease I (Fermentas, St.-Leon-Rot) nach Herstellerangaben behandelt um Gesamt-RNA zu erhalten.

Die poly(A)RNA wurde mittels des polyATtract mRNA Isolation System (Promega) nach Herstellerangaben isoliert.

3.2.4. Modifizierung von Nukleinsäuren

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) ermöglicht es ausgehend von einer Matrizen-DNA eine Vielzahl identischer Kopien anzufertigen. Der verwendete Standard-PCR-Ansatz mit dem HotStarTaq[®] MasterMix Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) zusammengestellt und enthielt Matrizen-DNA, Starteroligonukleotide und Polymerase Mastermix. Das Standard-PCR-Programm bestand aus einer Denaturierungsphase (10 min; 98°C), welche die Reaktion einleitete, der ein sich 40x wiederholender Zyklus aus Denaturierungsphase (1,5 min; 98°C), Hybridisierungsphase (1,5 min; spezifische Hybridisierungstemperatur) und Elongationsphase (1,5-3 min; 72°C) folgte. Amplifizierungen mittels MolTaq (Molzym, Bremen) wurden ebenfalls gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Alle Amplifikationen erfolgten im „i-Cycler“ der Firma Biorad (München).

Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase (RT) ist eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche einen komplementären DNA-Strang zu einer RNA-Matrize synthetisiert („complementary DNA, cDNA“). Die cDNA wurde mittels des Transcription High Fidelity cDNA Synthesis Kit[®] (Roche, Mannheim) aus 2 µg Gesamt-RNA oder mittels SuperScript II (Invitrogen, Darmstadt) aus poly(A)-RNA nach Herstellerangaben hergestellt.

real-Time-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR („quantitative real-Time-PCR, qRT-PCR“) ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, welche auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht (s. „Polymerasekettenreaktion“). Durch die Messung von

Material und Methoden

Signalen fluoreszierender, DNA-interkalierender Substanzen (z.B. SYBRGreen) kann die Menge entstandener DNA nach jedem Vervielfältigungszyklus gemessen werden. Wird cDNA (s. „Reverse Transkription“) als Matrize eingesetzt kann durch den Vergleich mit einem Standard die Menge an mRNA in verschiedenen Proben im Vergleich zueinander ermittelt werden.

Für die quantitative real-Time-PCR wurde das qPCR Master Mix for SYBRGreen Kit (Eurogentec, Köln) nach Angaben des Herstellers im MasterCycler realplex² (Eppendorf, Hamburg) benutzt.

Hydrolyse von Nukleinsäuren

DNA wurde gezielt mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen des Typs II hydrolysiert. Dazu wurden Ansätze mit einem Volumen von 10-30 µl hergestellt, wobei jeweils etwa 1 U Enzym pro µg der zu hydrolysierenden DNA eingesetzt wurde. Die Reaktion erfolgte in einer Inkubationszeit von ca. 90 min bei 37° C im vom Hersteller (Fermentas, St.-Leon-Rot) angegebenen Puffersystem.

Dephosphorylierung

Bei ungerichteten Ligationen zwischen einem Vektor und einem DNA-Fragment, welche mit einer einzelnen Restriktionsendonuklease hydrolysiert wurden, wurde die Vektor-DNA zuvor dephosphoryliert um eine Selbstligation (Ringschluss ohne Insert) zu verhindern. Die Calf-Intestine Alkaline Phosphatase wurde dabei nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St.-Leon-Rot) genutzt.

Ligation

Mit Hilfe der T4-Ligase aus phageninfizierten *E. coli*-Zellen können Phosphodiesterbindungen zwischen der 5'-Phosphatgruppe eines DNA-Fragmentes und der 3'-Hydroxylgruppe eines anderen Fragmentes ausgebildet werden. Als Co-Faktor benötigt diese Ligase ATP, was unter Zugabe von T4-Ligase-Puffer dargereicht wurde. Das molare Verhältnis zwischen Plasmid-DNA und einzuklonierendem Fragment betrug in der Regel 1:7. Die Ligation erfolgte bei 14°C ü. N. oder für mindestens 3 Std. bei RT. Ligationen, die mit Hilfe des Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt wurden, erfolgten gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

Starteroligonukleotidsynthese

Die Neusynthese von Starteroligonukleotiden erfolgte als Auftragsarbeit der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden vom Göttinger-Genomics-Laboratory, Georg-August-Universität Göttingen, durchgeführt.

3.2.5. Erstellung rekombinanter Plasmide mittels homologer Rekombination

Neben konventionellen Ligations-Strategien wurde zur Herstellung rekombinanter Plasmide auch die homologe Rekombination in *S. cerevisiae* genutzt wie von Colot, *et al.* (2006) beschrieben. Dabei können auch mehrere Fragmente gerichtet in einen Vektor eingebracht werden. In einer PCR werden an die Fragmente 29 bp lange Sequenzen fusioniert, welche homolog zum Vektor oder zu den anderen Fragmenten sind. Die Fragmente und der linearisierte Vektor pRS426 (*EcoRI* + *XhoI*) oder pRSnat (*XhoI*) (Tab. 2) wurden in den Hefestamm PJ69-4a transformiert, wo es zur homologen Rekombination kam. Die entstandenen rekombinanten Plasmide wurden dann aus der Hefe aufgearbeitet und verwendet.

3.2.6. Gelelektrophorese

DNA

DNA-Fragmente wurden in 1%igen 1x-TBE-Agarosegelen in horizontalen Elektrophorese-Apparaturen (Mupid) bei einer elektrischen Spannung von 5-15 V/cm aufgetrennt (Sambrook, *et al.* 2001). Als Elektrophoresepuffer diente 0,5X TBE-Puffer. Als Größenstandard wurde Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, St.-Leon-Rot) verwendet. Die DNA wurde nach 10 bis 20 minütiger Inkubation in Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

RNA

Für die Auftrennung von RNA wurden 1,2%ige 1x MOPS-Agarosegele mit 5% (v/v) Formaldehyd verwendet. RNA-Proben wurden mit RNA-Ladepuffer versetzt, bei 65°C für 15 min inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromspannung von 100 V. RNA-Gele wurden vor der Inkubation in Ethidiumbromid 20 min in RNase-freiem A. dest inkubiert.

3.2.7. Blotverfahren und nicht-radioaktiver Nachweis von Nukleinsäuren

Herstellung nicht-radioaktiv markierter Nukleinsäuren

Zur Herstellung nicht-radioaktiv markierter DNA-Sonden wurde das DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit von Roche (Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers benutzt. Die DNA-Sonden wurden dabei mittels „random-primed oligo-labeling“ mit DIG-11-dUTP markiert.

Southern Hybridisierung

Durch das Blotverfahren können mittels Agarose-Gel aufgetrennte DNA-Fragmente durch Kapillarkraft auf eine GeneScreen Hybridization Transfer Membrane (PerkinElmer Lifesciences, Jügesheim) übertragen werden (Sambrook, *et al.*, 2001; Southern, 1975). Der Transfer wurde bei RT ü.N. durchgeführt. Die Nukleinsäuren wurden danach auf der Membran mittels UV-Licht im „BioLink BLX®“ (Biometra, Göttingen) quervernetzt. Stringente Waschungen und Hybridisierung mit nicht-radioaktiv markierten Sonden erfolgte mittels DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Exposition erfolgte abschließend auf Röntgenfilme (Fuji X-RayMedical RX) für 1-2 Stunden.

3.2.8. Microarray Hybridisierung

In dieser Studie wurden *N. crassa* Microarrays mit 10.910 70-mer Oligonukleotiden verwendet (Tian, *et al.*, 2007). Microarray Proben von *S. macrospora* cDNA wurde durch Reverse Transkription von poly(A)-RNA (s. 3.2.4) in der Anwesenheit von Aminoallyl dUTPs (Sigma-Aldrich, München) durch SuperScript II (Invitrogen, Darmstadt) hergestellt.

Die cDNA wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa555 und Alexa 647 (beide Invitrogen, Darmstadt) markiert und anschließend mit dem Illustra Cyscribe GFX Purification Kit (Amersham/GE Healthcare, München) gereinigt. Die Hybridisierung wurde durchgeführt wie in Klix, *et al.* (2010) beschrieben.

Die erhaltenen Daten wurden mit MS Excel (Microsoft, Unterschleißheim), Bioconductor (Gentleman, *et al.*, 2004) und dem MultiExperimentViewer (MeV) (Saeed, *et al.*, 2003) analysiert. Die statistischen Analysen wurden innerhalb der Software-Umgebung „R“ (Version 2.7.2) unter Verwendung des „Linear Model for Microarray“ (Smyth, 2004) durchgeführt. Die Daten wurden normalisiert und skaliert wie in Klix, *et al.* (2010) beschrieben. Gene wurden als unterschiedlich reguliert angesehen wenn sie eine \log_2 Verhältnis >1 oder <1 aufwiesen und einen *P*-Wert (Wahrscheinlichkeitswert) von $<0,05$.

Details zur experimentellen Durchführung, Rohdaten und Ergebnisse der statistischen Untersuchung wurden in der öffentlichen Datenbank „ArrayExpress“ (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) unter der Accession-Nummer E-MEXP-2600 hinterlegt.

3.2.9. Hefe-Zwei-Hybrid Analyse

Das Hefe-Zwei-Hybrid System („Yeast-Two-Hybrid“, Y2H) dient dazu Protein-Protein-Interaktionen in einem heterologen System zu untersuchen. Die zu untersuchenden Proteine werden dafür mit der DNA-Bindedomäne (BD) bzw. der Aktivierungsdomäne (AD) des Transkriptionsfaktors GAL4 aus Hefe fusioniert. Bei einer Interaktion der beiden Proteine kommen GAL4-AD und GAL4-BD in räumliche Nähe. Gene, welche unter der Kontrolle eines GAL4-induzierbaren Promotors stehen können dadurch exprimiert werden. Es können hierbei verschiedene Reportergene genutzt werden um eine Protein-Protein-Interaktion indirekt phänotypisch sichtbar zu machen.

Für die Y2H Analyse wurde das MatchMaker™ Gold (ClonTech, Saint-Germain-en-Laye, F) benutzt. Der Stamm Y187 (s. 3.1.1) trug dabei das Plasmid pGB-A2 (Tab. 1, „bait“), der Stamm AH109 eine *S. macrospora* cDNA-Bank kloniert in pGAD17 (Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik, Bochum, pers. Mitteilung, „prey“). Die beiden Stämme wurden in 2x YPDA-Medium bei 30°C für 24 Std. gekreuzt. Diploide Stämme welche beide Plasmide beinhalten wurden auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan selektioniert. Selektion auf eine Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf SD-Medium ohne Histidin, Adenin, Leucin und Tryptophan. Die Plasmid-DNA wurde danach aus der Hefe aufgearbeitet und in *E. coli* transformiert (s. 3.2.2 und 3.2.3). Durch die unterschiedlichen Resistenzmarken der Plasmide pGBKT7 und pGADT7 (Tab. 2) konnte in *E. coli* gezielt auf „prey“-Plasmide selektioniert werden. Diese wurden dann weiter aufgearbeitet und sequenziert.

3.2.10. Mikroskopie

Für alle mikroskopischen Untersuchungen wurde das AxioImager M1 Mikroskop (Zeiss, Jena) verwendet. Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde als Lichtquelle das X-Cite® 120PC (EXFO UK, Chandlers Ford, GB) benutzt. Proben von *S. macrospora* wurden

auf Objektträgern mit einer dünnen Schicht BMM- oder SWG-Medium bei 24°C inkubiert. *S. cerevisiae* wurde in YEPD oder SD-Selektionsmedium angezogen und 5 µl dieser Lösung auf Objektträger aufgebracht. Die Bilder wurden aufgenommen mit einer Photometrics CoolSNAP HQ² Kamera (Roper Scientific, Photometrics, Tucson, USA) und bearbeitet mit MetaMorph (Visitron System GmbH, Puchheim) und Adobe Photoshop CS2.

3.2.11. Bilder

Makroskopische Aufnahmen wurden mit der Powershot (Canon, Krefeld) aufgenommen. Bilder wurden mit dem Programm Adobe Photoshop CS2 bearbeitet.

3.2.12. Analyse von Pheromon-Rezeptor-Interaktionen

Hemmhof-Tests in *S. cerevisiae* mit heterolog exprimierten Pheromon-Rezeptoren aus *S. macrospora* und *P. chrysogenum* wurden wie von Mayrhofer und Pöggeler (2005) beschrieben durchgeführt. Dabei wurde der Stamm YDB103 mit den Plasmiden pPGK, pPGK-PcPRE2 und pPGK-SmPRE2 (Tab. 2) und BY4741 als Kontrolle verwendet. Künstliche Pheromone PcPPG1 (*P. chrysogenum*) und SmPPG1 (*S. macrospora*) wurden in einer Konzentration von 3 nmol auf Cellulose-Filterplättchen von 6 mm Durchmesser (Sartorius Stedim GmbH, Göttingen; #1291) aufgetragen. Als Kontrolle wurde künstlicher α -Faktor (*S. cerevisiae*) in einer Konzentration von 3 nmol verwendet.

Shmoo-Bildung wurde untersucht wie von Sprague (1991) beschrieben. Die Hefe-Stämme YDB103-pPGK-PcPRE2, YDB103-pPGK-SmPRE2 und BY4741 wurden bis zu einer Dichte von 5×10^6 bis 10^7 Zellen/ml in YEPD-Medium inkubiert und mit künstlichem Pheromon in einer Konzentration von 5 µM behandelt. Proben wurden nach 0h, 2h und 4h mikroskopisch untersucht.

3.2.13. Sicherheitsmaßnahmen

Gentechnische Experimente der Sicherheitsstufe 1 wurden gemäß den Richtlinien des Gentechnikgesetzes (GenTG) vom 16.12.1993 (zuletzt geändert durch das Zweite Gesetz zur Änderung des GenTG vom 16.08.2002) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung der *MATI-1*-Kreuzungstyp-Gene in *S. macrospora*

4.1.1. Herstellung der *MATI-1* Deletionsmutanten

Zur Untersuchung der Rolle der *MATI-1*-spezifischen Kreuzungstyp-Gene in *S. macrospora* wurden Deletionsmutanten der drei Kreuzungstyp-Gene (Δ SmtA-1, Δ SmtA-2 und Δ SmtA-3) erstellt. Da in dem nahe verwandten *N. crassa* eine Doppeldeletion der Gene *MATI-1-2/MATI-1-3* reduzierte Fertilität verglichen mit den Einzelmantanten zeigt (Ferreira, *et al.*, 1998), wurde außerdem die Doppelmutante Δ SmtA-2/3 in *S. macrospora* hergestellt.

Die Deletionsplasmide pRS- Δ A1, pRS- Δ A2, pRS- Δ A3 und pRS- Δ A2/3 (Tab. 2) wurden wie unter Material und Methoden 3.2.5 beschrieben erstellt. Die 5' und 3' Region der zu deletierenden Gene wurden mit den entsprechenden Primern 5f/5r und 3f/3r amplifiziert. Die entstandenen Fragmente wiesen nun homologe Überhänge zu dem Vektor pRS426 (Tab. 2) und der ebenfalls amplifizierten *hph*-Kassette auf. Nach der homologen Rekombination in Hefe wurden die Plasmide aufgearbeitet und das Deletionskonstrukt mittels den Primern 5f/3r amplifiziert und in den *S. macrospora* Stamm Δ ku70 (Tab. 1) transformiert, welcher einen Defekt im DNA-Reparaturmechanismus aufweist und besonders geeignet für gezielte DNA Modifikationen über homologe Rekombination ist (Pöggeler und Kück, 2006). Für die Δ SmtA-2/3 Doppeldeletion wurden dabei die 5'-Region des *SmtA-3* Gens und die 3'-Region des *SmtA-2* Gens verwendet, so dass beide Gene durch eine *hph*-Kassette ersetzt wurden.

Die entstandenen Transformanten wurden auf Hygromycin B (Hyg) oder Nourseothricin (Nat) selektioniert und mit den Farbspormutanten Fus1-1 oder R2 (Tab. 1) gekreuzt, da Transformanten in Pilzen häufig heterokaryotisch sind und transformierte sowie nicht-transformierte Kerne tragen. Einzelsporisolate dieser Kreuzungen wurden angefertigt und erneut auf Hyg und Nat selektioniert. Durch konventionelle genetische Verfahren war es außerdem möglich, Hygromycin-resistente Sporen ohne Δ ku70-Hintergrund (Nat-Resistenz) zu isolieren. Damit konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass der *MAT*-Locus genetisch nicht mit *ku70* gekoppelt ist und keines der *MATI-1* Gene essentiell ist. Die erhaltenen Einzelsporisolate der Deletionsmutanten wurden dann mittels PCR-Analyse und Southern Hybridisierung verifiziert (Abb. 6).

Ergebnisse

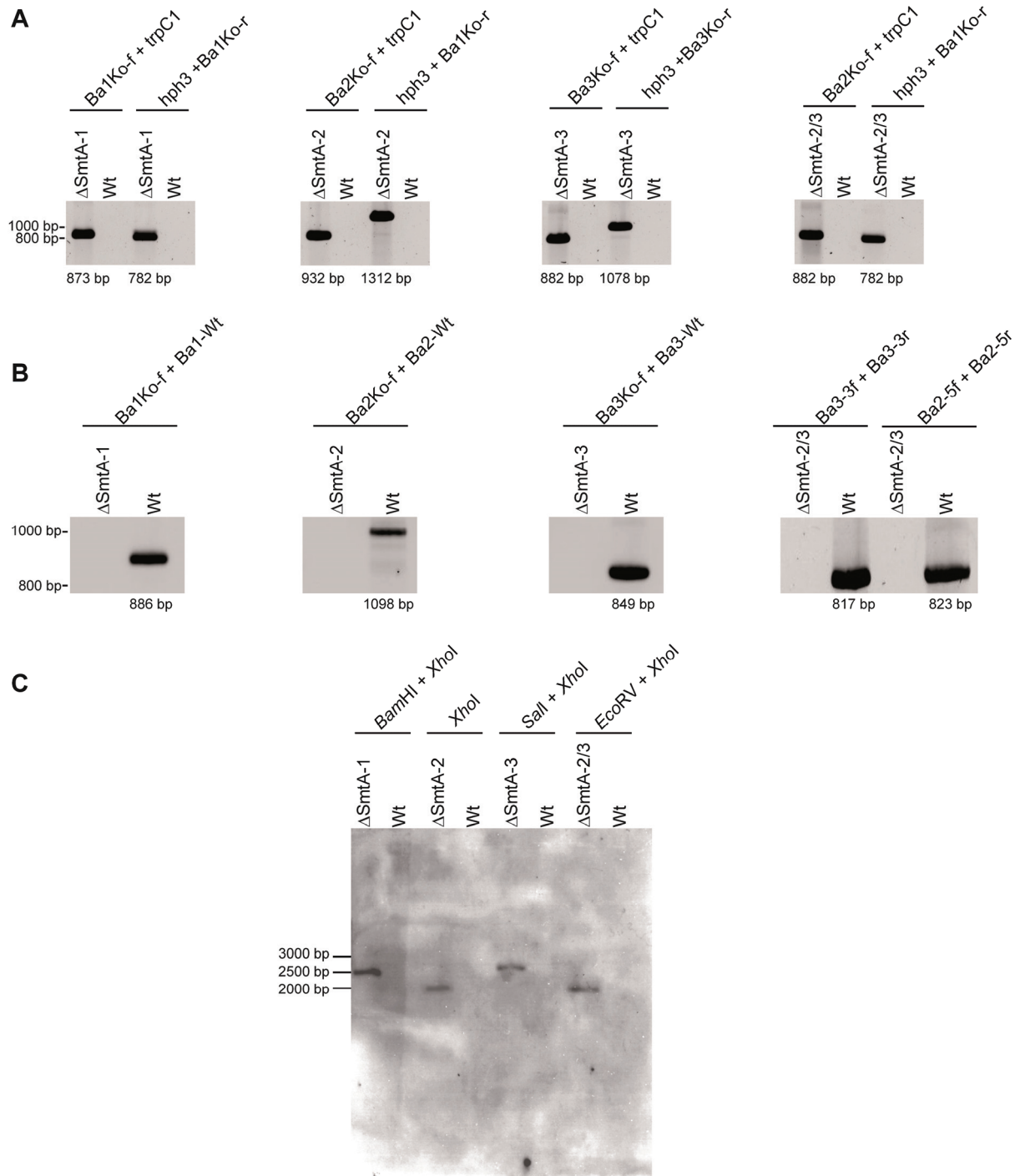


Abbildung 7: (A) PCR Analyse der homologen Rekombination in den Deletionsstämmen Δ SmtA-1, Δ SmtA-2, Δ SmtA-3 und der Doppeldeletion Δ SmtA-2/3. Oligostarternukleotide wie in Tab. 3 aufgeführt wurden zur Verifizierung der homologen Rekombination am Ziel-Locus benutzt. (B) Zusätzlich wurde eine PCR Analyse durchgeführt um ein Vorhandensein von Wildtyp-Kopien des Gens auszuschließen. (C) Southern Hybridisierung der verschiedenen Deletionsstämmes und Wt mit einer *hph* Sonde.

Die untersuchten und verifizierten Deletionsmutanten wurden in den weiteren Studien als Δ SmtA-1, Δ SmtA-2, Δ SmtA-3 und Δ SmtA-2/3 (Tab. 1) zur Analyse genutzt.

4.1.2. Phänotypische Untersuchung der Deletionsmutanten

Die verifizierten Deletionsmutanten wurden bezüglich ihrer sexuellen und vegetativen Entwicklung im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Weder die Einzeldelentionsstämme noch der Doppeldelentionsstamm zeigten eine Veränderung in der vegetativen Morphologie des Myzels, der Wachstumsrate (durchschn. 1,5 cm/Tag auf BMM bei 27°C) oder Trockengewicht (durchschn. 3,5 g nach 5 Tagen Wachstum auf BMM, 27°C).

Die Entwicklung sexueller Strukturen in den verschiedenen Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde auf SWG-Medium analysiert. Alle Stämme zeigten nach drei Tagen die Bildung von Ascogonien, welche sich nach fünf Tagen zu jungen Protoperithezien weiterentwickelt hatten (Abb. 8).

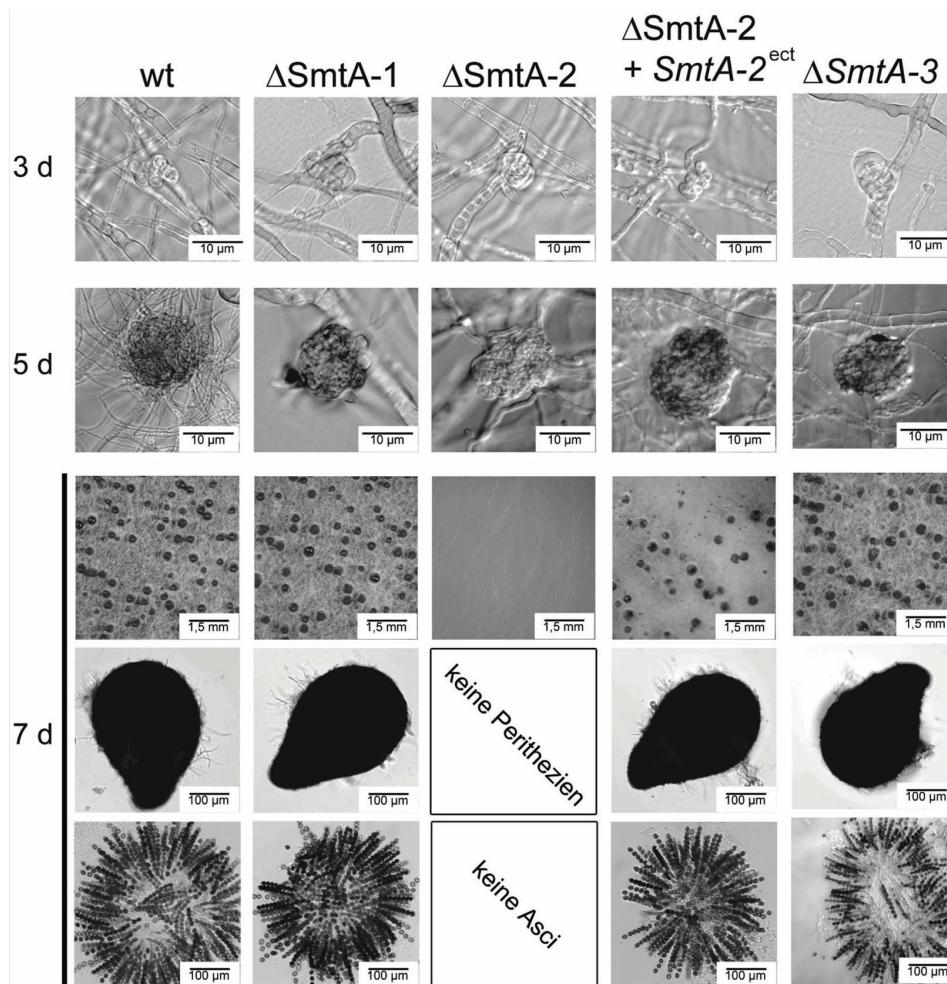


Abbildung 8: Mikroskopische Untersuchung der sexuellen Entwicklungsstadien von Wt und den Deletionsmutanten Δ SmtA-1, Δ SmtA-2 und Δ SmtA-3. Zu beachten ist, dass keinerlei reife Perithezien oder Asci in Δ SmtA-2 gefunden werden konnten. Die Mutante Δ SmtA-2 mit einer ektopisch integrierten Kopie von *SmtA-2* zeigt dagegen Wildtyp-Phänotyp.

Alle Stämme wurden bei 27°C auf SWG angezogen und Bilder der Ascogonien, Protoperithezien und Perithezien und Asci (außer Δ SmtA-2) wurden nach 3, 5 und 7 Tagen Wachstum aufgenommen.

Ergebnisse

Die Mutanten Δ SmtA-1 und Δ SmtA-3, ebenso wie der Wildtyp, produzierten reife Perithezien mit 100-150 Asci mit reifen, keimfähigen Ascosporen nach 7 Tagen Entwicklung. In der Deletionsmutante Δ SmtA-2 dagegen konnten selbst nach verlängerter Wachstumszeit weder reife Perithezien noch Ascosporen beobachtet werden.

Die Δ SmtA-2/3 Doppelmutante zeigte den gleichen Phänotyp wie Δ SmtA-2 (Abb. 9). Die Mutante ist steril und nicht in der Lage, reife Perithezien oder Ascosporen zu bilden.

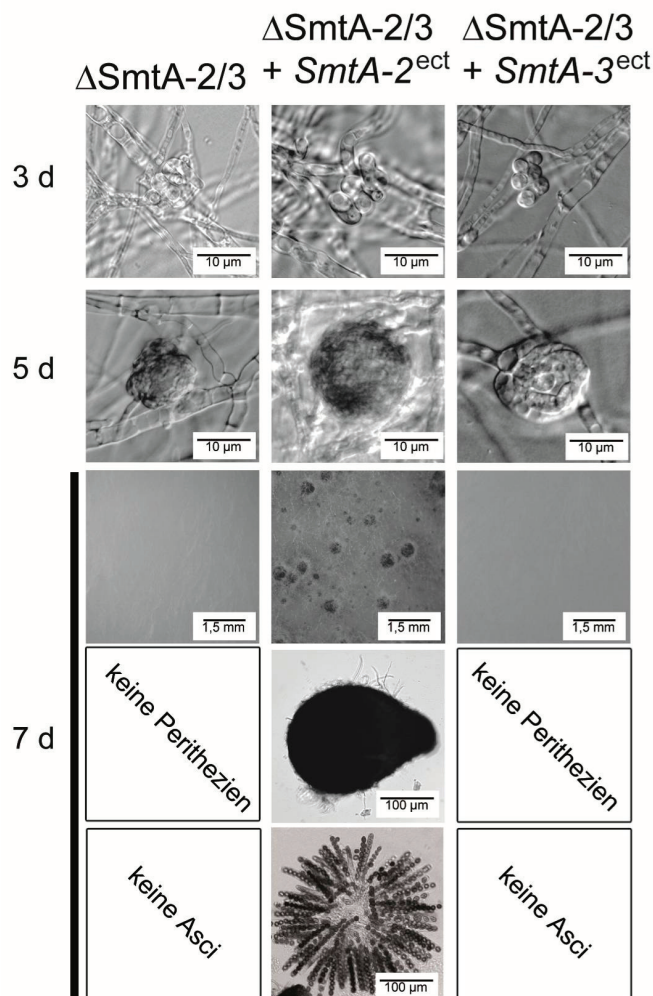


Abbildung 9: Mikroskopische Untersuchung der sexuellen Entwicklungsstadien von Wt und der Doppeldeletionsmutante Δ SmtA-2/3. Zu beachten ist, dass keinerlei reife Perithezien oder Asci in Δ SmtA-2/3 gefunden werden konnten. Die Mutante Δ SmtA-2/3 mit einer ektopisch integrierten Kopie von *SmtA-2* zeigt fertilen Wildtyp-Phänotyp, während Δ SmtA-2/3::*SmtA-3*^{ect} steril ist.

Alle Stämme wurden bei 27°C auf SWG angezogen und Bilder der Ascogonien, Protoperithezien und Perithezien und Asci (außer Δ SmtA-2/3) wurden nach 3, 5 und 7 Tagen Wachstum aufgenommen.

Komplementationsanalysen mit Δ SmtA-2 und Δ SmtA-2/3 wurden mit den Plasmiden pRS-Ba2 und pRS-Ba3 durchgeführt, welche die Gene *SmtA-2* bzw. *SmtA-3* unter der Kontrolle ihrer jeweiligen 5' und 3' regulierenden Elemente tragen. Da beide Plasmide keine eigene Resistenzmarke für *S. macrospora* tragen, wurde eine Kotransformation mit dem Plasmid pRSnat (Nat-Resistenz) durchgeführt. Für die Einzeldelation Δ SmtA-2 konnte

gezeigt werden, dass der Phänotyp durch eine ektopisch integrierte Kopie von *SmtA-2* komplementiert werden konnte. $\Delta SmtA-2::SmtA-2^{ect}$ ist fertil und besitzt einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp (Abb. 8). Das Gleiche gilt für die Doppeldeletion $\Delta SmtA-2/3$. Durch die ektopische Integration von *SmtA-2* ist die Mutante wieder vollständig fertil, während sich bei Integration von *SmtA-3* keine Änderung ergibt (Abb. 9). $\Delta SmtA-2/3::SmtA-3^{ect}$ ist weiterhin steril und nicht in der Lage reife Ascosporen auszubilden.

Kreuzungen zwischen den verschiedenen Deletionsmutanten und einer selbst-fertilen Farbspormutante (*Fus1-1*) wurden durchgeführt um zu testen ob die fertilen Deletionsstämme ($\Delta SmtA-1$ und $\Delta SmtA-3$) und die sterilen Deletionsstämme ($\Delta SmtA-2$ und $\Delta SmtA-1$) fähig sind mit dem Teststamm zu kreuzen. Alle Kreuzungen zeigten reife Kreuzungs-Perithezium in der Kontaktzone beider Myzelien. Die Anzahl der fertilen Asci pro Perithezium (120-150) war ähnlich zum Wildtyp. Die Perithezium enthielten Asci mit kompletten Tetraden von acht Ascosporen welche in einem 1:1 Muster für die Resistenz gegen Hygromycin B und braune Sporenfarbe segregierten (Tab. 4).

Tabelle 4: Segregation der Selektionsmarken in den Nachkommen aus Kreuzungen zwischen verschiedenen Kreuzungstyp-Gendeletionen und einem selbst-fertilen Teststamm *Fus1-1*, welcher braune Ascosporen produziert.

Anzahl an Nachkommen jedes Phänotyps ¹					
Stamm	Parental		Rekombinant		Gesamt
	HygR/ <i>fus</i> ⁺	HygS/ <i>fus</i> ⁻	HygS/ <i>fus</i> ⁺	HygR/ <i>fus</i> ⁻	
$\Delta SmtA-1$	24	31	28	22	105
$\Delta SmtA-1$	29	17	32	21	99
$\Delta SmtA-2$	16	21	23	15	75
$\Delta SmtA-3$	31	25	23	24	115

¹ Getestet wurde auf die Selektionsmarkern Hygromycin B Resistenz (HygR/HygS für Resistenz/Sensitivität) und Sporenfarbe (*fus*⁺/*fus*⁻ für schwarze/braune Sporen). Das Segregationsmuster der Marken zeigte ein 1:1:1:1 Verhältnis; *P*-Wert <0,015.

In *S. macrospora* wurden bereits verschiedene sterile Mutanten untersucht, welche in der Lage waren miteinander zu kreuzen. Nach Hyphenanastomose enthalten die heterokaryotischen Hyphen jeweils eine funktionelle Kopie des mutierten Gens, was meist ausreichend ist für die Fruchtkörperbildung und -entwicklung. Wie zu erwarten waren die sterilen Kreuzungstyp-Mutanten $\Delta SmtA-2$ und $\Delta SmtA-1$ in der Lage mit den fertilen Mutanten $\Delta SmtA-1$ und $\Delta SmtA-3$ zu kreuzen und keimfähige Ascosporen zu entwickeln. Kreuzungen zwischen beiden sterilen Mutanten $\Delta SmtA-2$ und $\Delta SmtA-1$ bildeten dagegen

weder Perithezien noch Ascosporen aus (Daten nicht gezeigt). Beide Mutanten sind also nicht in der Lage die jeweiligen Defekte zu komplementieren. Es ist dabei unklar ob dies auf einen Defekt in der Hyphenanastomose zurückzuführen ist und sich kein Heterokaryon ausbilden kann, was für eine Komplementation notwendig wäre.

4.1.3. Untersuchung der funktionellen Domäne des *MAT1-1-2* Gens mittels Komplementationsanalyse

Zur Untersuchung putativer funktioneller Domänen in dem MAT1-1-2 Protein aus *S. macrospora* wurde eine Komplementationsanalyse mit den homologen Genen aus *N. crassa* und *P. anserina* in Δ SmtA-2 durchgeführt. Zusätzlich wurden Verkürzungskonstrukte des *SmtA-2* Gens erstellt und in Δ SmtA-2 transformiert (Abb. 10). Die Verkürzungskonstrukte enthielten dabei unterschiedlich viele Aminosäuren der putativen funktionellen PPF-Domäne (Prolin, Prolin, Phenylalanin) (Debuchy, *et al.*, 2010) und unterschiedlich lange Teile der C- oder N-Terminalen Sequenz von der PPF-Domäne aus. Die Plasmide pRS_NcA2 (*N. crassa* MAT1-1-2), pRS_SMR1 (*P. anserina* MAT1-1-2), pRS_A2-188 (SMTA-2 verkürzt bis Aminosäure 188), pRS_A2-199 und pRS_A2-205 und wurden dabei über homologe Rekombination in Hefe erstellt. Das Verkürzungskonstrukt A2-S-N wurde aus dem Vektor pRS-Ba2 durch Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *NcoI* erstellt. Nach der Hydrolyse wurden die entstandenen Überhänge des Plasmids mit „Blunting Mix“ aus dem CloneJet™ Kit von Fermentas (St.-Leon-Rot) behandelt und entfernt. Das so entstandene, lineare Fragment mit stumpfen DNA-Enden wurde zu einem zirkulären Plasmid re-ligiert. Der so entstandene Vektor enthält das *MAT1-1-2* Gen aus *S. macrospora* mit einer Deletion der 5'-Region.

Die Integration der Komplementationskonstrukte wurde mittels PCR überprüft (Anhang A1).

Ergebnisse

A

Sm	-----MELINTQRTSGQKQDLEVMVYKKLHQLQARLSRSHLSEAIKEFEENL	47
Nc	MNLLNMQPKRSEQPAMFEENRASSQEGQDLEVMVYKKLHQLQARLSRSHLSEAIKENEENL	60
Pa	-----MDHRDLSQVTLLMESTLIRTAIRTDIQQFEKSF	33
Sm	QCLFHEAKILLCTKRTKYRQSWFGSSNEFGPNNEEKI IKAACCVIESTNMI LNFLSFLEK	107
Nc	RCLFHEAKLLLCSTRTKYRQSWFGSSNEFGSSDERRI IKTSCCIIESTNTI LNFLSFLEK	120
Pa	EQIIEQAGVFLATITEEHFIS-----LSLVVMDLVDLIRHLGFLASKLAI EGFELSFHQQ	87
Sm	KRGLPSSGGDQRLQQAAYKQQFATRLLRSLTIHKDAQEI PGKEFGLVCGKEVHVI GGHVV	167
Nc	NRGLPFGGDQRLQQAAYKQQFAFRLLRSLTLHKAAQEV PGKDFGLVYKGDVYVLNGHIL	180
Pa	TIQRTSSGGDASLAKQVKAATVEVLELIQTLIYHKEAADY PGKHLGMMYDRDMKYFGTFL	147
Sm	RRSKRDVVGQAG-----GVNWHVDHTHHPLRRVPGTPWHKFFGNVEVEPNKP	214
Nc	HRSKQEI VGOAG-----GRNWHVDHTLHPLRRVPGTPWHKFFGNLEVGDDKQ	227
Pa	HLNPQVNLDEELPELDDYEDVDDEL TNYHGEKLSHPLRQLPGNPWHKFFG--NFPETRV	205
Sm	LHLFGDFTSPKSDRNGHRKFPV IIPETAMFIQDEI SSEHQQVATIHTENEHAQPPAL TPI	274
Nc	LRLFDDDAAVDSYRVGPQKFFVVI PETAEFYFGRSQQHQRVATIHTENGHVQPPAP TSI	287
Pa	EHAADTALFRENPRPG--DLTVSIPGTTLELIP EFRQEHKFRQLMLEHSQPLPL LLEE	263
Sm	EODDR LKKLDFAMTASSPGYVAEGQPEV VWHGGLREF-VDYSQE--RQFSILSKVFARP	331
Nc	QOEALLRKLDFAMTSSLPGYVVEGQPEIVFHYEGLRQIPVDYSQE--RPLSILSHVFTRP	345
Pa	ARKE RVQVIQRRLANVHGNVEYDSLEPLCRENTDMI PRPEYTL EGNRT EGMQNLTVNSP	323
Sm	ALWGDITLGLADHFDPREGVQOEEHVYHI-----	359
Nc	ALWGEGLLELADHFDPRDGVQOEEHIYYI-----	373
Pa	DLIGDALPEGRIANVASQLEGFPARFLFTNKNK	356

B

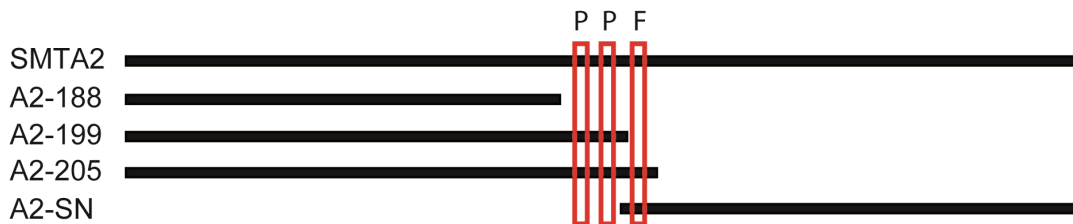


Abbildung 10: Schematische Darstellung der zur Komplementationsanalyse verwendeten Konstrukte. (A) Gegenüberstellung der Sequenzen des MAT1-1-2 Proteins aus *S. macrospora* (Sm), *N. crassa* (Nc) und *P. anserina* (Pa). Gleiche Sequenzabschnitte zwischen Sm und Nc sind hellgrau, die zwischen allen dreien dunkelgrau hinterlegt. Gleiche Sequenzabschnitte zwischen Sm und Pa sind in schwarzen Kästchen angezeigt. (B) Schematische Darstellung der verschiedenen Verkürzungskonstrukte von SMTA-2. Die Zahlen geben an, bis zu welcher Aminosäure die native Sequenz des SMTA-2 Proteins intakt ist. Bei S-N handelt es sich um eine Deletion im 5' Bereich des Gens. Die drei konservierten Aminosäuren der putativen PPF-Domäne sind jeweils rot hervorgehoben.

Nach Transformation der Deletionsmutante Δ SmtA-2 mit den Plasmiden pRS_NcA2 (*N. crassa* MAT1-1-2) und pRS_SMR1 (*P. anserina* MAT1-1-2) zeigte sich auch nach verlängerter Wachstumszeit von 14 Tagen keine Veränderung des sterilen Phänotyps. Als Kontrolle diente das Plasmid pRS_Ba2 mit dem *S. macrospora* Wildtyp-Gen *SmtA-2*. Alle Gene stehen unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren und Terminatoren (Abb. 11).

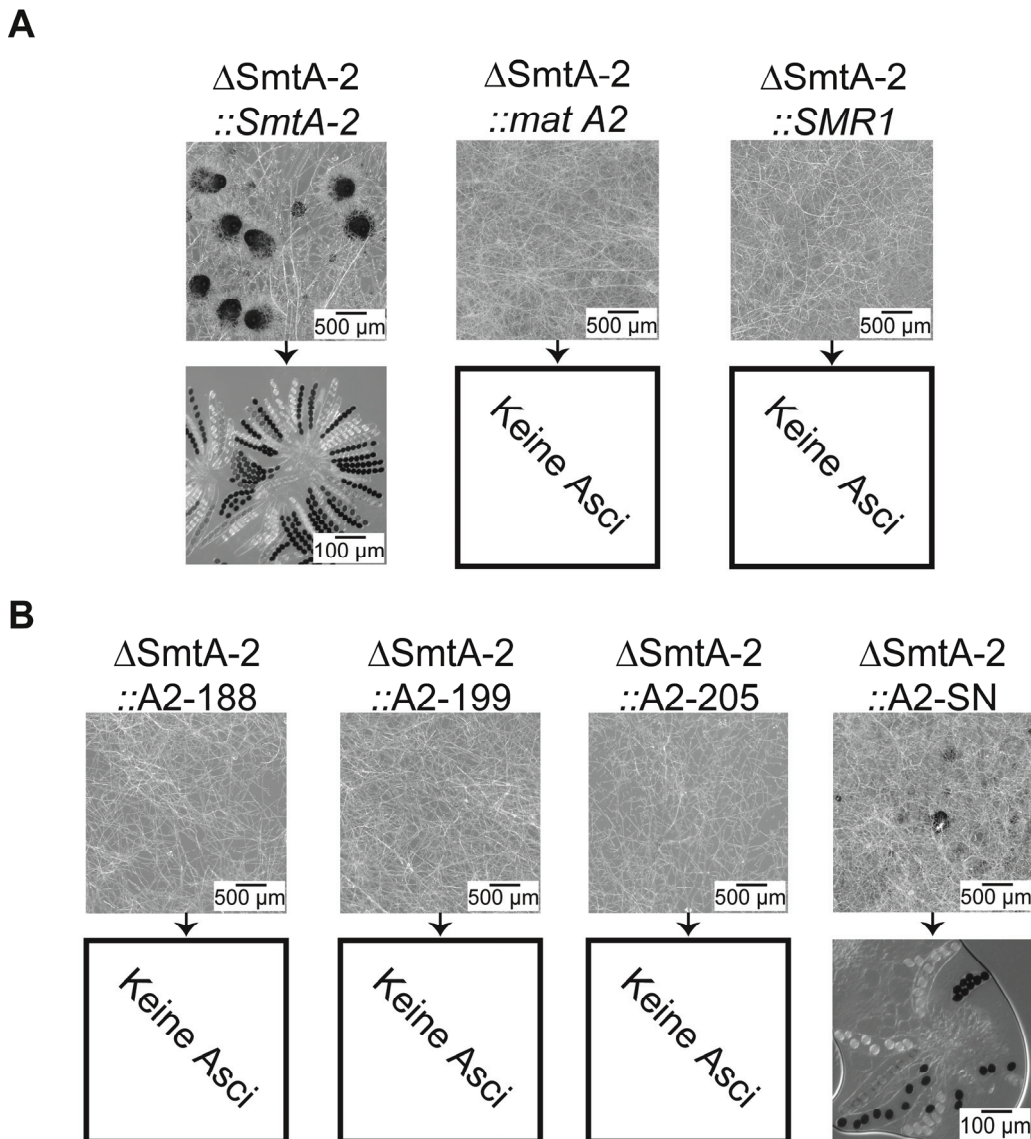


Abbildung 11: Komplementationsstudie der Deletionsmutante Δ SmtA-2 mit verschiedenen MAT1-1-2 Konstrukten. (A) Komplementation mit den MAT1-1-2 Genen aus *S. macrospora* (*SmtA-2*), *N. crassa* (*mat A2*) und *P. anserina* (*SMR1*). (B) Komplementation mit verschiedenen Abschnitten des SMTA-2 Proteins. 188: AS 1-188; 199: AS 1-199; 205: AS 1-205; SN: AS 199-359

Alle Untersuchungen wurden nach einer verlängerten Wachstumszeit von 21 Tagen auf Vollmedium durchgeführt. AS: Aminosäure.

Die homologen MAT1-1-2 Proteine aus *N. crassa* und *P. anserina* sind also nicht in der Lage, die Funktion von SMTA-2 im heterologen System in *S. macrospora* zu übernehmen.

Bei Transformation mit den Verkürzungskonstrukten von *SmtA-2* zeigten die Konstrukte A2-188, A2-199 und A2-205 keine Veränderung des sterilen Phänotyps (Abb. 11). Diese Konstrukte kodieren für den N-Terminus des MAT1-1-2 Proteins aus *S. macrospora* bis zur Aminosäureposition 188 bzw. 199 und 205. Damit werden unterschiedlich viele konservierte Aminosäuren der putativen PPF-Domäne eingeschlossen (Debuchy, *et al.*, 2010) (s. Abb. 10).

Im Gegensatz dazu besitzt das Konstrukt A2-S-N den C-Terminalen Teil des MAT1-1-2 Proteins, angefangen vom konservierten Phenylalanin der PPF-Domäne. Hier zeigte sich eine partielle Komplementation des Defekts der Δ SmtA-2 Deletion. Die Protoperithezien entwickelten sich nach einer verlängerten Inkubationszeit von bis zu 21 Tagen zu pigmentierten Perithezien, die allerdings maximal 50% der Größe von Wildtyp Perithezien erreichen (Abb. 11). Diese Perithezien enthalten teilweise keinerlei Ascosporen, bilden mit einer Frequenz von etwa 10% jedoch 3 bis 15 Asci mit 8 Ascosporen aus. Die Ascosporen erreichen eine normale Pigmentierung, liegen jedoch nicht als geordnete Tetrade innerhalb des Ascus vor, sondern scheinen in der Ebene verschoben.

Für die Funktionalität des MAT1-1-2 Proteins aus *S. macrospora* scheint der C-Terminus essentiell, aber nicht ausreichend zu sein. Der N-Terminus alleine ist nicht in der Lage den sexuellen Defekt der Δ SmtA-2 Mutante zu komplementieren.

4.1.4. Transkriptionelle Expression der Pheromon- und Rezeptor-Gene

Es wurde bereits gezeigt, dass Pheromonvorläufer-Gene und die entsprechenden Rezeptoren in die sexuelle Entwicklung von *S. macrospora* involviert sind (Mayrhofer, *et al.*, 2006). In dem nahe verwandten Ascomyceten *N. crassa* werden die Pheromonvorläufer-Gene in einer Kreuzungstyp-spezifischen Weise exprimiert. Das Gen *mfa-1*, homolog zu dem **a**-Faktor-ähnlichen *ppg-2* aus *S. macrospora*, ist in *MAT1-2* (*mat a*) Stämmen exprimiert, während *ccg-4*, homolog zu dem α -Faktor-ähnlichen *ppg-1* aus *S. macrospora*, in *MAT1-1* (*mat A*) Stämmen exprimiert wird (Bobrowicz, *et al.*, 2002).

Da eine Δ SmtA-2 Mutante steril ist und Homologe des Proteins SMTA-1 in vielen Ascomyceten in die sexuelle Entwicklung involviert sind (Debuchy, *et al.*, 2010), wurden das α -Domänen Protein SMTA-1 und das PPF-Domänen Protein SMTA-2 hinsichtlich ihres Effekts auf die Transkription der Pheromon- und Rezeptor-Gene untersucht. Mittels quantitativer real-Time-PCR (s 3.2.4) wurden die mRNA Mengen der vier transkribierten Gene *ppg-1*, *ppg-2*, *pre-1* und *pre-2* in den Mutanten Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 mit dem Wildtyp-Stamm verglichen. Alle real-Time-PCR Experimente wurden dreifach durchgeführt mit isolierter RNA aus fünf Tage altem Myzel, da bereits gezeigt werden konnte, dass die entsprechenden Gene zu diesem Zeitpunkt gut exprimiert sind (Mayrhofer, *et al.*, 2006). Als Starteroligonukleotide wurden die Paare *ppg1-f* / *ppg1-r* (*ppg-1*), *ppg2-f* / *ppg2-r* (*ppg-2*), *pre1-f* / *pre1-r* (*pre-1*), *pre2-f* / *pre2-r* (*pre-2*) und als Standard Starteroligonukleotide für die

Ergebnisse

kleine rRNA Untereinheit („small subunit ribosomal RNA“, SSU rRNA) SSU-f / SSU-r (Tab. 3) verwendet (Abb. 12).

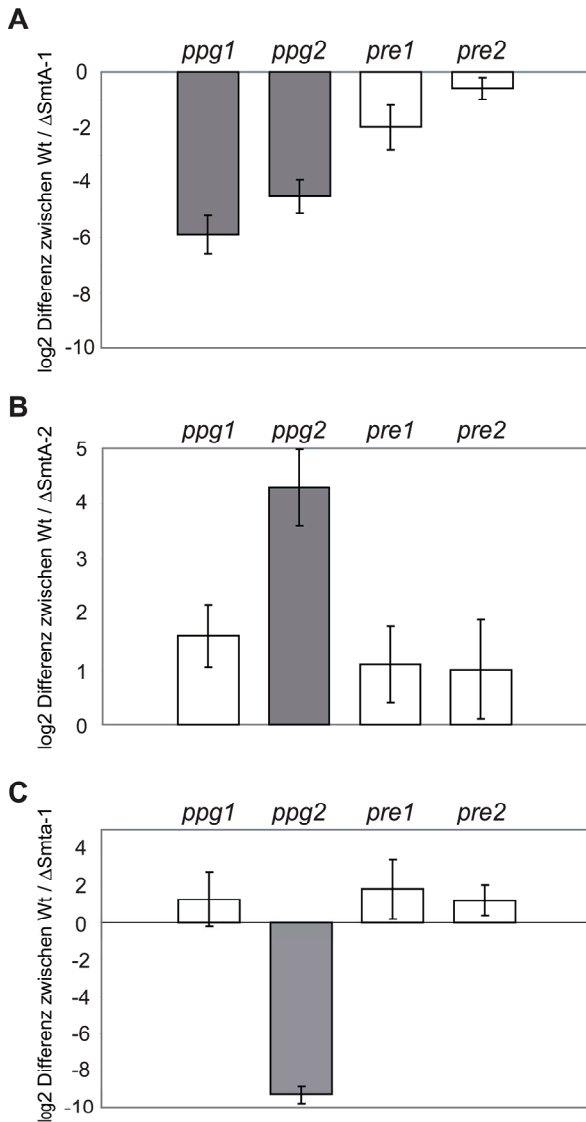


Abbildung 12: Quantitative real-Time-PCR Analyse der Pheromone *ppg-1* und *ppg-2* und ihrer entsprechenden Rezeptoren *pre-1* und *pre-2* in den Mutanten Δ SmtA-1 (A), Δ SmtA-2 (B) und Δ SmtA-1 (C) im Vergleich zum Wildtyp. Das Verhältnis ist angegeben als Logarithmus (Basis 2) aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Mittelwerte wurden berechnet mit dem Programm REST (Pfaffl, *et al.*, 2002). Die Pheromon-Gene *ppg-1* und *ppg-2* in Δ SmtA-1 und *ppg-2* in Δ SmtA-2 (graue Balken) sind signifikant reguliert (*P*-Wert jeweils 0,001; 0,008 und 0,001 berechnet mit REST (Pfaffl, *et al.*, 2002)) Gezeigt sind die Mittelwerte dreier Experimente \pm der Standardabweichung.

Die Transkriptmenge der Pheromonvorläufer-Gene *ppg-1* und *ppg-2* ist in der Deletionsmutante Δ SmtA-1 im Vergleich zum Wildtyp signifikant herunterreguliert. Im Durchschnitt ist die Menge der *ppg-1* mRNA um das 60fache, die der *ppg-2* mRNA um das 16fache reduziert. Im Gegensatz dazu ist die Transkriptmenge von *ppg-2* in der Mutante Δ SmtA-2 signifikant um das 20fache erhöht, während *ppg-1* im Vergleich zum Wildtyp nicht unterschiedlich reguliert ist (Abb. 12).

Dies zeigt, dass das Kreuzungstyp-Protein SMTA-1 als positiver Regulator der Expression beider Pheromonvorläufer-Gene dient, während SMTA-2 einen negativen Regulator für die Expression von *ppg-2* darstellt. Während in SMTA-1 Pheromonvorläufer-Gen *ppg-2* signifikant herunterreguliert ist (siehe auch Pöggeler, *et al.*, 2006b), zeigte sich in keiner der Kreuzungstyp-Mutanten ein Einfluss auf die Expression der Rezeptor-Gene (Abb. 12).

4.1.5. Microarray Analyse von Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2

Durch die enge Verwandtschaft zwischen den beiden Spezies *S. macrospora* und *N. crassa* ist es möglich, Microarrays von *N. crassa* mit Proben von *S. macrospora* zu verwenden. Die Sequenzidentität in den Exonsequenzen beider Spezies liegt bei 89,5% und es konnte bereits gezeigt werden, dass Microarray Analysen zwischen beiden Spezies möglich sind (Nowrousian, *et al.*, 2005; Nowrousian, *et al.*, 2004; Pöggeler, *et al.*, 2006b).

Um differentiell regulierte Gene in den Kreuzungstyp-Mutanten zu identifizieren, wurden Microarray Hybridisierungen mit Proben aus *S. macrospora* Wt, Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 auf *N. crassa* 70mer Oligonukleotid-Arrays mit 10.910 Oligonukleotiden, welche den 10.526 putativen ORFs und intergenischen oder telomerischen Regionen entsprechen (Tian, *et al.*, 2007), getestet. Die Proben wurden von vier bis fünf Tage altem *S. macrospora* Myzel gewonnen. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Protoperithezien im Wildtyp sich zu reifen Perithezien weiterzuentwickeln, während die Entwicklung an dieser Stelle in Δ SmtA-2 anhält. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung wurden auch schon andere sterile Mutanten erfolgreich mit dem Wildtyp in Microarray Analysen verglichen (Nowrousian, *et al.*, 2005; Pöggeler, *et al.*, 2006b).

Gene wurden als differentiell exprimiert angesehen, wenn sie, im Vergleich zum Wildtyp, 2fach hoch- oder herunterreguliert waren bei einem *P*-Wert von $<0,05$ (Nowrousian, *et al.*, 2007a). Verglichen mit dem Wildtyp wurden so 73 Gene gefunden, welche in der Deletionsmutante Δ SmtA-1 herauf- und 905 welche herunterreguliert waren (Abb. 11). In der Mutante Δ SmtA-2 waren dagegen 111 Gene herauf- und 743 herunterreguliert. Dabei waren 23 Gene sowohl in der fertilen Mutante Δ SmtA-1 als auch in der sterilen Δ SmtA-2 Mutante herauf- und 497 Gene in beiden herunterreguliert (Abb. 13).

Experimentelle Details und die Daten sämtlicher untersuchter Gene sind in der öffentlichen Datenbank „ArrayExpress“ (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) unter der Accession-Nummer E-MEXP-2600 zugänglich.

Ergebnisse

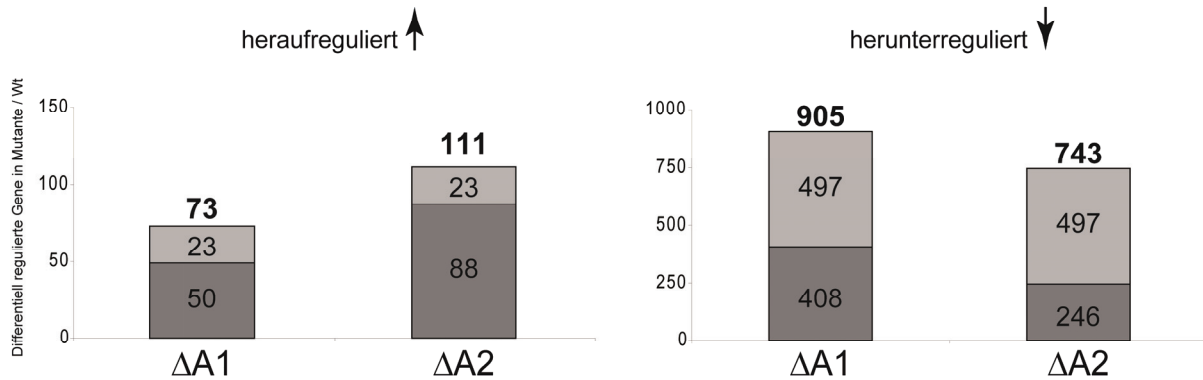


Abbildung 13: Anzahl der Gene welche in den Microarray Analysen als differentiell reguliert gefunden wurden. Die Gesamtzahl der in den beiden Mutanten Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 im Vergleich zum Wildtyp differentiell regulierten Gene ist angegeben. Gene, welche in beiden Mutanten gleich reguliert im Vergleich zum Wildtyp sind, sind in hellgrau markiert. Gene welche ausschließlich in einer der Mutanten reguliert sind, sind in dunkelgrau dargestellt.

Die in Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 differentiell regulierten Gene wurden weiterhin untersucht mit der FunCat Datenbank (Ruepp, *et al.*, 2004). Dabei wurden Gene mit bekannter oder putativer Funktion in 17 funktionelle Gruppen unterteilt (Abb. 14).

In beiden Deletionstämmen zeigen die regulierten Gene eine große Bandbreite möglicher Funktionen innerhalb des Organismus, die sich dabei nicht auf eine bestimmte physiologische oder metabolische Funktion beschränken lässt. Um die Microarray Ergebnisse zu bestätigen und mögliche Kandidaten-Gene für weitere Untersuchungen zu identifizieren, wurden zusätzliche real-Time-PCR Analysen durchgeführt um das Expressionsniveau spezifischer Gene in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp genau zu bestimmen.

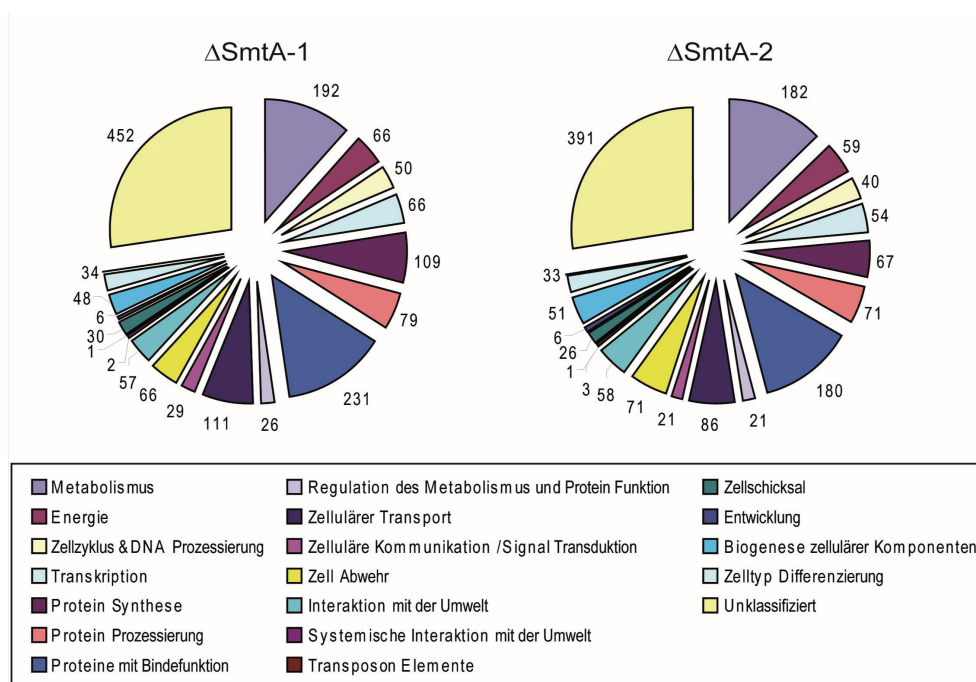


Abbildung 14: Funktionelle Klassifikation verschiedener differentiell regulierter Gene in Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 verglichen mit Wt. Herauf- und herunterregulierte Gene sind zusammen aufgelistet, die Analyse wurde mithilfe der FunCat Datenbank durchgeführt (Ruepp, *et al.*, 2004).

Zunächst wurden dabei vier Gene der Melanin-Biosynthese untersucht: eine Polyketidsynthase (*pks*), eine Scytalondehydratase (*sdh*), eine Tetrahydroxynaphtalenreduktase (*teh*) und eine Trihydroxynaphtalenreduktase (*tih*) (Engh, *et al.*, 2007a). Das Gen *teh* konnte dabei in früheren Microarray Analysen als differentiell reguliert in verschiedenen anderen, sterilen *S. macrospora* Mutanten, darunter die Kreuzungstyp-Mutante Δ Smta-1, gefunden werden (Pöggeler, *et al.*, 2006b). Für die real-Time Analyse wurden die Starteroligonukleotidpaare *pks*-f / *pks*-r, *sdh*-f / *sdh*-r, *teh*-f / *teh*-r und *tih*-r / *tih*-r (Tab. 3) verwendet (Abb. 15).

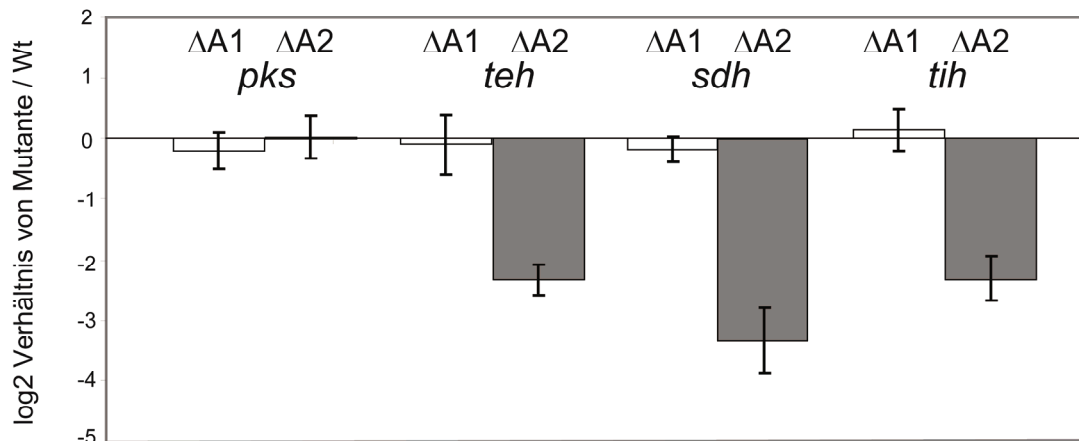


Abbildung 15: Quantitative real-Time-PCR Analyse von Melanin-Biosynthese Genen in Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 im Vergleich zum Wildtyp. Die Expression der Gene *teh*, *sdh* und *tih* ist in Δ SmtA-2 signifikant herunterreguliert (P -Werte 0,001; 0,003 und 0,002; berechnet mit REST (Pfaffl, *et al.*, 2002)) während keines der Gene in Δ SmtA-1 signifikant reguliert ist. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier Experimente \pm der Standardabweichung.

Im Vergleich zum Wildtyp war keines der untersuchten Gene in der Mutante Δ SmtA-1 differentiell reguliert, während die Gene *teh*, *sdh* und *tih* in Δ SmtA-2 signifikant herunterreguliert waren. Die Expression der Polyketidsynthase (*pks*) war in keiner der Mutanten verändert.

Des Weiteren wurden zwei Kupferhomeostase Gene (*sod-2* und *ctr-3*) untersucht (Borghouts, *et al.*, 2002b). Dazu wurden die Primerpaare *sod-f* / *sod-r* und *ctr-f* / *ctr-r* (Tab. 3) verwendet (Abb. 16).

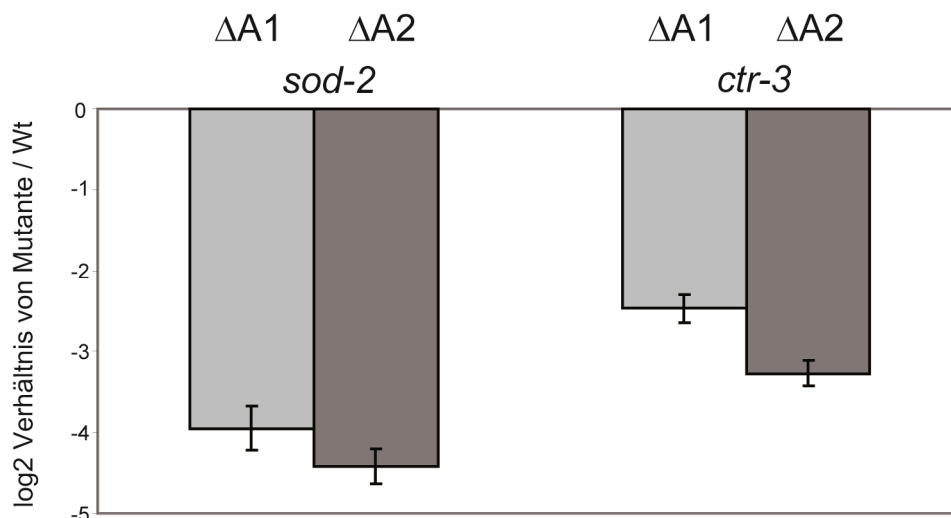


Abbildung 16: Quantitative real-Time-PCR Analyse der Gene der Kupferhomeostase Gene *sod-2* und *ctr-3* in Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 verglichen zum Wt. Die Gene sind in beiden Mutanten signifikant herunterreguliert (P -Wert Δ SmtA-1 0,009 und 0,011; P -Wert Δ SmtA-2 0,005 und 0,007 berechnet mit REST (Pfaffl, *et al.*, 2002)).

Ergebnisse

Die Expression der Gene *sod-2* und *ctr-3* war dabei sowohl in der fertilen Mutante Δ SmtA-1 als auch in der sterilen Mutante Δ SmtA-2 erniedrigt. Das Expressionsniveau lag dabei in beiden Fällen in Δ SmtA-2 deutlich niedriger als in Δ SmtA-1.

Zusätzlich wurde eine Untereinheit des „origin recognition complex“ (ORC) getestet. Der ORC ist für die Erkennung des Replikationsursprungs von DNA verantwortlich und Erkennungssequenzen des ORC finden sich hundert- bis tausendfach auf eukaryotischen Chromosomen (Bell und Dutta, 2002). Die Expression des Gens der Untereinheit 3 des ORC (*orc-3*) war dabei in der Kreuzungstyp-Deletion Δ SmtA-2 herunterreguliert, während in Δ SmtA-1 kein Unterschied zum Wildtyp gefunden wurde (Abb. 17). Das Expressionslevel war dabei in Δ SmtA-2 etwa 5fach niedriger als im Wildtyp.

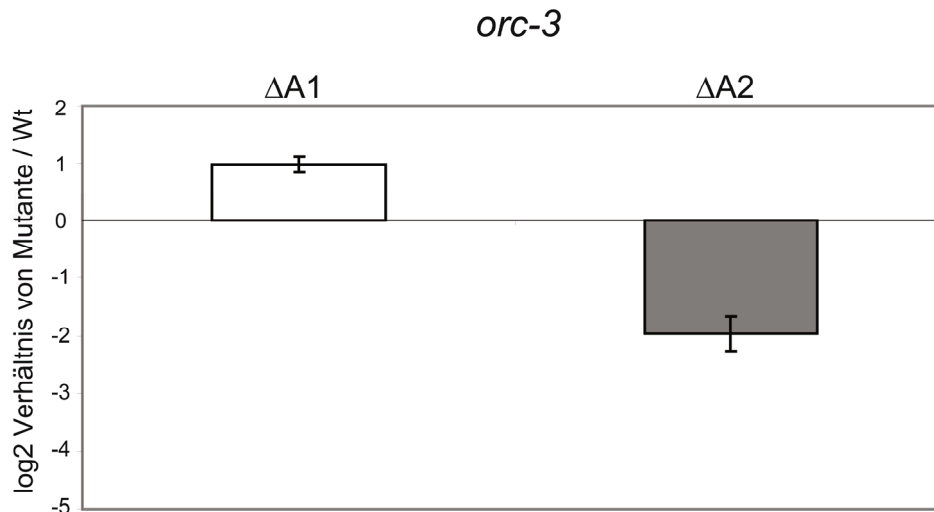


Abbildung 17: Quantitative real-Time-PCR Analyse der Untereinheit 3 des „origin recognition complex“ (*orc-3*) in den Mutanten Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 im Vergleich zum Wildtyp. Die Expression ist signifikant herunterreguliert in Δ SmtA-2 (dunkelgrau), jedoch nicht in Δ SmtA-1 (weiß) (*P*-Wert 0,006 berechnet mit REST (Pfaffl, *et al.*, 2002)).

Die Ergebnisse der real-Time-PCR Analyse der drei Gene *sod-2*, *ctr-3* und *orc-3* stimmten dabei mit den Ergebnissen der Microarray Analyse überein.

4.1.6. Lokalisation der Kreuzungstyp-Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Lokalisation der verschiedenen Kreuzungstyp-Proteine wurden die Plasmide pRHN-A2, pRHN-A3 und pRSnG-A2 erstellt (Tab. 2). Die darauf kodierten Kreuzungstyp-Proteine sind entweder mit dem Fluoreszenzprotein dsRED (Janus, *et al.*, 2007) (SMTA-2, SMTA-3) oder GFP (Pöggeler, *et al.*, 2003) fusioniert (SMTA-2). Für die Herstellung des Plasmids pRHN-A2 wurde zuvor eine *SmtA-2* Version mit einer Punktmutation mittels der Primer A2-NcoI-RIPf / A2-NcoI-RIPr (s. Tab. 3) erstellt. Durch diese Mutation enthält diese Version keine *NcoI* Restriktionsstelle mehr, die Aminosäurezusammensetzung des kodierten Proteins wird jedoch nicht verändert. Das Gen ist *in vivo* voll funktionell (Daten nicht gezeigt).

Da Deletionsmutanten des Kreuzungstyp-Gens SMTA-3 keinen unterscheidbaren Phänotyp zeigen, konnte in diesem Fall keine Komplementationsanalyse durchgeführt werden. Das Plasmid pRHN-A3 wurde in *S. macrospora* Wt transformiert. Die Plasmide pRHN-A2 und pRSnG-A2 dagegen wurden in den Deletionsstamm Δ SmtA-2 transformiert, um das kodierte Fusionsprotein auf Funktionalität zu überprüfen. Bei voller Funktionalität des SMTA-2_GFP oder SMTA2_dsRed Proteins *in vivo* sollte der sterile Phänotyp der Δ SmtA-2 Mutante komplementiert werden. Als Negativkontrolle dienten die Leerplasmide pRHN1nat und pRSnGFP, welche ausschließlich für dsRed bzw. GFP kodieren. Die Integration aller Fluoreszenzkonstrukte wurde mittels PCR nachgewiesen (s. Anhang A2).

Die Ergebnisse der fluoreszenz-mikroskopischen Analyse von SMTA-3_dsRED, SMTA-2_dsRed und SMTA-2_GFP sind in Abb. 18 abgebildet.

Mit dem Leerplasmid pRHN1, welches dsRED unter dem konstitutiven *gpd*-Promotor enthält, ist deutlich eine Fluoreszenz im Cytoplasma zu erkennen. Die Fluoreszenz der SMTA-3_dsRED und SMTA-2_dsRed Proteine lokalisiert ähnlich zu dsRED. Das Gleiche gilt für die Fluoreszenz des GFP-Leerplasmids pRSnGFP und SMTA-2_GFP. Alle drei Fusionsproteine verteilen sich gleichmäßig über die Zelle im Cytoplasma. Es konnte keine konzentrierte Fluoreszenz in Organellen oder der Vakuole nachgewiesen werden. Vielmehr sind die Vakuolen frei von Fluoreszenz.

Ergebnisse

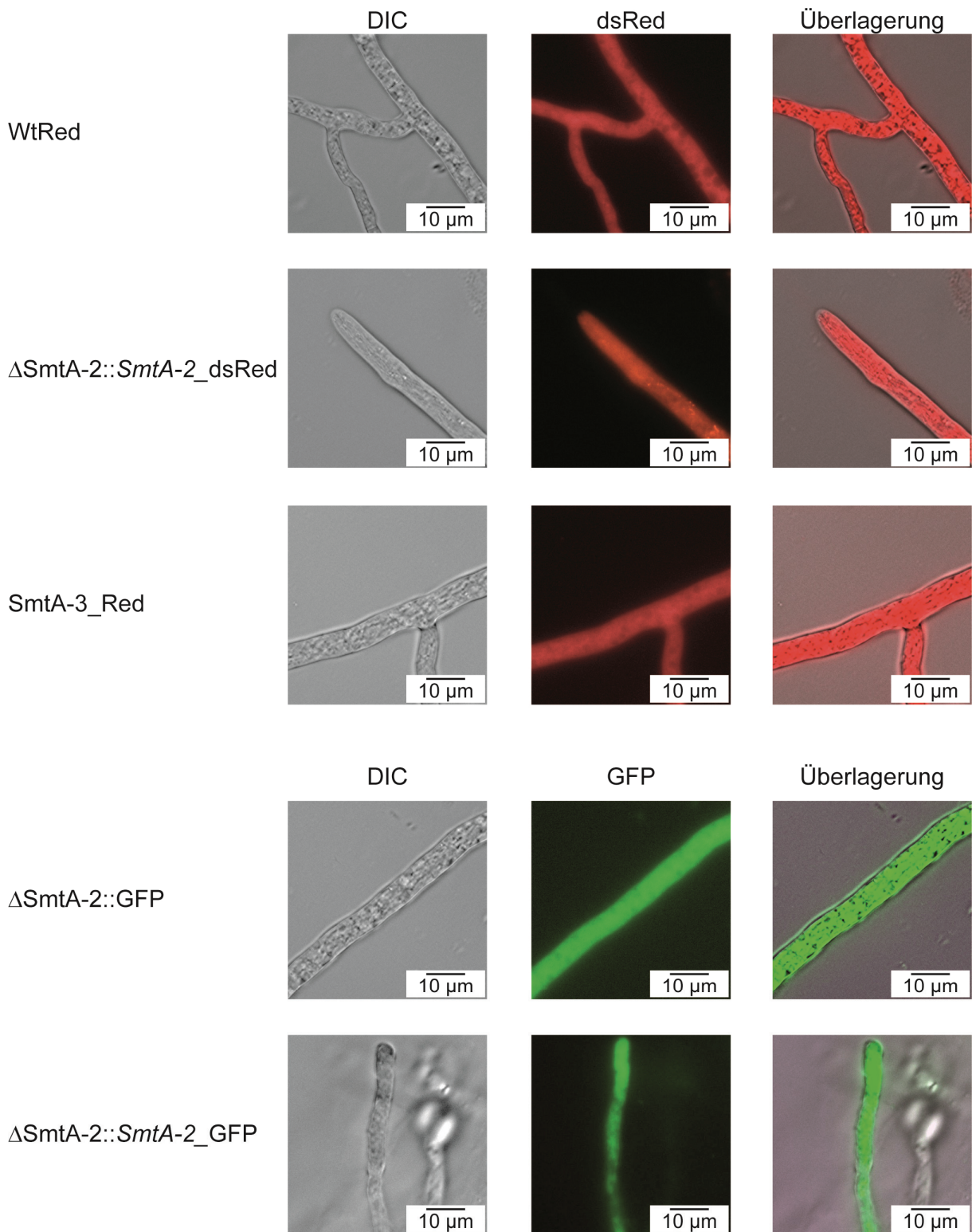


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. macrospora* Wildtyp transformiert mit dsRED (WtRed) oder SMTA-3_dsRED. Δ SmtA-2 wurde entweder mit GFP-Leerplasmid pRSnGFP (Δ SmtA-2::GFP) oder dem Gen *SmtA-2* fusioniert mit dsRed (Δ SmtA-2::SmtA-2_dsRed) oder GFP (Δ SmtA-2::SmtA-2_GFP) transformiert.

Alle Aufnahmen wurden nach 3 Tagen Wachstum auf SWG Medium durchgeführt.

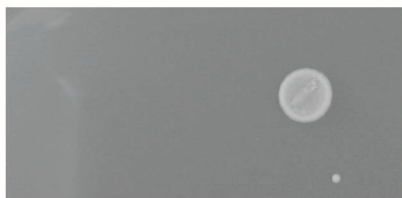
Ergebnisse

Im Hintergrund des Δ SmtA-2 Stammes mit den Plasmiden pRSnG-A2 und pRHN-A2 ist eine leichte Veränderung des sterilen Phänotyps von Δ SmtA-2 zu beobachten. Es bilden sich pigmentierte Perithezieren, welche, im Gegensatz zum Wildtyp, jedoch klein bleiben und keine Ascosporen enthalten (s. Anhang A2)

Die Fusionsproteine SMTA-2_dsRed und SMTA-2_GFP sind also nur partiell funktionell.

4.1.7. Interaktionspartner des Kreuzungstyp-Proteins SMTA-2

Um mögliche Interaktionspartner des Kreuzungstyp-Proteins SMTA-2 zu identifizieren, wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid Analyse gegen eine *S. macrospora* cDNA-Bank durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pGB-A2 (Tab. 2) verwendet, welches für das Protein SMTA-2 fusioniert an die *GAL4*-Bindedomäne kodiert. Die Funktionalität des Konstrukts in *S. cerevisiae* wurde mittels der Kreuzung mit dem Stamm AH109+pGAD-ranBPM (Tab. 2) verifiziert. Dieser trägt das Protein RanBPM fusioniert an die *GAL4*-Aktivierungsdomäne. Dieses System wurde etabliert, da bekannt ist, dass RanBPM mit der *GAL4*-Bindedomäne interagieren kann. Eine Interaktion ist also unabhängig vom Fusionsprotein möglich, solange das Konstrukt korrekt translatiert und in den Zellkern transportiert wird (Tucker, *et al.*, 2009). Bei Interaktion beider Fusionsproteine wird die Expression von Histidin- und Adeninbiosynthesegenen (H, A) aktiviert, welche unter der Kontrolle *GAL*-induzierbarer Promotoren stehen. Auf den Plasmiden sind dagegen Leucin- und Tryptophanbiosynthesegene (L, T) kodiert. Ein Wachstum auf SD-Medium ohne Histidin, Adenin, Leucin und Tryptophan (SD-HALT) ist dementsprechend nur möglich, wenn beide Plasmide in einem Organismus vorliegen und die kodierten Proteine interagieren. Eine Transaktivierungsaktivität von SMTA-2 wurde mit dem Leervektor pGADT7 (Tab. 2) ausgeschlossen (Abb. 19).



○ pGB-A2 + pGADT7 ○ pGB-A2 + pGAD-ranBPM

Abbildung 19: Darstellung der Hefestämme mit den Plasmiden pGB-A2 + pGADT7 (Transaktivierungskontrolle) und pGB-A2 + pGAD-ranBPM (Expressionskontrolle). Die Stämme wurden auf SD-HALT für 48 h angezogen.

Ergebnisse

Die Plasmide mit putativen Interaktionspartnern wurden aufgearbeitet und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BlastX Suchalgorithmus (Altschul, *et al.*, 1990) mit den öffentlichen Datenbanken „*Neurospora crassa* Database“ (NcD), „*Aspergillus* Database“ (AD) (<http://www.broadinstitute.org/science/data>) und „*Saccharomyces* Genome Database“ (SGD) (<http://www.yeastgenome.org>) verglichen. In der NcD sind dabei Informationen zu Proteinen aus *N. crassa*, in der AD zu verschiedenen *Aspergillus* Spezies und in der SGD zu *S. cerevisiae* gespeichert. Die Ergebnisse der Datenbankvergleiche sind in Tabelle 5 aufgeführt. Es wurden nur solche Proteine aufgeführt, welche bei den Vergleichen einen Erwartungswert (*e*-Wert) von unter 0,05 aufwiesen. Dadurch konnten 49 Proteine als potentielle Interaktionspartner von SMTA-2 identifiziert werden.

Ergebnisse

Tabelle 5: Liste der putativen, mittels Hefe-Zwei-Hybrid Analyse gefundenen Interaktionspartner von SMTA-2. Angegeben ist die Häufigkeit, mit der die Proteine in der Analyse in unabhängigen Proben gefunden wurden. Aufgeführt sind homologe Gene aus *Neurospora crassa*, *Aspergillus* spp. und *Saccharomyces cerevisiae*, welche über BlastX (Altschul, et al., 1990) mit einem e-Wert von <0,05 gefunden wurden. Die Gennummern der entsprechenden Datenbanken sind angegeben. Die putative Funktion des Proteins ist abgeleitet aus den in den Datenbanken beschriebenen Funktionen der homologen Proteine und belegt mit entsprechender Referenz. Als unspezifisch angenommene Interaktionspartner sind grau hinterlegt.

Nr.	Anz.	N.c.	e-Wert	Aspergillus spp.	e-Wert	S.c.	e-Wert	Funktion	Referenz
1	1	NCU000086	0,0	ANID_06472	1e-31	YKL046c	2,1e-02	Essentielles Membranprotein	(Kitagaki, et al., 2002)
2	4	NCU00116	0,0	Afu6g05300	0,0	YOR358w	1,0e-22	Am alpha; Transkriptionsfaktor	(Chen H., et al., 1998)
3	1	NCU00258	0,0	Afu3g10730	0,0	YOR096w	4,0e-54	Cytoplasmatisch ribosomales Protein	(Vierula, 1997)
4	1	NCU00316	3e-19	Afu1g03440	0,0			Peroxisomales Carrierprotein	(Nierman, et al., 2005)
5	1	NCU00385	0,0	ANID_10032	0,0			ATP Synthase Untereinheit	(Tian, et al., 2007)
6	4	NCU00467	0,0	ANID_02129	0,0	YDL216c	1,0e-36	CSN-5 (COP9-Signalosom)	(Busch, et al., 2007)
7	1	NCU00636	0,0	ANID_06631	0,0	YKL016c	2,0e-47	ATP Synthase Untereinheit	(Norais, et al., 1991)
8	1	NCU00651	0,0	Afu2g04000	0,0	YPL096w	6,0e-23	Peptid-N-Glycanase (Zellpolarität)	(März, et al., 2009)
9	1	NCU00747	4e-13					Hypothetisches Protein	(Tian, et al., 2007)
10	1	NCU00792	1e-43	Afu1g01680	0,0	YJR148w	2e-7	Aminosäurebiosynthese	(Kispal, et al., 1996)
11	1	NCU00955	0,0	Afu6g13790	0,0	YHR176w	3e-10	Mitochondriale Monooxygenase	(Videira, et al., 2009)
12	1	NCU00971	0,0	ANID_05997	0,0	YOL040c	3,0e-42	Ribosomale Untereinheit	(Tian, et al., 2007)
13	1	NCU00973	0,0	Afu4g00700	3e-15	YNL134c	3e-12	Antwort auf DNA Schaden	(Lee M. W., et al., 2007)
14	1	NCU01169	0,0	ANID_06077	0,0			Untereinheit der Atmungskette	(Duarte und Videira, 2000)
15	3	NCU01348	0,0	Afu5g13180	0,0	YPL111w	4,0e-08	Agmatinase, Arginase Familie	(Shima, et al., 2003)
16	1	NCU01386	0,0	Afu5g03030	0,0	YBR033w	0,0003	C6 Zinkfinger Transkriptionsfaktor	(MacPherson, et al., 2006)
17	1	NCU01388	0,0	ANID_08119	0,0	YBR199w	2,0e-72	Protein Glykosilierung	(Lussier, et al., 1996)
18	1	NCU01654	0,0	Afu5g04270	0,0	YER015w	2,0e-49	Fettsäuremetabolismus	(Knoll, et al., 1994)

Ergebnisse

19	4	NCU02407	0,0	ATEG_05705	0,0	YFL018c	3,0e-87	Pyruvat Metabolismus	(Pronk, et al., 1996)
20	1	NCU02500	0,0	ANID_05791	0,0	YPL187w	0,017	Alpha-Faktor Pheromon	(Bobrowicz, et al., 2002)
21	1	NCU02632	0,0	ANID_03665	0,0	YGR125w	6,0e-17	Sulfat Transporter	(Mount und Romero, 2004)
22	1	NCU02689	0,0	AFL2G_03331	0,0	YDL240w	3e-108	LIM-RhoGAP-Protein	(Vogt und Seiler, 2008)
23	2	NCU03238	0,0	ANID_05151	0,0	YLR023c	2,0e-06	Membran-Protein; Zink Homeostase	(Lyons, et al., 2004)
24	2	NCU03388	0,0	Afu3g13440	0,0	YGR132c	0,006	Untereinheit des Prohibitin Komplexes; Regulation der replikativen Lebensspanne	(Coates, et al., 1997)
25	1	NCU03555	0,0	Afu1002270	0,0			ARS Bindeprotein; Replikations Regulation	(Sanchez, et al., 1998)
26	1	NCU03623	0,0	Afu5g04060	0,0	YMR022w	7,0e-46	Ubiquitin konjugierendes Enzym; Zellwandorganisation	(Vassal, et al., 1992)
27	1	NCU04230	0,0	Af12g_10440	0,0	YER065c	9,0e-97	Isocitrat lyase; Glyoxylat Zyklus	(Fernandez, et al., 1992)
28	1	NCU04803	0,0	Af12g_10752	0,0			Nitrat Metabolismus	(Gorlatova, et al., 1998)
29	1	NCU05316	3e-15	Ateg_03496	0,0			Phosphorylase Superfamilie	(Mushegian und Koonin, 1994)
30	4	NCU05338	0,0		0,0			Hypothetisches Protein	(Videira, et al., 2009)
31	1	NCU05836	0,0	ANID_02045	0,0	YJR131w	8,0e-12	ER-assoziiertes Glykoprotein Katabolismus	(Camirand, et al., 1991)
32	8	NCU06123	0,0	Ateg_07454	0,0			Phosphotetrolase; Pentosephosphat Weg	(Meile, et al., 2001)
33	2	NCU07623	0,0	Ateg_10312	0,0	YLR438w	2,0e-26	Arginin Abbau	(Deschamps und Wiame, 1979)

Ergebnisse

34	1	NCU07698	0,0	ANID_01002		YDR166c	2,0e-08	Exocyst Untereinheit 5; Zellpolarität	(Seiler und Plamann, 2003)
35	1	NCU08166	2e-5	Afu_4g_10310	0,0			Hypothetisches Protein	---
36	2	NCU08229	2e-25					Hypothetisches Protein	---
37	2	NCU08291	0,0	ANID_07752	0,0	YOR176w	2,0e-09	Ferrochelatase; Häm Biosynthese	(Urban-Grimal und Labbe-Bois, 1981)
38	1	NCU08900	0,0	Af2g_03275	0,0	YHR179w	7e-14	NADPH dehydrogenase; Apoptose	(Odat, et al., 2007)
39	1	NCU08939	0,0	Ateg_0537	0,0	YEL036c	3,0e-37	Untereinheit des Mannan Polymerase II Komplexes	(Videira, et al., 2009)
40	3	NCU08948	0,0	Afu1g_01343	0,0	YHR004c	2,0e-26	Untereinheit des NEM1-SPO7 Komplexes; Regulation des Zellwachstums und Sporulation	(Kim Y., et al., 2007)
41	2	NCU09116	0,0	Af2g_10875	0,0	YGL202w	5,0e-34	Aromatischer Aminosäure Metabolismus	(Iraqi, et al., 1998)
42	1	NCU09572	1e-29	ANID_08065	0,0	YLR370c	9e-46	ARP2/3 Komplex; Aktinfilament Organisation	(Winter, et al., 1997)
43	1	NCU09594	0,0	Afu3g_12640	0,0	YHR011w	6,0e-35	Seryl-tRNA synthase; Aerobe Respiration	(Yokogawa, et al., 2000)
44	1	NCU09864	0,0	Af2g_09200	0,0	YER178w	5,0e-16	Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes	(Steensma, et al., 1990)
45	1	NCU09896	0,0	ANID_01194	0,0	YKL001c	3,0e-43	Adenylylsulfatkinase; Methionin Metabolismus	(Donalies und Stahl, 2002)
46	1	NCU11372	0,0	ANID_05898	0,0	YDL165w	2,0e-16	NOT2 des NOT-CCR4 Komplexes; Globaler negativer Transkriptionsregulator	(Collart und Struhl, 1994)

Ergebnisse

47	1	NCU11688	2e-10						Hypothetisches Protein	---
48	1	NCU11745	2e-7						Hypothetisches Protein	---
49	1	NCU11795	0,0	ANID_00871	0,0	YDR331w	2,0e-55		GPI-Anker Transamidase; GPI-Anker Anhang an Proteine	(Fraering, et al., 2001)

Ergebnisse

In den Interaktionsanalysen wurde unter anderem Untereinheit 5 des COP9-Signalosoms (CSN 5; Protein 6) gefunden. Für dieses ist, ähnlich zu RanBPM, eine Interaktion mit der *GAL4*-Bindedomäne beschrieben (Nordgard, *et al.*, 2001; Tucker, *et al.*, 2009), was zu einem falsch-positiven Ergebnis führen kann.

Alle erhaltenen Proteine wurden zusätzlich mit dem Leervektor pGBKT7 auf Interaktion mit der *GAL4*-Bindedomäne allein getestet. In Abbildung 20 sind beispielhaft Interaktionstests der Proteine 1, 6, 15, 23, 35 und 48 (s. Tab. 5) mit pGBKT7 dargestellt.

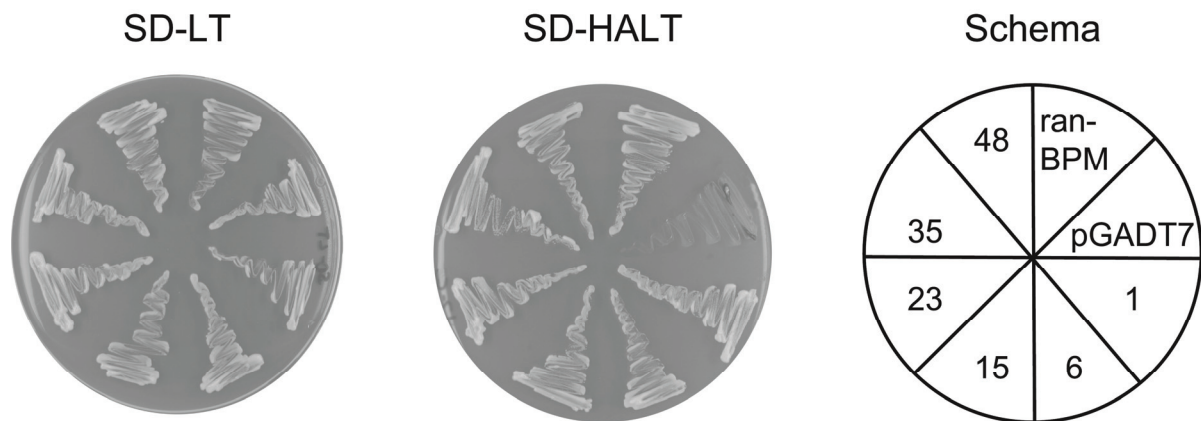


Abbildung 20: Darstellung der Interaktionskontrolle verschiedener Proteine mit pGBKT7. Die Proteine 1, 6, 15, 23, 35 und 48 zeigen deutliches Wachstum auf Selektionsmedium in Gegenwart des Leerplasmids. Als Positivkontrolle wurde das Protein RanBPM verwendet, als Negativkontrolle diente das Leerplasmid pGADT7. Inkubation erfolgte auf SD-LT bzw. SD-HALT Medium für 48 h.

Auf SD-HALT Medium ist nach 48 h ein deutliches Wachstum zu erkennen, was auf eine Interaktion dieser Proteine mit der *GAL4*-Bindedomäne hinweist. Das Protein RanBPM interagiert nachweislich mit der Bindedomäne und wird hier als Positivkontrolle verwendet (Tucker, *et al.*, 2009). Das Leerplasmid pGADT7 dient als Negativkontrolle.

Die Interaktionspartner 1, 6, 15, 23, 35 und 48 (Tab. 5) konnten so als spezifische Interaktionspartner ausgeschlossen werden.

Bei den Proteinen 32 und 42 zeigte sich bei der Interaktion mit SMTA-2 dagegen ein teilweise eingeschränktes Wachstum (Daten nicht gezeigt). Da dies nur bei einem Teil der Proben und nicht reproduzierbar auftrat, wurden diese beiden Proben weiterhin als putative Interaktionspartner von SMTA-2 behandelt.

4.2. Analyse der Pheromone und Rezeptoren aus *P. chrysogenum*

Um die Funktionalität der Pheromon- und Rezeptor-Proteine aus dem asexuellen Ascomyceten *P. chrysogenum* zu untersuchen, wurde als heterologes System die Bäckerhefe *S. cerevisiae* verwendet. Die Gene für das Pheromonvorläuferpeptid *ppg-1* und den entsprechenden Rezeptor *pre-2* wurden dazu in das Plasmid pPGK eingebracht (Tab. 2). In diesem Vektorsystem stehen die Gene unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiven *pgk*-Promotors aus *S. cerevisiae* (Kang, *et al.*, 1990). Als Kontrolle wurden die *S. macrospora* Gene *pre-2* und *ppg-1* verwendet, für die eine Funktionalität in diesem System bereits gezeigt werden konnte (Mayrhofer und Pöggeler, 2005). Die Plasmide pPGK-PcPRE2 und pPGK-SmPRE2 wurden dabei in den Stamm YDB103, die Plasmide pPGK-PcPPG1 und pPGK-SmPPG1 in den Stamm YLR452c eingebracht (3.1.1). Beide Stämme weisen dabei eine Deletion des Gens *sst-2* auf. Der Stamm YDB103 weist dabei zusätzlich eine Deletion des Hefe-Pheromon-Rezeptors STE2 auf.

Nach Pheromon-Induktion kommt es in haploiden Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* zu verschiedenen Antwortmechanismen. Einer davon ist ein Zellzyklusarrest in der G₁-Phase des Zellzyklus. Falls nach einer solchen Induktion jedoch keine Paarung mit einer haploiden Zelle unterschiedlichen Kreuzungstyps stattfindet, wird dieser Zyklus-Arrest aufgehoben und es kommt zu einer Desensibilisierung gegenüber dem Pheromon-Signal. Ein entscheidender Faktor dieser Desensibilisierung ist das Protein SST-2 aus der „Regulator for G-Protein Signaling“ (RGS) Familie (Dohlman, *et al.*, 1996; Dohlman und Thorner, 2001; Wang und Dohlman, 2004)

Als Positivkontrolle diente der Stamm BY4741. Die Stämme YDB103+pPGK-PcPRE2 und YDB103+pPGK-SmPRE2 wurden dann mit künstlichem Pheromon oder Überstand von YLR452c+PcPPG1 (*P. chrysogenum* PPG-1) und YLR452c+SmPPG1 (*S. macrospora* PPG-1), wie unter 3.2.9 beschrieben, behandelt (Abb. 21).

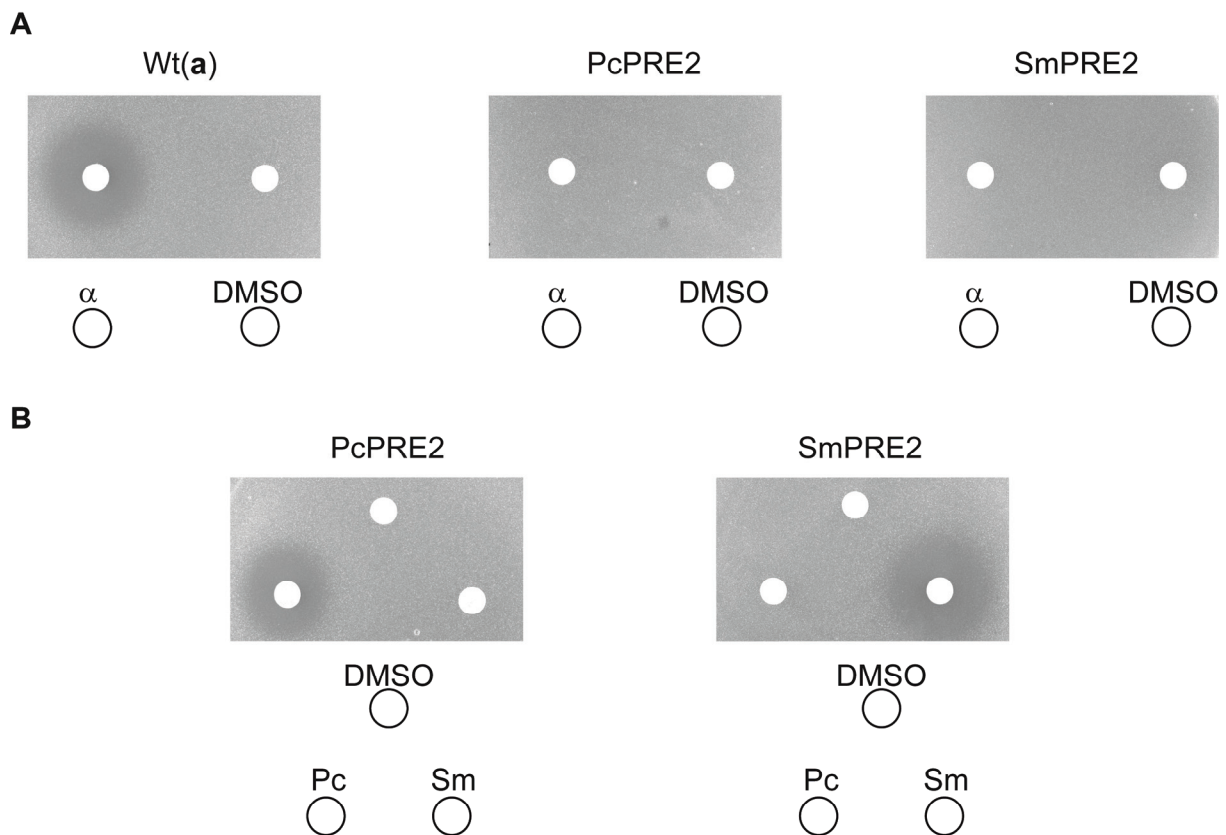


Abbildung 21: Pheromon induzierter Wachstumsarrest in *S. cerevisiae* Stämmen, welche heterolog die Pheromon-Rezeptoren aus *P. chrysogenum* oder *S. macrospora* exprimierten. (A) Kontrolle der Stämme YDB103+pPGK-PcPRE2 (PcPRE2) und YDB103+pPGK-SmPRE2 (SmPRE2) mittels künstlichem α -Faktor Pheromon (α) verglichen mit dem Stamm BY4741 (Wt a). (B) Zellzyklusarrest der *S. cerevisiae* Stämme behandelt entweder mit künstlichem *S. macrospora* (Sm) oder *P. chrysogenum* (Pc) Pheromon. Alle Pheromone wurden in einer Konzentration von 3 nmol, gelöst in DMSO, eingesetzt. Als Kontrolle diente DMSO ohne Pheromonzusatz.

Nach Behandlung mit dem artifiziellen *P. chrysogenum* Pheromon zeigte sich deutlich die Entwicklung eines Hemmhofes bei dem Hefe-Stamm mit dem heterolog exprimierten *P. chrysogenum* Pheromon-Rezeptor. Auch bei den Stämmen mit dem *S. macrospora* Rezeptor zeigte sich nach Behandlung mit künstlichem *S. macrospora* Pheromon ein deutlicher Hemmhof.

Neben den künstlichen Pheromonen wurden außerdem die beiden Hefestämme YLR452c+pPGK-PcPPG1 und YLR452c+pPGK-SmPPG1 verwendet. Diese exprimieren heterolog die entsprechenden Pheromone unter Kontrolle des *pgk*-Promotors. Die Zellen wurden ü.N. in Selektionsmedium angezogen und der zellfreie Überstand wie zuvor beschrieben auf die Zellen mit den heterolog exprimierten Rezeptoren gegeben. Dabei konnte

Ergebnisse

in keinem Fall, weder für *P. chrysogenum* noch für *S. macrospora* ein Wachstumsarrest beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Pheromon-Induktion zeigt *S. cerevisiae* nicht nur einen Zellzyklusarrest, sondern auch morphologische Änderungen der Zellform. Induzierte Zellen zeigen polarisiertes Wachstum in Richtung des potentiellen Paarungspartners, was zu einer speziellen, birnenförmigen Zellform führt, die auch als „Shmoo“ bezeichnet wird. Zur Verifikation der Ergebnisse der Hemmhof-Tests wurden die Hefe-Stämme mit den heterolog exprimierten Rezeptoren wie in 3.2.12 beschrieben angezogen und mit artifiziellem Pheromon behandelt (Abb. 22).

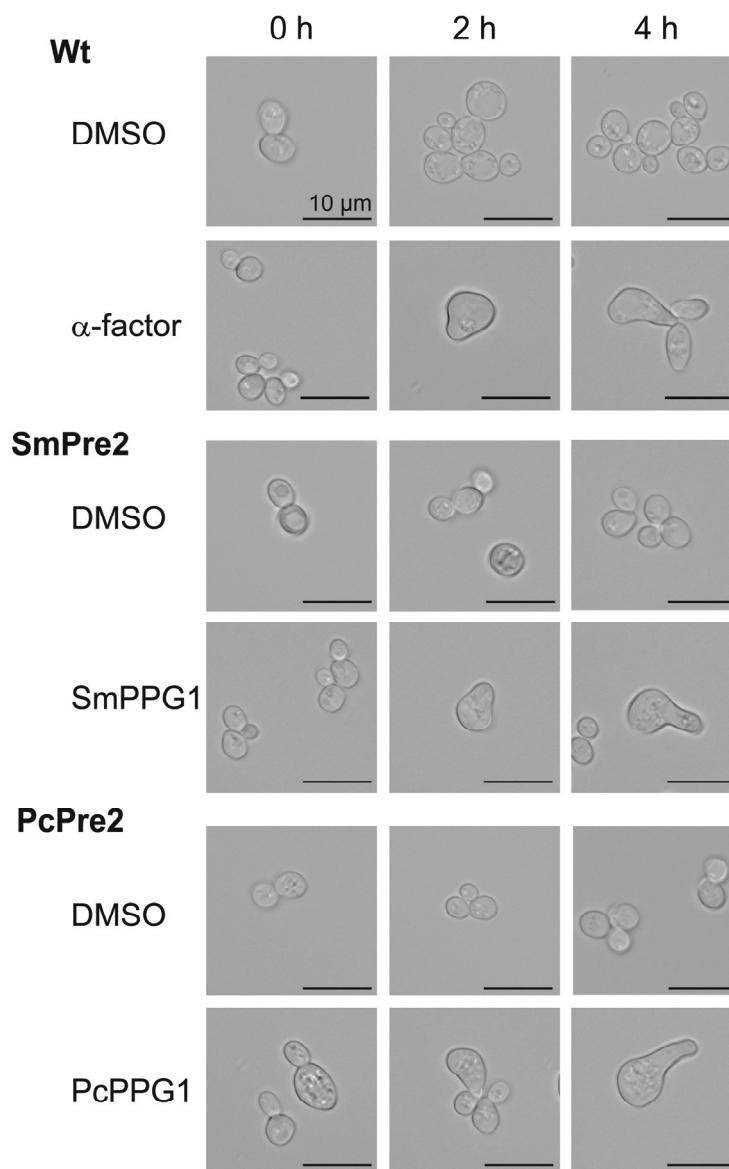


Abbildung 22: „Shmoo“-Bildung von *S. cerevisiae* als Antwort auf die artifiziiellen Pheromone α-Faktor, PcPPG1 und SmPPG1. Die künstlichen Pheromone wurden in einer Konzentration von 5 μM eingesetzt und die Reaktion der Zellen nach 0, 2 und 4 Stunden (h) gezeigt. Als Kontrolle wurde DMSO eingesetzt und ein *MATa* Wildtyp-Stamm mit artifiziellem α-Faktor behandelt.

Ergebnisse

Bei Behandlung der Stämme mit den heterolog exprimierten Pheromon-Rezeptoren war nach Behandlung mit dem entsprechenden Pheromon deutlich eine Änderung der Zellmorphologie zu einem „Shmoo“ zu beobachten. Diese Änderung zeigte sich nicht in den Kontrollen, welche mit DMSO behandelt waren. Als Positivkontrolle diente ein *MATa* Wildtyp-Stamm, welcher mit künstlichem α -Faktor behandelt wurde.

5. Diskussion

5.1. Ein HMG-Domänen Protein und ein PPF-Domänen Protein sind die Hauptregulatoren der sexuellen Entwicklung in *S. macrospora*

Die sexuelle Entwicklung in *S. macrospora* und die damit verbundene Ausbildung dreidimensionaler Fruchtkörper ist ein apandrischer Prozess und benötigt nicht die Paarung zweier kompatibler Kreuzungspartner. Ähnlich zu anderen homothallischen Ascomyceten besitzt auch *S. macrospora* einen Kreuzungstyp-Locus mit Homologen zu den *Sordariomyceten* MAT Genen *MAT1-1-1*, *MAT1-1-2*, *MAT1-1-3* und *MAT1-2-1* (Kück, *et al.*, 2009; Pöggeler, 2007) (Abb. 1). Andere homothallische Ascomyceten, darunter *Neurospora africana*, *N. dodgei*, *N. galapagosensis* und *N. lineolata* besitzen ausschließlich Homologe zu *MAT1-1* Genen, aber keinerlei Homologe zu *MAT1-2* (Glass N. L., *et al.*, 1990a; Glass N. L., *et al.*, 1988). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde von Debuchy und Turgeon (2006) postuliert, dass die minimale Kreuzungstyp-Struktur in homothallischen *Sordariomyceten* aus den Genen *MAT1-1-1*, *MAT1-1-2* und einem HMG-Domänen kodierenden Gen, entweder *MAT1-1-3* oder *MAT1-2-1*, besteht. Diese Struktur kann dabei für andere Klassen der Ascomyceten nicht angenommen werden. So trägt der homothallische Eurotiomycet *Aspergillus nidulans* zwei ungekoppelte Homologe zu *MAT1-1-1* und *MAT1-2-1*, welche beide in die sexuelle Entwicklung involviert und für diese ausreichend sind (Paoletti, *et al.*, 2005; Pyrzak, *et al.*, 2008).

In *S. macrospora* konnte bereits gezeigt werden, dass das Gen *Smta-1* (*MAT1-2-1*) in die sexuelle Entwicklung involviert ist. SMTa-1 ist an der direkten oder indirekten Regulation verschiedenster Gene beteiligt und Deletionsmutanten des Gens sind steril (Pöggeler, *et al.*, 2006b). Dies zeigt Ähnlichkeiten mit anderen, hetero- wie auch homothallischen Ascomyceten, bei welchen das Gen *MAT1-2-1* für die sexuelle Entwicklung essentiell ist (Chang und Staben, 1994; Lee J., *et al.*, 2003; Paoletti, *et al.*, 2007; Pyrzak, *et al.*, 2008).

In Interaktionsstudien konnte nachgewiesen werden, dass das Protein SMTa-1 (*MAT1-2-1*) mit SMTA-1 (*MAT1-1-1*) in *S. macrospora* interagiert (Jacobsen, *et al.*, 2002). Trotzdem zeigt eine Δ SmtA-1 Deletionsmutante keinerlei sichtbaren Phänotyp (Abb. 8). Damit steht *S. macrospora* im Gegensatz zu allen anderen, bisher untersuchten Ascomyceten wo *MAT1-1-1* den Hauptregulator der sexuellen Entwicklung in *MAT1-1* Stämmen darstellt (Bobrowicz, *et al.*, 2002; Debuchy, *et al.*, 1993; Ferreira, *et al.*, 1996; Glass N. L., *et al.*,

1990a; Lee J., *et al.*, 2003; Saupe, *et al.*, 1996). Bisher stellt *S. macrospora* damit den einzigen untersuchten Ascomyceten dar, welcher kein funktionelles *MAT1-1-1* Gen für die sexuelle Reproduktion benötigt. Stattdessen benötigt *S. macrospora* ein funktionelles HMG-Domänen Protein für die sexuelle Entwicklung (*MAT1-2-1*). Damit zeigen sich Ähnlichkeiten zu der evolutionär älteren Gruppe der Zygomyceten. Diese besitzen Kreuzungstyp-Loci, welche ausschließlich HMG-Domänen Proteine enthalten (Idnurm, *et al.*, 2008) (Abb. 1). Es wird daher angenommen, dass der ursprüngliche Zustand des Kreuzungstyp-Locus in einem putativen gemeinsamen Vorfahren dem der heterothallischen Zygomyceten mit einem HMG-Domänen kodierenden Gen entspricht. Die höher entwickelten Ascomyceten und Basidiomyceten erlangten dagegen im Laufe ihrer Entwicklung weitere Kreuzungstyp-Proteine, wie α -Domänen und Homeodomänen Proteine (Casselton L.A., 2008; Dyer, 2008; Idnurm, *et al.*, 2008).

Ein Gen, welches ausschließlich in der Gruppe der *Sordariomyceten* innerhalb der Ascomyceten gefunden wurde, ist das Gen *MAT1-1-2*. Während Deletionen des Gens *MAT1-1-2* in *N. crassa* lediglich einen leichten Phänotyp zeigen und fast als redundant bezeichnet werden können (Ferreira, *et al.*, 1998), zeigen Deletionsmutanten in *P. anserina* einen Arrest in der Fruchtkörperentwicklung und Sterilität (Debuchy, *et al.*, 2010; Turgeon und Debuchy, 2007).

In *S. macrospora* ist *SmtA-2* (*MAT1-1-2*) essentiell für die sexuelle Entwicklung (Abb. 8). Deletionsmutanten zeigen einen Arrest in der Fruchtkörperentwicklung, ähnlich zu *P. anserina*. Außerdem zeigen sich Ähnlichkeiten zu Δ *MAT1* Mutanten aus *Gibberella zeae*. Deletionen der drei *MAT1-1* spezifischen Gene führte zur Selbststerilität des homothallischen *G. zeae* (Lee J., *et al.*, 2003). Da aber alle *MAT1-1* Gene, inklusive *MAT1-1-2*, deletiert wurden, kann nicht genau bestimmt werden, welches oder welche deletierten Gene zur Selbststerilität führen. Die *G. zeae* Mutanten Δ *MAT1-1* (Deletion aller *MAT1-1* spezifischer Kreuzungstyp-Gene) und Δ *MAT1-2* (Deletion von *MAT1-2-1*) waren in der Lage mit einem selbst-fertilen Wt-Stamm zu kreuzen und beide Deletionsstämme kreuzten miteinander wie heterothallische Stämme (Lee J., *et al.*, 2003).

Die *S. macrospora* Deletionsmutanten Δ *SmtA-1*, Δ -*SmtA-1*, Δ *SmtA-2* oder Δ *SmtA-3* mit einem selbst-fertilen Wt-Stamm gekreuzt wurden, entwickelten sich reife Perithezian an der Berührungsfläche beider Myzelien. In jeder dieser Kreuzungen segregierten die verschiedenen Marker (Sporenfarbe in Wt, Hygromycin-Resistenz in Mutante) in einem 1:1

Verhältnis (Tab. 4). Kreuzungen der sterilen Δ Smta-1 oder Δ SmtA-2 Stämme mit der fertilen Mutanten Δ SmtA-1 führte ebenfalls zu reifen Perithezien und keimfähigen Ascosporen. Kreuzungen von Δ Smta-1 und Δ SmtA-2 dagegen zeigten weder reife Ascosporen noch Perithezien, die Stämme blieben steril. Es ist daher möglich, dass beide Proteine SMTa-1 und SMTA-2 eine einzelne Funktion oder einen einzelnen Regulationsweg beeinflussen (Hartman, *et al.*, 2001). Dabei ist sowohl denkbar, dass beide Proteine in Hyphenanastomose involviert sind und die Deletion beider Gene die Ausformung eines Heterokaryons verhindert, als auch, dass beide Gene in einem Zellkern vorliegen und exprimiert sein müssen um funktionell zu sein. Für das HMG-Domänen Gen *SMR2* (*MAT1-1-3*) aus *P. anserina* konnte eine solche Zellkern-spezifische Expression bereits nachgewiesen werden (Turgeon und Debuchy, 2007). Ebenfalls für *P. anserina* wurde die Theorie aufgestellt, dass es in den Zellen, welche an der Ausbildung der sexuellen Strukturen beteiligt sind, während der sexuellen Entwicklung und Migration der Zellkerne zu einem Wachstumsarrest kommt (Turgeon und Debuchy, 2007). Ähnlich zu dieser Theorie kann davon ausgegangen werden, dass das *S. macrospora* Kreuzungstyp-Protein SMTa-1, ähnlich wie FPR1 aus *P. anserina*, den Hauptregulator der internukleären Erkennung und Migration darstellt. Und ähnlich wie FPR1 könnte auch SMTa-1 einen Wachstumsarrest an dieser Stelle es Entwicklungszyklus vermitteln. Dieser Arrest wiederum könnte von SMTA-2 aufgehoben werden, welches allerdings im selben Nukleus wie SMTa-1 vorliegen müsste (Abb. 23).

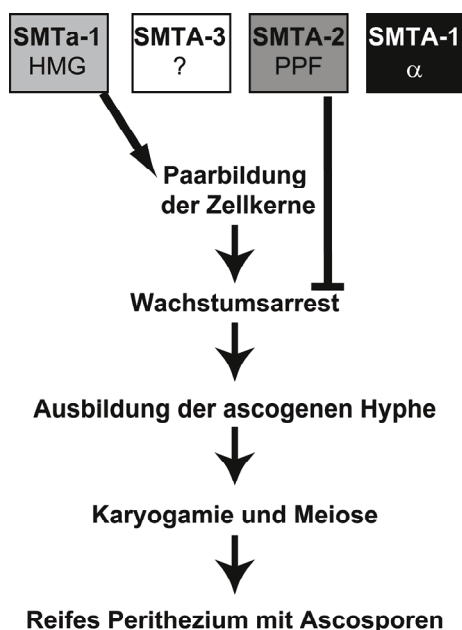


Abbildung 23: Mögliches Modell der sexuellen Regulation in *S. macrospora* durch die Proteine SMTa-1 und SMTA-2. Das HMG-Domänen Protein SMTa-1 ist essentiell für die Paarung der Zellkerne vor der Bildung der ascogenen Hyphe. Der dadurch ausgelöste Wachstumsarrest wird durch das Protein SMTA-2 im Zuge der sexuellen Entwicklung wieder aufgelöst.

In der Δ SmtA-3 Deletionsmutante konnte kein Phänotyp festgestellt werden (Abb. 8). Auch in der Δ SmtA-2/3 Doppelmutante konnte, durch die Komplementation durch *SmtA-2*, nachgewiesen werden, dass alle Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp durch die Deletion von *SmtA-2* herbeigeführt wurden (Abb. 9). Das Gen *SmtA-3* scheint daher für ein nicht-funktionales Protein zu kodieren, welches für die sexuelle Entwicklung nicht essentiell ist. Eine regulatorische Funktion, möglicherweise als ein Art von *cis*-Element, bei der Koexpression mit *SmtA-1* (Pöggeler und Kück, 2000), kann nicht ausgeschlossen werden.

5.2. SMTA-2 besitzt mindestens eine funktionelle Domäne im C-Terminus, unabhängig von der PPF-Domäne

Das Gen *MAT1-1-2* ist konserviert in den Kreuzungstyp-Loci aller bisher untersuchten *Sordariomyceten*, konnte außerhalb dieses Taxons jedoch nicht identifiziert werden. In allen bisher untersuchten *Sordariomyceten* konnte innerhalb des MAT1-1-2 Proteins eine konservierte Sequenz von drei Aminosäuren, Prolin, Prolin und Phenylalanin, gefunden werden, welche als PPF-Domäne bezeichnet wird (Debuchy, *et al.*, 2010). Ob es sich bei diesem Sequenzmotiv jedoch um eine funktionelle Domäne handelt, ist nicht bekannt.

Um mögliche funktionelle Domänen innerhalb des MAT1-1-2 Proteins aus *S. macrospora* zu identifizieren, wurde eine Komplementationsanalyse durchgeführt. Bei dieser wurden verschiedene Konstrukte des *MAT1-1-2* Gens in die sterile Deletionsmutante Δ SmtA-2 eingebracht um zu testen inwieweit diese Konstrukte in der Lage, sind den sterilen Phänotyp zu komplementieren.

Dabei wurden zum einen die *MAT1-1-2* Gene aus den nahe verwandten *N. crassa* (*mat A-2*) und *P. anserina* (*SMRI*) verwendet. Diese besitzen, außerhalb der konservierten PPF-Domäne, eine Aminosäureähnlichkeit von 72,1% (*N. crassa*) und 22,9% (*P. anserina*). In keiner der gefundenen Transformanten Δ SmtA-2::*mat A-2* oder Δ SmtA-2::*SMRI* konnte eine Komplementation des sterilen Phänotyps beobachtet werden (Abb. 11). Da die entsprechenden Gene unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren und Terminatoren aus *N. crassa* bzw. *P. anserina* standen, lässt sich an dieser Stelle nicht mit Sicherheit sagen, ob die Proteine in *S. macrospora* nicht funktionell oder lediglich nicht exprimiert sind.

Neben dem kompletten *SmtA-2* Gen ist lediglich das Konstrukt A2-S-N in der Lage, den sterilen Phänotyp zu komplementieren (Abb. 11). Dieses Konstrukt kodiert für den

C-Terminus des SMTA-2 Proteins ausgehend vom Phenylalanin der PPF-Domäne. Bei allen anderen Konstrukte, welche den N-Terminus bis zur Aminosäure (AS) 188, 199, 205 und 307 enthielten, konnte keine Komplementation beobachtet werden. Die Konstrukte 188 und 199 enthalten dabei Teile der PPF-Domäne, die Konstrukte 205 und 307 enthalten diese komplett. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die konservierte PPF-Domäne entweder keine oder zumindest keine essentielle Rolle bei der Funktionalität von SMTA-2 spielt. Vielmehr scheint eine bisher nicht identifizierte Sequenz im C-Terminus die essentielle Domäne des Proteins darzustellen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der heterologen Komplementation mit *mat A-2* und *SMR1*. Die kodierten Proteine zeigen zu SMTA-2 im C-Terminus eine Sequenzübereinstimmung von 63% (*N. crassa*) bzw. 18% (*P. anserina*). Gerade dieser Teil der Proteine weist also eine geringere Ähnlichkeit auf als der N-Terminale Teil und die PPF-Domäne.

Weitere Studien werden nötig sein, um die exakte Lage der funktionellen Aminosäuren in SMTA-2 zu identifizieren. Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass, trotz der funktionellen Ähnlichkeiten, die MAT1-1-2 Kreuzungstyp-Proteine zwischen verschiedenen Vertretern der *Sordariomyceten* wenig konserviert scheinen.

5.3. Die Proteine MAT1-1-2 und MAT1-1-3 lokalisieren im Cytosol

Mittels der Fusion der Kreuzungstyp-Proteine MAT1-1-2 und MAT1-1-3 mit den Fluoreszenzproteinen dsRED und GFP sollte die Lokalisation der Kreuzungstyp-Proteine innerhalb der Zelle untersucht werden. Die Fluoreszenzplasmide pRHN-A2, pRSnG-A2 (MAT1-1-2) und pRHN-A3 (MAT1-1-3) konnten erfolgreich erstellt und transformiert werden (Abb. 18).

SMTA-3 lokalisiert cytosolisch. Eine Fluoreszenz in Organellen oder der Vakuole ist nicht nachweisbar, auch nicht während der sexuellen Entwicklung in den Zellen der sich entwickelten Perithezien. Da in dieser Studie keine biologische Funktion von SMTA-3 nachgewiesen werden konnte, kann an dieser Stelle aus der Lokalisation des MAT1-1-3 Proteins aus *S. macrospora* keine weiteren Schlüsse gezogen werden. SMTA-3 verfügt weder über bekannte funktionelle Domänen, noch ein bekanntes Lokalisierungssignal. Ob die hier gefundene Lokalisation für homologe Proteine aus anderen Pilzen anwendbar ist, ist aufgrund dieser fehlenden Domänen fraglich.

Für das Kreuzungstyp-Protein MAT1-1-2 (SMTA-2) konnten ebenfalls Fluoreszenzplasmide hergestellt und in *S. macrospora* transformiert werden. Beide Fusionsproteine, A2_dsRed und A2_GFP, lokalisieren im Cytosol (Abb. 18). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der vorausgesagten Lokalisation des homologen Proteins SMR1 aus *P. anserina*, welches laut Debuchy und Turgeon (2006) ebenfalls im Cytosol lokalisiert sein soll. Eine *in silico* Voraussage mittels des Programms WolfPSORT (Horton, *et al.*, 2007) (<http://wolfpsort.org>) erbrachte ebenfalls das Cytoplasma als wahrscheinlichste Lokalisation des SMTA-2 Proteins in *S. macrospora*. Eine zusätzliche Lokalisation im Zellkern wird vorausgesagt, lässt sich mit den hier vorgestellten Daten jedoch nicht bestätigen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass weder SMTA-2_GFP noch SMTA-2_dsRed *in vivo* voll funktionell sind. Die Funktionalität der Fusionsproteine wurde dabei im Hintergrund der Δ SmtA-2 Mutante untersucht. Bei voller Funktionalität hätten die Fusionsproteine in der Lage sein müssen, den sterilen Phänotyp der Deletionsmutante zu komplementieren, was für beide Proteine nicht der Fall war (s. Anhang A2). Im Gegensatz zu Δ SmtA-2 allein, sind die Fluoreszenzstämme in der Lage, größere, pigmentierte Perithezieren zu bilden, was in der Deletionsmutante niemals beobachtet wird. Diese Perithezieren erreichen jedoch nicht die Größe im Wt und es konnten weder Asci noch Ascosporen gefunden werden. Die Komplementation ist also partiell, aber nicht vollständig. Beide Fluoreszenzproteine, dsRed und GFP, sind C-Terminal an das SMTA-2 Protein fusioniert. Wie in den Komplementationsanalysen gezeigt (s. 5.2), scheint dieser Bereich des Proteins für die Funktionalität essentiell zu sein. Die Fusion eines Fluoreszenzproteins an diesen essentiellen Teil des MAT1-1-2 Proteins scheint die Funktionalität weitestgehend einzuschränken. Die hier gezeigten Daten über die intrazelluläre Lokalisation des MAT1-1-2 Proteins in *S. macrospora* müssen also als vorläufig betrachtet werden. Solange kein voll funktionales SMTA-2 innerhalb der Zelle lokalisiert werden kann, eventuell über eine N-Terminale Fusion mit einem Fluoreszenzprotein, kann über die Lokalisation keine allgemein gültige Aussage getroffen werden.

5.4. Die Proteine SMTA-1 und SMTA-2 sind an der Regulation der Expression von Pheromon-Genen beteiligt

In der Gruppe der Ascomyceten liegen zwei Pheromon- und entsprechende Rezeptor-Gene in einem Genom vor. In *S. cerevisiae* und *P. anserina* konnte gezeigt werden, dass diese Gene

direkt durch die Kreuzungstyp-Proteine reguliert werden (Coppin, *et al.*, 2005; Herskowitz, 1989). In anderen heterothallischen Arten wie *N. crassa* oder *P. anserina* werden die Pheromon-Gene in einem Kreuzungstyp-spezifischen Muster exprimiert und sind essentiell für männliche Fertilität der Stämme (Bobrowicz, *et al.*, 2002; Coppin, *et al.*, 2005; Kim H. und Borkovich, 2006).

In *S. macrospora* und anderen homothallischen Ascomyceten werden sowohl die Pheromonvorläufer-Gene als auch die Rezeptor-Gene konstitutiv exprimiert (Kim H. K., *et al.*, 2008; Paoletti, *et al.*, 2007; Pöggeler, 2000; Pöggeler und Kück, 2001) und in *S. macrospora* sind sie an der sexuellen Entwicklung beteiligt (Mayrhofer, *et al.*, 2006).

In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass das Kreuzungstyp-Protein SMTa-1 an der Regulation der Expression des Pheromonvorläufer-Gens *ppg-2* beteiligt ist (Pöggeler, *et al.*, 2006b). Die Ergebnisse dieser Studie konnten hier noch einmal bestätigt werden (Abb. 12). Die mRNA Menge des Pheromon-Gens *ppg-2* ist in der Δ Smta-1 Deletionsmutante um das bis zu 500fache erniedrigt verglichen zum Wildtyp.

In der Deletionsmutante Δ SmtA-1 ist die Expression beider Pheromon-Gene *ppg-1* und *ppg-2* um das 60- bzw. 16fache herunterreguliert (Abb. 12, 24). Während also SMTa-1 ausschließlich die Expression eines Pheromon-Gens (*ppg-2*) reguliert, ist das Kreuzungstyp-Protein SMTA-1 direkt oder indirekt an der Regulation beider Gene (*ppg-1* und *ppg-2*) beteiligt. In früheren Hefe-Zwei-Hybrid Analysen wurde gezeigt, dass SMTa-1 und SMTA-1 in der Lage sind miteinander zu interagieren (Jacobsen, *et al.*, 2002). Die hier vorgestellten Daten lassen den Schluss zu, dass das Lipopeptid-Gen *ppg-2* direkt oder indirekt von dem Kreuzungstyp-Protein SMTa-1 reguliert wird, während in die Regulation der Genexpression des Peptidpheromons *ppg-1* ein Heterodimer aus SMTA-1 und SMTA-1 involviert ist.

Außerdem konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass Einzelmutanten der Pheromon- oder Rezeptor-Gene keinen Phänotyp bezüglich der vegetativen oder sexuellen Entwicklung zeigten (Mayrhofer, *et al.*, 2006). Doppeldeletionen der Pheromon-Rezeptor-Paare (Δ ppg-1/ Δ pre-2 oder Δ ppg-2/ Δ pre-1) und eine Doppeldeletion beider Pheromon-Gene (Δ ppg-1/ Δ ppg-2) zeigten dagegen eine drastisch reduzierte Anzahl an Perithezien und Ascosporen verglichen zum Wildtyp, alle Deletionen waren jedoch grundsätzlich fertil. Die einzige sterile Deletionsmutante stellt die Doppeldeletion beider Pheromon-Rezeptoren (Δ pre-1/ Δ pre-2) dar (Mayrhofer, *et al.*, 2006).

Diskussion

Bei der Herunterregulierung beider Pheromon-Gene in der Kreuzungstyp-Mutante Δ SmtA-1 zeigte sich dagegen kein Unterschied zum Wildtyp in der Anzahl der Perithezien und Ascosporen (Abb. 8). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Expressionsstärke eines oder beider Pheromon-Gene immer noch hoch genug ist, um eine Wildtyp-ähnliche sexuelle Entwicklung zu ermöglichen. Dies ist sehr wahrscheinlich, da gerade das Pheromon-Gen *ppg-2* in Δ SmtA-1 nur um das 16fache herunterreguliert ist, im Gegensatz zu *ppg-1* (60fach) oder *ppg-2* in Δ Smta-1 (500fach). Außerdem sind, wie bereits ausgeführt, die Pheromone für die sexuelle Entwicklung in *S. macrospora* wichtig, aber nicht essentiell (Mayrhofer, *et al.*, 2006). Essentiell dagegen sind die Pheromon-Rezeptoren, welche in der Mutante Δ SmtA-1 jedoch nicht differentiell reguliert sind im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 12).

In der sterilen Mutante Δ SmtA-2 ist die Expression des Lipopeptid-Pheromon *ppg-2* um das 20fache heraufreguliert (Abb. 12, 24). Ein ähnlicher Phänotyp konnte in einer Reihe sogenannter pro-Mutanten gefunden werden (Nowrousian, *et al.*, 2005). Diese Mutanten wurden nach ihrem gemeinsamen Phänotyp benannt. Sie sind, ähnlich wie Δ SmtA-2, steril und die sexuelle Entwicklung blockiert im Stadium junger Protoperithezien. Dabei stellen die verschiedenen *pro*-Gene sehr unterschiedliche Klassen von Genen dar. So kodiert *pro1* für einen Zinkfinger Transkriptionsfaktor (Masloff, *et al.*, 2002; Masloff, *et al.*, 1999), während das Protein PRO11 cytosolisch und membranständig lokalisiert ist und Ähnlichkeiten mit Striatin aus Säugetieren aufweist (Pöggeler und Kück, 2004). PRO40 schließlich ist assoziiert mit Woronin-Bodies in *S. macrospora* (Engh, *et al.*, 2007b).

All diesen Mutanten, einschließlich Δ SmtA-2, ist gemein, dass sie steril sind und nicht in der Lage, reife Perithezien oder Ascosporen zu bilden. Die gesteigerte Expression des Pheromon-Gens *ppg-2* scheint dabei allerdings keine Rolle zu spielen, da eine Überexpression des Gens in Wildtyp keinen Phänotyp zeigte (Daten nicht gezeigt). In dem homothallischen *G. zae* konnte das Transkript des Pheromon-Gens *GzPPG1* weder in Δ MAT1-1 noch in Δ MAT1-2 Stämmen nachgewiesen werden. Die Transkriptmenge des Gens *GzPPG2* dagegen war in einer Δ MAT1-1 Mutante deutlich erhöht (Kim H. K., *et al.*, 2008). Da hier jedoch alle *MAT1-1* spezifischen Gene, *MAT1-1-1*, *MAT1-1-2* und *MAT1-1-3* deletiert waren, lässt sich nicht sagen, welche Gendeletion die Heraufregulierung von *GzPPG2* verursachte (Lee J., *et al.*, 2003). In dem homothallischen Ascomyceten *A. nidulans* zeigte eine Deletion des

MATI-1-1 Gens keinerlei Einfluss auf die Expression des Peptidpheromon-Gens *ppgA* oder der Pheromon-Rezeptoren (Paoletti, *et al.*, 2007).

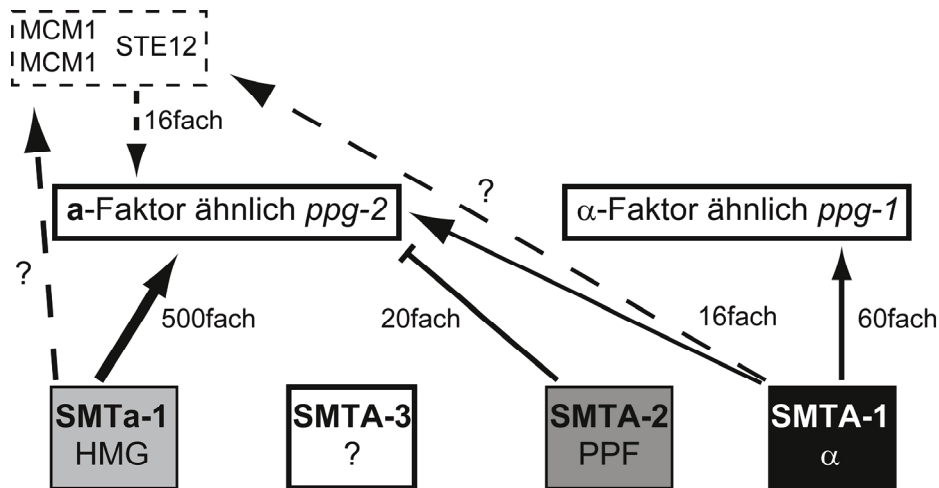


Abbildung 24: Modell der Regulation der Pheromon-Gene durch die Kreuzungstyp-Proteine in *S. macrospora*. Während SMTa-1 und SMTA-1 die Expression der Pheromon-Gene positiv regulieren, hemmt SMTA-2 die Expression von *ppg-2*. Bekannte Interaktionspartner, welche bei den Regulationen eine Rolle spielen könnten, sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet (nach Jacobsen, *et al.*, 2002; Nolting und Pöggeler, 2006a; Nolting und Pöggeler, 2006b).

Die Expression der Pheromon-Rezeptor Gene *pre-1* und *pre-2* war dagegen weder in Δ SmtA-1 noch in Δ SmtA-2 im Vergleich zum Wildtyp verändert (Abb. 12). Dies ist ähnlich zu *N. crassa* wo die Kreuzungstyp-Proteine ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression der Rezeptoren zeigen (Pöggeler und Kück, 2001).

Grundsätzlich lässt sich nach diesen Ergebnissen sagen, dass die Expression der Pheromon-Gene in homothallischen Pilzen deutlich weniger stark reguliert zu sein scheint als die stringente Kreuzungstyp-spezifische Regulation in heterothallischen Pilzen.

5.5. Die Kreuzungstyp-Proteine SMTA-1 und SMTA-2 regulieren die Expression verschiedener Gene

In dieser Studie wurde eine Microarray Analyse mit *N. crassa* Chips durchgeführt um die Rolle der *MATI-1* spezifischen Kreuzungstyp-Proteine SMTA-1 und SMTA-2 bei der Regulation anderer Gene als die der Pheromone und Rezeptoren zu untersuchen. In der Mutante Δ SmtA-1 waren 978 Gene und in der Mutante Δ SmtA-2 853 Gene im Vergleich zum Wildtyp um das wenigstens 2fache herauf- oder herunterreguliert ($P < 0,05$) (Abb. 13). Ein

Großteil dieser Gene war in beiden Mutanten auf die gleiche Weise reguliert. Nur 7,5% (Δ SmtA-1) bzw. 13% (Δ SmtA-2) der als differentiell reguliert gefundenen Gene waren heraufreguliert. In *S. cerevisiae* aktiviert das SMTA-1 Ortholog α 1p zusammen mit den Transkriptionsfaktoren STE12 und MCM1 (Bruhn und Sprague, 1994; Yuan, *et al.*, 1993) die Expression fünf *MAT α* spezifischer Gene (Galgoczy, *et al.*, 2004). Das Kreuzungstyp-Protein SMTA-1 interagiert in *S. macrospora* ebenfalls mit den Transkriptionsfaktoren STE12 und MCM1 (Nolting und Pöggeler, 2006a; b), jedoch scheint eine weit größere Anzahl an Genen von SMTA-1 reguliert zu sein als von α 1p in *S. cerevisiae*. In dieser Studie wurden allerdings, im Gegensatz zu der in Hefe, direkte wie auch indirekte Regulationen nachgewiesen. Es ist daher wahrscheinlich, dass zumindest ein Teil der hier gefundenen Regulationen indirekt erfolgt.

Das Kreuzungstyp-Protein SMTA-2 erhält keine bekannten Domänen welche spezifisch für eine DNA-Bindung oder einen Transkriptionsfaktor sind. Es interagiert nachweislich nicht mit den Transkriptionsfaktoren SMTa-1 oder SMTA-1 oder den assoziierten Transkriptionsfaktoren STE12 oder MCM1 (Jacobsen, *et al.*, 2002; Nolting und Pöggeler, 2006a; b). Trotzdem wurden in der Microarray Analyse eine große Anzahl von Genen als differentiell reguliert identifiziert. Bei einem Vergleich beider Mutanten konnten 519 Gene gefunden werden, welche in beiden Mutanten dereguliert sind. Dies lässt, trotz der sehr unterschiedlichen Phänotypen beider Mutanten vermuten, dass beide Proteine an den gleichen metabolischen oder regulatorischen Prozessen beteiligt sind, obwohl sie nicht direkt interagieren.

Zusätzlich durchgeführte real-Time-PCR Analysen waren in Übereinstimmung mit den Microarray Ergebnissen. Die Regulation der Gene *sod-2* und *ctr-3* durch die beiden Kreuzungstyp-Proteine SMTA-1 und SMTA-2 (Abb. 16) macht eine Beteiligung beider Proteine an der Kupferhomeostase wahrscheinlich. In *P. anserina* konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor GRISEA, welcher vom Kupferspiegel innerhalb der Zelle abhängig ist, einen wichtigen Einfluss auf den Phänotyp und die Lebensspanne von *P. anserina* hat (Borghouts, *et al.*, 1997). Eine Mutation des *grisea* Gens führt zu einer veränderten Morphologie, Defekten in der Perithezienbildung und einer verlängerten Lebensspanne (Borghouts und Osiewacz, 1998). Die Gene *PaSod2* (NCU01213 in *N. crassa*), welches für eine mitochondriale Superoxiddismutase kodiert, und *PaCtr3* (NCU00830 in *N. crassa*), eine hochaffine Kupferpermease, wurden als Zielgene der Regulation durch

GRISEA identifiziert (Borghouts, *et al.*, 2002a; Borghouts, *et al.*, 2001). In *S. macrospora* sind die beiden homologen Gene *sod-2* und *ctr-3* in den Mutanten Δ SmtA-1 und Δ SmtA-2 signifikant herunterreguliert, obwohl das Homolog zu *grisea* (NCU04773 in *N. crassa*) selbst nicht beeinflusst wird. Außerdem konnten Homologe zu einer gering-affinen Kupferpermease (NCU03281), einem Metallothionein Gen (NCU05561) und einem Gen (NCU00829), welches ähnlich einem Kupfer-Transporter („cupric reductase FRE2 facilitating copper uptake“) in *S. cerevisiae* ist (Georgatsou, *et al.*, 1997), als herunterreguliert in beiden Mutanten identifiziert werden. Einen Einfluss auf die sexuelle Entwicklung scheint die Regulation der Kupferhomeostase jedoch nicht zu haben, da in beiden Mutanten, der fertilen Δ SmtA-1 und der sterilen Δ SmtA-2, die fraglichen Gene gleich reguliert sind. Außerdem konnte der sterile Phänotyp von Δ SmtA-2, im Gegensatz zu der *P. anserina* GRISEA Mutante (Marbach, *et al.*, 1994), durch eine Zugabe von Kupfer zum Medium nicht komplementiert werden (Daten nicht gezeigt).

Da Δ SmtA-1 in der Lage ist, Perithezieren und keimfähige Ascosporen zu bilden, kann die Sterilität von Δ SmtA-2 nicht durch die Deregulation der in beiden Mutanten gefundenen Gene verursacht werden. Von den 854 in Δ SmtA-2 deregulierten Genen, waren 225 Gene herauf- und 86 Gene herunterreguliert, die in Δ SmtA-1 nicht als differentiell reguliert identifiziert werden konnten. Diese Gene scheinen also spezifisch für *SmtA-2* zu sein und damit wahrscheinlich involviert in die Fruchtkörperentwicklung und damit die Fertilität in *S. macrospora*. Zwei dieser Gene sind dabei in die Kontrolle des Zellzyklus involviert. Das Gen, welches homolog zu NCU02683 aus *N. crassa* ist, kodiert für die Untereinheit 3 des „origin recognition complex“ (ORC). ORC3 ist hochkonserviert und essentiell in allen Eukaryoten (Duncker, *et al.*, 2009). Der ORC bindet an die Startpunkte der DNA-Replikation und rekrutiert Präreplikative Komplex Proteine in der G₁-Phase des Zellzyklus, welcher dann in der S-Phase die Replikation durchführt. Zusätzlich ist der ORC an der Heterochromatinbildung beteiligt (Bell und Dutta, 2002). In *Drosophila melanogaster* und verschiedenen Säugetieren konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Deletion oder Deregulation des homologen Gens zu schweren Störungen der Zellproliferation führt (Huang, *et al.*, 2005; Pinto, *et al.*, 1999).

Ähnlich dazu wurde die mRNA Menge des Orthologs des *S. cerevisiae* Proteins CDC23 als signifikant reduziert in Δ SmtA-2 gefunden. CDC23 ist eine essentielle Untereinheit des „Anaphase Promoting Complex/Cyclosome“ (APC/C), einer Ubiquitin-Protein Ligase,

Diskussion

welche für die Degradation von Anaphase-Inhibitoren während der mitotischen Metaphase/Anaphase benötigt wird (Pesin und Orr-Weaver, 2008). Beide Gene sind in der Mutante Δ SmtA-2 signifikant herunterreguliert (Abb. 17), was auf einen Einfluss von SMTA-2 auf den Zellzyklus hinweist. SMTA-2 könnte dabei als ein Aktivator der DNA Replikation und der Zellproliferation dienen, durch die Regulation der Genexpression von *orc-3* und *cdc-23*. Andere Untereinheiten des ORC oder APC/C konnten allerdings in Δ SmtA-2 nicht als differentiell reguliert identifiziert werden.

Bei einem Vergleich mit früheren Microarray Analysen anderer, steriler *S. macrospora* Mutanten, konnten vier Gene identifiziert werden, welche in allen herunterreguliert waren (Tab. 6).

Tabelle 6: Gene, welche bei Microarray Analysen in verschiedenen sterilen Mutanten als differentiell reguliert gefunden wurden. Zwei Gene waren außerdem in der fertilen Mutante Δ SmtA-1 als dereguliert gefunden. Angegeben sind die log₂ Verhältnisse der Genexpression zwischen Mutante und Wildtyp.

Nummer	Beschreibung	pro1	pro11	pro22	Δ Smta-1	Δ SmtA-2	Δ SmtA-1
NCU04533	abundant perithecial protein (APP), <i>Sordaria macrospora</i>	-3,64	-4,27	-3,12	-2,99	-2,43	0,6
NCU04928	mold-specific MS8 protein, <i>Ajellomyces capsulatus</i>	-3,31	-2,22	-3,07	-3,11	-1,07	-0,65
NCU09111	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, <i>Neurospora crassa</i>	-1,85	-1,02	-1,77	-1,33	-1,06	-0,48
NCU09390	tetrahydroxynaphthalene reductase, <i>Sordaria macrospora</i>	-2,32	-1,68	-2,00	-2,19	-1,79	-0,39
NCU04931	putative G protein-coupled receptor alpha (<i>Botryotinia fuckeliana</i>)	-2,89	-3,52	-3,28	-3,24	-1,48	-1,21
NCU08055	bZip transcription factor (<i>Neurospora crassa</i>); IDI-4 (<i>Podospira anserina</i>)	-1,09	-1,54	-1,59	-2,18	-1,63	-1,15

Zusätzlich wurden zwei Gene gefunden, welche in allen sterilen Mutanten und der fertilen Δ SmtA-1 Mutante herunterreguliert waren.

Zu den Genen, welche in den sterilen Mutanten herunterreguliert waren, zählen die Gene *app1* und *tih*. Das Protein APP (abundant perithecial protein) wird dabei in reifen Perithezien gefunden und kommt niemals in sterilen Mutanten vor (Nowrousian, *et al.*, 2007b). Das Gen *tih* kodiert für eine Trihydroxynaphtalenreduktase, einen Bestandteil des Melanin Biosyntheseweges (Engh, *et al.*, 2007a). Die Gene der Melanin Biosynthese sind in Δ SmtA-2 signifikant herunterreguliert, in Δ SmtA-1 dagegen nicht (Abb. 15). Melanin wird in *S. macrospora* hauptsächlich in reifen Perithezien und Ascosporen gefunden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Expression dieser vier Gene Fruchtkörper-spezifisch und nicht Kreuzungstyp-spezifisch ist.

5.6. SMTA-2 interagiert mit verschiedenen regulatorischen Proteinen

Um mögliche Interaktionspartner des Kreuzungstyp-Proteins SMTA-2 zu identifizieren, wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid Analyse gegen eine *S. macrospora* cDNA-Bank durchgeführt. Das Plasmid pGB-A2 wurde zuvor in einem pGAD-ranBPM und pGADT7 Hintergrund auf Funktionalität bzw. Transaktivierung getestet (Abb. 19).

In dieser Analyse konnten 48 putative Interaktionspartner identifiziert werden (Tab. 5). Diese wurden erneut mit den Plasmiden pGB-A2 und pGBKT7 als Negativkontrolle auf spezifische Interaktion mit SMTA-2 untersucht (Abb. 20). Dabei wurde für die Proteine 1, 6, 15, 23, 35 und 48 eine Interaktion auch mit der *GAL4*-Bindedomäne allein (pGBKT7) nachgewiesen. Diese Proteine wurden daraufhin als nicht-spezifische Interaktionen verworfen.

Die anderen Proteine, welche als putative Interaktionspartner von SMTA-2 festgestellt wurden, decken eine breite Varianz möglicher Funktionen ab. So wurden fünf putative Transkriptionsfaktoren (2, 16, 25, 46) gefunden, drei Proteine, welche in die Vermittlung der Zellpolarität und Hyphenseptierung involviert sind (8, 22, 42) und drei Proteine (14, 20, 34), welche generell an der sexuellen Entwicklung beteiligt sind (Abb. 25).

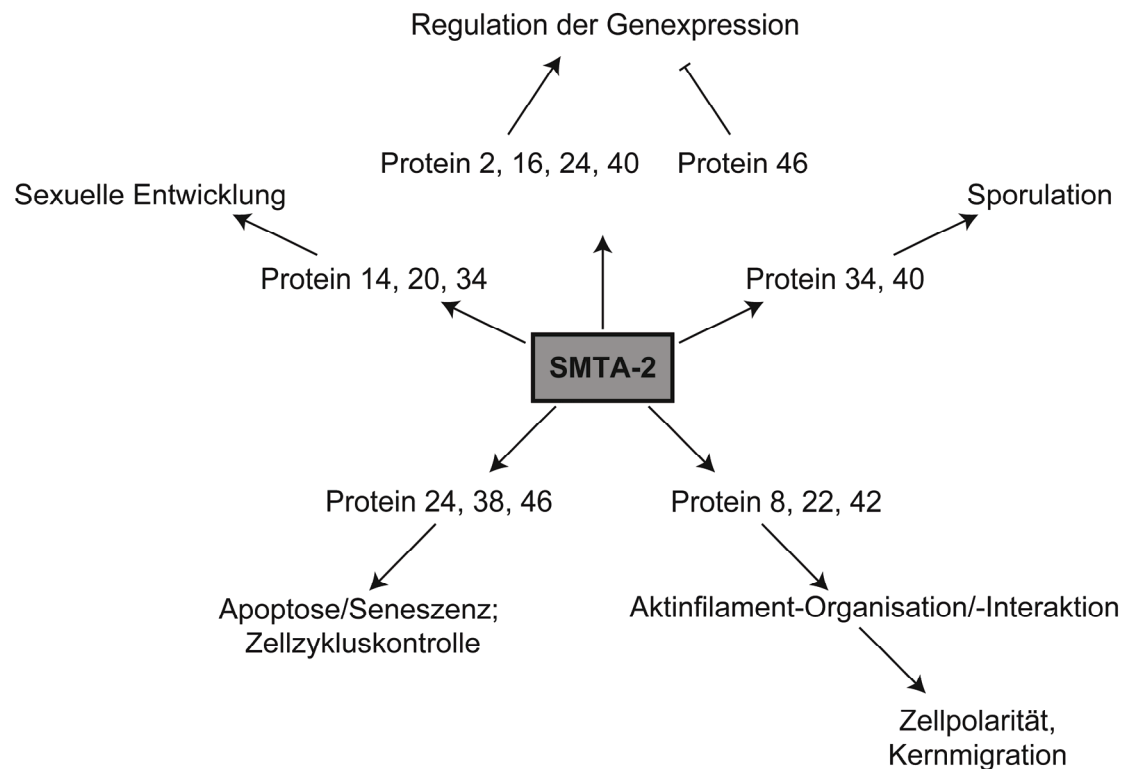


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Prozesse in welche putative Interaktionspartner von SMTA-2 involviert sind. Die angegebenen Nummern entsprechen den Proteinen in Tab. 5. Bekannte Funktionen der Interaktionspartner wurden den Datenbanken NcD, AD und SGD entnommen und sich in Tab. 5 als Referenzen angegeben.

Die Homologe zu den vier Proteinen 2, 16, 25 und 46 stellen in anderen Organismen bekannte Regulatoren der Genexpression dar (Chen H., *et al.*, 1998; Collart und Struhl, 1994; Masloff, *et al.*, 1999; Sanchez, *et al.*, 1998).

Das Protein 2 stellt dabei ein Homolog zu dem Protein AAB-1 aus *N. crassa* dar. Dieses Protein konnte als DNA-Bindefaktor identifiziert werden, welcher die gleiche Spezifität wie der HAP2/3/4/5 Heteromerkomplex aus *S. cerevisiae* besitzt (Chen H. und Kinsey, 1995). Mutationen im *aab-1* Gen führen in *N. crassa* zu reduziertem vegetativem Wachstum und einer verringerten Anzahl an mitotisch gebildeten Konidiosporen. Außerdem zeigt eine solche Mutante weibliche Sterilität, ist aber weiterhin männlich fertil (Chen H., *et al.*, 1998). Von den bekannten Genen aus *N. crassa*, welche durch AAB-1 reguliert werden, (NCU01808, NCU06189, NCU05689 und NCU09816) konnte lediglich das Gen NCU01808 in der Δ SmtA-2 Mutante als differentiell reguliert identifiziert werden (s 4.1.5). Für das homologe Hefeprotein HAP5 sind dabei in der SGD 132 verschiedene Interaktionspartner eingetragen (Costanzo, *et al.*, 2010). Ein solcher Wert lässt auf einen eher unspezifischen

Diskussion

Interaktionspartner schließen, dies lässt sich durch die hier durchgeführten Experimente jedoch nicht bestätigen.

Protein 16 zeigt Homologien zu einem putativen C6 Transkriptionsfaktor aus *A. fumigatus* (MacPherson, *et al.*, 2006). In *S. macrospora* konnte für einen C6 Zinkfinger Transkriptionsfaktor (PRO1) bereits eine Beteiligung an der sexuellen Entwicklung gezeigt werden (Masloff, *et al.*, 1999). Protein 16 zeigt außer dem C6 Konsensusmotiv allerdings keine Ähnlichkeit zu PRO1.

Das Protein 25 zeigt Homologien zu dem Protein ABP2 aus *S. pombe*. ABP2 ist beschrieben als Bindeprotein von Autonom-Replizierenden-Sequenz (ARS) Elementen (Sanchez, *et al.*, 1998). ARS Elemente stellen den Startpunkt der Replikation auf chromosomalen Sequenzen dar, welche auch die autonome Replikation von Plasmiden unterstützen. Für ABP2 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein an der Kontrolle des Eintritts in die Mitose beteiligt ist (Sanchez, *et al.*, 1998). Obwohl in *S. pombe* ein Einfluss von ABP2 nur auf die Mitose beschrieben ist, kann ein ähnlicher Einfluss auf die Meiose und die damit verbundene sexuelle Entwicklung in *S. macrospora* nicht ausgeschlossen werden. In einer ABP2 Mutante in *S. pombe* konnte außerdem gezeigt werden, dass ABP2 eine Rolle im UV-induzierten Zellzyklusarrest spielen könnte (Sanchez, *et al.*, 1998). Da ein Zellzyklusarrest während der sexuellen Entwicklung in *P. anserina* (Debuchy und Turgeon, 2006) und *S. macrospora* vorhergesagt ist, erscheint ein Zusammenhang mit dem homologen Protein ABP2 sinnvoll.

Das Protein 46 schließlich zeigt Homologien zu dem CCR4-NOT Komplex aus *S. cerevisiae*. Dieser Komplex stellt einen negativen Regulator verschiedener Gene dar, welche verschiedene zelluläre Funktionen übernehmen (Collart und Struhl, 1994). Eine Mutation des Proteins NOT2 führt dabei zu einem G₁-Zellzyklusarrest und einem konstitutiv aktivierten Pheromon Signalweg (de Barros Lopes, *et al.*, 1990; Reed, 1980; Shuster und Byers, 1989). Homologe der Gene, welche in *S. cerevisiae* durch den CCR4-Not Komplex negativ reguliert werden (*HIS4*, *TBP*, *STE4*, *BIK1*) (Collart und Struhl, 1993; 1994; de Barros Lopes, *et al.*, 1990), wurden in den Microarray Analysen der Δ SmtA-2 Mutante erneut als nicht reguliert identifiziert. Für das Protein NOT2 sind in der SGD 80 Interaktionspartner unterschiedlicher Funktion eingetragen. Dies lässt, ähnlich wie bei Protein 2 auf einen unspezifischen Interaktionspartner schließen.

Ein Einfluss auf den Zellzyklus kann auch für die Proteine 24 und 38 angenommen werden. Protein 24 zeigt Homologien zu PHB2, einer Untereinheit des Prohibitin-Komplexes in Hefe.

Dieser Komplex lokalisiert an den Mitochondrien und hat Einfluss sowohl auf die Funktionalität der Mitochondrien, als auch auf die Lebensspanne des gesamten Organismus (Coates, *et al.*, 1997). Mutanten in *S. cerevisiae* zeigen dabei einen verlängerten Zellzyklus. Das Protein 38 dagegen zeigt Homologien zu OYE2 in *S. cerevisiae*. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Regulation radikaler Sauerstoffspezies (ROS) und damit der Regulation des Programmierten Zelltods („programmed cell death“, PCD) (Odat, *et al.*, 2007). PCD in Hefe kann dabei, unter anderem, durch einen Überschuss an Pheromon während der sexuellen Phase ausgelöst werden (Severin und Hyman, 2002) als auch einen Effekt der natürlichen Seneszenz darstellen (Herker, *et al.*, 2004). OYE2 kann dabei durch die Neutralisierung des von Mitochondrien gebildeten ROS und der Interaktion mit Aktin-Filamenten, den Zelltod sowohl verhindern, als, durch die Interaktion mit dem Protein OYE3, auch hervorrufen (Odat, *et al.*, 2007).

Weitere gefundene Interaktionspartner (Proteine 8, 22, 42) stehen mit Zellpolarität und Septierung im Zusammenhang (März, *et al.*, 2009; Seiler und Plamann, 2003; Winter, *et al.*, 1997). Die Proteine 8 und 22 wurden in dem filamentösen Ascomyceten *N. crassa* bereits umfassend untersucht (März, *et al.*, 2009; Vogt und Seiler, 2008). Ein direkter Zusammenhang mit der sexuellen Entwicklung in *N. crassa* wurde dabei nicht beschrieben. Sowohl das RHO1-spezifische GTPase-aktivierende Protein LRG1 (Protein 22) als auch die Peptid N-Glycanase 1 (Protein 8) sind an der Vermittlung der Zellpolarität in vegetativen Hyphen und dem Septierungsprozess beteiligt (März, *et al.*, 2009; Seiler und Plamann, 2003; Vogt und Seiler, 2008). Für Homologe des Proteins 42, einer Untereinheit des Actin-zugehörigen Protein („actin-related protein“, ARP) Komplexes, ist bekannt, dass sie in *S. cerevisiae* ebenfalls an der Vermittlung der Zellpolarität beteiligt sind (Winter, *et al.*, 1997) und dass LRG1 aus *S. cerevisiae* mit dem ARP2/3 Komplex interagiert (Costanzo, *et al.*, 2010). Für *N. crassa* und *S. macrospora* konnte die Beteiligung von Actin-Filamenten und zugehöriger Komplexe auch an der Kernmigration und der Septierung ascogener Hyphen gezeigt werden (Roca, *et al.*, 2010; Thompson-Coffe und Zickler, 1993).

Ein grundsätzlicher weiterer Aspekt ist die Regulation der Genexpression durch Aktin (Zheng, *et al.*, 2009). Dabei wird die Transkription sowohl durch die von Aktin vermittelte Remodulierung der Chromatinstruktur (Shen X., *et al.*, 2003) als auch durch den Transport von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern oder aus ihm hinaus (Favot, *et al.*, 2005; Haller, *et al.*, 2004) reguliert. Bei all diesen unterschiedlichen Funktionen spielen Aktin-bindende

Diskussion

Proteine (ABP) eine essentielle Rolle (dos Remedios, *et al.*, 2003). Für den ARP2/3 Komplex konnte bisher keine Beteiligung an regulatorischen Prozessen gezeigt werden, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Der putative Interaktionspartner 34 ist homolog zu Sec5p aus *S. cerevisiae*, einer Untereinheit des Exocyst Komplexes (TerBush, *et al.*, 1996). Der Exocyst Komplex ist in Hefe und anderen eukaryotischen Organismen an der Anbindung und räumlichen Kontrolle von post-Golgi Vesikeln an der Plasmamembran vor der Vesikelfusion beteiligt (Guo, *et al.*, 1999; Mehta, *et al.*, 2005). In den unizellulären Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnte eine Beteiligung des Exocyst Komplexes auch an der sexuellen Entwicklung nachgewiesen werden (Neiman, 1998; Sharifmoghadam, *et al.*, 2010). Dabei spielt der Exocyst Komplex sowohl eine Rolle bei der Agglutination zweier kompatibler Kreuzungspartner, als auch in der post-meiotischen Sporulation. Zusätzlich dazu konnte in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden, dass die Rho-GTPase CDC42 mit dem Exocyst Komplex interagiert (Yamashita, *et al.*, 2010). Durch CDC42 kann damit eine indirekte Interaktion zwischen LRG1 (Interaktionspartner 22) und dem Exocyst Komplex (Interaktionspartner 34) und damit auch SMTA-2 hergestellt werden. Während in dem homothallischen Ascomyceten *S. macrospora* die Agglutination zweier Kreuzungspartner unwahrscheinlich ist, lässt die Beteiligung des Exocyst Komplexes an der Sporenbildung auf eine Regulation dieses Prozesses durch das Protein SMTA-2 schließen.

Eine Beteiligung an der Sporenbildung konnte auch für das homologe Hefe Protein zu dem Interaktionspartner 40 nachgewiesen werden (Siniosoglou, *et al.*, 1998). Mutanten des sogenannten Nem1p Proteins zeigen dabei eine veränderte Zellkernmorphologie und Sporenbildung. Während die mitotische Vermehrung nicht beeinträchtigt ist, sind die Mutanten nicht in der Lage, Meiosporen zu bilden (Siniosoglou, *et al.*, 1998). Es wurde dabei vorgeschlagen, dass ein Komplex aus Nem1p-Spo7p die Kernmembranproliferation negativ reguliert und somit ein Auswachsen der Kernmembran an bestimmten Stellen verhindert. Dies könnte wiederum auch durch eine Inhibition der Biosynthese besonders langkettiger Fettsäuren zu erklären sein (Schneiter, *et al.*, 1996). Passend dazu wurde für SMTA-2 auch ein Gen der Fettsäuresynthese als putativer Interaktionspartner identifiziert (Protein 18).

In *N. crassa* konnte von Duarte und Videira (2000) gezeigt werden, dass die Funktionalität des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette für die sexuelle Entwicklung essentiell ist.

Eine Untereinheit dieser Atmungskette konnte auch als Interaktionspartner von SMTA-2 identifiziert werden (Protein 14). Die Regulation von Stoffwechselprozessen scheint dabei gerade während der sexuellen Entwicklung stark kontrolliert zu sein, da Defekte an Komplex I in *N. crassa* keine Auswirkungen auf das vegetative Wachstum zeigen (Duarte und Videira, 2000). Auch in *S. macrospora* konnte bereits gezeigt werden, dass Stoffwechselprozesse einen Einfluss auf die sexuelle Entwicklung haben. So führen Defekte in der ATP Citratlyase ACL1 zu Sterilität (Nowrousian, *et al.*, 1999). Das Protein ACL1 spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Acetyl-CoA Synthese, welches wiederum in Eukaryoten hauptsächlich für die Fettsäure- und Sterolbiosynthese benötigt wird. Dies verweist wiederum auf Interaktionspartner 18. Ein weiterer Interaktionspartner, welcher in die Acetyl-CoA Synthese involviert sein könnte, ist Interaktionspartner 19 (Schneiter, *et al.*, 1996). Zusätzlich konnten verschiedene andere Proteine gefunden werden, welche an unterschiedlichen Stoffwechselprozessen beteiligt sind (bspw. Protein 7, 10, 32, 33, 39, 41, 45). So zeigt das Protein 33 Homologien zu einer Ornithintransamidase aus *S. cerevisiae*, welche am Arginin Metabolismus beteiligt ist (Middelhoven, 1964). Für das entsprechende *S. cerevisiae* Gen *CAR2* konnte gezeigt werden, dass der Kreuzungstyp eine Rolle bei der Transkriptionsstärke spielt (Deschamps und Wiame, 1979) und der Transkriptionsfaktor MCM1 an der Regulation der Genexpression beteiligt ist (Messenguy und Dubois, 1993). MCM1 konnte dabei bereits als Interaktionspartner des Kreuzungstyp-Proteins SMTA-1 in *S. macrospora* nachgewiesen werden (Nolting und Pöggeler, 2006a).

Der putative Interaktionspartner Protein 26 stellt ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym dar. Ubiquitin-konjugierende Enzyme dienen als Ubiquitin Träger, welche das Ubiquitin auf spezifische, andere Proteine übertragen können. Das Ubiquitin dient dabei als Signalpeptid für den Abbau durch das 26S Proteasom (Jentsch und Schlenker, 1995). Durch diesen gezielten Abbau von Proteinen, werden verschiedenste zelluläre Funktionen reguliert, wie DNA Reparatur, Zellzykluskontrolle oder Zellstressantwort (Vassal, *et al.*, 1992). Dieser proteolytische Signalweg ist außerdem in den Prozess der Degradation am Endoplasmatischen Retikulum (ER) involviert (Kopito, 1997). So konnte für den filamentösen Ascomyceten *A. nidulans* nachgewiesen werden, dass das COP9-Signalosom, ein Teil der Ubiquitin-abhängigen Protein Degradation, auch eine Rolle bei der Fruchtkörperentwicklung in diesem Pilz spielt (Busch, *et al.*, 2007). Ob die Interaktion von SMTA-2 mit Protein 26 dabei eine Rolle bei der Ubiquitinierung anderer Proteine spielt oder SMTA-2 selbst Ubiquitiniert wird,

ist unklar. In einer bioinformatischen Analyse der SMTA-2 Sequenz mit zwei unabhängigen Programmen (<http://bdmpub.biocuckoo.org> (Xue, *et al.*, 2006); <http://www.ubpred.org>) wurden zwei mögliche Ubiquitinierungssequenzen in SMTA-2 an den Aminosäurepositionen 13 und 225 gefunden. Besonders die Sequenz an Position 225, also im C-Terminus des Proteins, könnte im Zusammenhang mit der essentiellen Rolle des C-Terminus (s. 5.2) eine Rolle spielen.

Viele Glykoproteine niederer wie höherer Eukaryoten werden durch sogenannte Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker in die Zellwand eingebracht (Englund, 1993; McConville und Ferguson, 1993). Das Anhängen eines GPI Ankers an spezifische Proteine ist ein essentieller Prozess, wie in *S. cerevisiae* (Leidich, *et al.*, 1994; Leidich, *et al.*, 1995; Vossen, *et al.*, 1995), *A. fumigatus* (Li, *et al.*, 2007) und *N. crassa* (Bowman, *et al.*, 2006) beschrieben. Dabei spielen GPI Anker Proteine hauptsächlich eine Rolle bei der Zellwandintegrität und zusammenhängenden Prozessen. Mutanten der GPI Anker Synthese in *N. crassa* zeigen eine veränderte Morphologie vegetativer Zellen und sind nicht in der Lage, Protoperithezien zu entwickeln (Bowman, *et al.*, 2006). Da eine GPI Anker Transamidase (Protein 49) als putativer Interaktionspartner von SMTA-2 gefunden wurde, ist ein Zusammenhang mit der sexuellen Entwicklung auch in *S. macrospora* recht wahrscheinlich.

Ein weiterer erwähnenswerter putativer Interaktionspartner ist das Protein 20. Dieses Protein stellt das α -Faktor ähnliche Pheromon PPG-1 aus *S. macrospora* dar (Pöggeler, 2000). Eine Beteiligung dieses Pheromons an der sexuellen Entwicklung konnte, wie in 5.4 beschrieben, bereits nachgewiesen werden und wird durch das Kreuzungstyp-Protein SMTA-1 positiv reguliert. Eine Regulation des entsprechenden Pheromon-Vorläufers konnte für SMTA-2 nicht nachgewiesen werden (Abb. 10). Soweit bekannt, ist diese Studie die Erste, welche eine mögliche direkte Interaktion zwischen einem Kreuzungstyp-Protein und einem Pheromon zeigt. Ob diese Interaktion eine Form der intrazellulären Signaltransduktion oder der Übertragung von Signalen unterschiedlicher Zellen oder sogar Zellkernen darstellt, ist nicht klar. Da das Gen *ppg-1* von dem Kreuzungstyp-Protein SMTA-1 reguliert wird, muss ein Einfluss der Interaktion dieses Pheromons mit SMTA-2 auf den putativen, von SMTA-1 ausgelösten und von SMTA-2 aufgehobenen Zellzyklusarrest (Abb. 23) ausgeschlossen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass putative Interaktionspartner von SMTA-2 gefunden werden konnten, die in Prozesse der Genexpressions-Regulation, der Regulation von Zellpolarität und Sporulation involviert sind als auch auf den Zellzyklus und Apoptose einen Einfluss haben. Diese putativen Interaktionen müssen allerdings noch auf ihre genaue Spezifität, gerade auch *in vivo*, getestet werden. Die Lokalisation von SMTA-2 im Cytoplasma (Abb. 18) lässt dabei vor allem ebenfalls cytoplasmatisch lokalisierte Interaktionspartner wie Protein 8, 22 und 42 möglich erscheinen, während Interaktionen mit nukleär lokalisierten Proteinen wie 2, 16, 25 und 46 möglich, aber nicht wahrscheinlich sind.

5.7. Zusammenfassung der Untersuchung der *MAT1-1* spezifischen Gene aus *S. macrospora*

5.7.1. Das α -Domänen Protein SMTA-1 ist nicht essentiell für die sexuelle Entwicklung in *S. macrospora*

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das *MAT1-1-1* Gen aus *S. macrospora* für die sexuelle Entwicklung nicht essentiell ist (s. 5.1). Damit stellt *S. macrospora* den ersten untersuchten Ascomyceten dar, in dem ein α -Domänen Protein nicht essentiell für den sexuellen Zyklus ist. Gleichzeitig konnte aber gezeigt werden, dass die Expression der Pheromon-Gene (s. 5.4) und anderer Gene (s. 5.5) von SMTA-1 reguliert wird. Außerdem konnte in früheren Studien eine Interaktion von SMTA-1 mit anderen Faktoren nachgewiesen werden, die in die Regulation der sexuellen Entwicklung involviert sind, hier vor allem STE12, MCM1 und das Kreuzungstyp-Protein SMTa-1 (Nolting und Pöggeler, 2006a; b). Durch die Interaktion mit SMTa-1 könnte dabei auch die Regulation des Pheromongens *ppg-2* erklärt werden, welche durch das Kreuzungstyp-Protein SMTa-1 (500fach) (Pöggeler, *et al.*, 2006b) deutlich stärker reguliert wird als SMTA-1 (16fach). Dies deutet darauf hin, dass sich MAT1-1-1 in *S. macrospora* im Laufe der evolutionären Entwicklung von einem Hauptregulator der sexuellen Entwicklung in einem heterothallischen Vorfahren zu einem nicht-essentiellen Faktor im jetzigen homothallischen Organismus entwickelt hat.

Das *MAT1-2-1* Gen dagegen, welches auch in anderen *Sordariomyceten* den Hauptregulator *MAT1-2*-spezifischer Funktionen darstellt, ist in *S. macrospora* für die sexuelle Entwicklung essentiell (Pöggeler, *et al.*, 2006b). Es ist denkbar, dass dieses Gen im Laufe der Evolution Punktmutationen akkumuliert hat, welche schließlich zur Fähigkeit der Selbstung führten.

Während dieses Schrittes von einem heterothallischen zu einem homothallischen Organismus, wäre das *MAT1-1-1* Gen als zweiter Regulator überflüssig. Die Regulation der Genexpression verschiedener Gene durch SMTA-1 (s. 5.4, 5.5) lassen den Schluss zu, dass die Funktion und Wichtigkeit des Kreuzungstyp-Proteins zwar eingeschränkt, jedoch in Teilen noch vorhanden ist (Abb. 26). Dies stützt außerdem die Theorie eines heterothallischen Vorfahren von *S. macrospora*.

5.7.2. Das Protein SMTA-3 zeigt keine Funktion in *S. macrospora*

Ähnlich zu SMTA-1 zeigt das Kreuzungstyp-Protein keine essentielle Funktion innerhalb des sexuellen Zyklus (s. 5.1) (Abb. 26). Im Gegensatz zu den MAT1-1-3 Proteinen anderer *Sordariomyceten* besitzt SMTA-3 keine funktionelle HMG-Domäne. Das Gen *SmtA-3* ist kotranskribiert mit dem essentiellen Kreuzungstyp-Gen *Smta-1* und eine regulatorische Funktion als *cis*-regulatorisches Element auf die Expression von *Smta-1* kann nicht ausgeschlossen werden. Offensichtlich ist allerdings auch diese putative regulatorische Funktion für die sexuelle Entwicklung und die Funktionalität von SMTa-1 nicht essentiell.

5.7.3. Das PPF-Domänen Protein SMTA-2 ist essentiell für die postmeiotische Entwicklung in *S. macrospora*

Im Gegensatz zu den Kreuzungstyp-Proteinen SMTA-1 und SMTA-3, spielt SMTA-2 eine essentielle Rolle bei der sexuellen Reproduktion. Die molekulare Funktion der MAT1-1-2 Homologe anderer *Sordariomyceten* ist unbekannt, jedoch wurde die biologische Funktion in *P. anserina* bereits untersucht. Mutationen in SMR1 (MAT1-1-2) führen zu einem kompletten Arrest der sexuellen Entwicklung nach Fertilisation und vor der Ausbildung ascogener Hyphen. Es wurde daher postuliert, dass die internukleäre Erkennung, welche während der Ausbildung der ascogenen Hyphe stattfindet, zu einem Entwicklungsarrest führt, welcher nach erfolgreicher Kernerkennung und -migration von MAT1-1-2 aufgehoben wird (Debuchy, *et al.*, 2010). In *N. crassa* zeigen Mutationen im *MAT1-1-2* Gen einen weit weniger deutlichen Phänotyp (Ferreira, *et al.*, 1998). Einzelmutanten des Gens zeigen keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp und nur Doppelmutanten mit *MAT1-1-3* zeigen eine reduzierte Fertilität. Es wurde daraus geschlossen, dass die Proteine MAT1-1-2 und MAT1-1-3 aus *N. crassa* an Postfertilisationsprozessen nach Kernmigration und Meiose beteiligt sein könnten (Ferreira, *et al.*, 1998).

Der sterile Phänotyp der Δ SmtA-2 Mutante in *S. macrospora* zeigt mehr Ähnlichkeiten zu *P. anserina* als zu *N. crassa*. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Kreuzungstyp-Gen *Smta-1* (*MAT1-2-1*) für die sexuelle Entwicklung in *S. macrospora* essentiell ist (Pöggeler, *et al.*, 2006b). In heterothallischen Vertretern der *Sordariomyceten* kontrolliert das HMG-Domänen Protein MAT1-2-1 die *MAT1-2*-spezifischen Funktionen der Zelle und ist an der Erkennung zweier Kerne vom *MAT1-1* und *MAT1-2* Kreuzungstyp vor der Kernmigration und der Ausbildung der ascogenen Hyphe beteiligt (Debuchy, *et al.*, 2010; Turgeon und Debuchy, 2007). In *S. macrospora* konnten verschiedene putative Interaktionspartner von SMTA-2 identifiziert werden (s. 5.6), welche bei einem Zellzyklusarrest eine Rolle spielen könnten. Darunter sind sowohl regulatorische Komplexe, wie der Prohibitin-Komplex, als auch Gene, welche in metabolische Prozesse beteiligt sind. Da die Ausbildung und Reifung der sexuellen Strukturen ein für den Organismus energieaufwändiger Prozess ist, könnte die Regulation wichtiger metabolischer Komponenten an einem solchen Entwicklungsarrest durchaus beteiligt sein.

Zusätzlich wurden aber auch Proteine gefunden, welche an Prozessen der Sporenbildung und der Zellpolarität beteiligt sind. Bei den Komplementationsversuchen mit verkürzten SMTA-2 Konstrukten in Δ SmtA-2 (s. 5.2) zeigte sich, dass der C-Terminale Teil von SMTA-2 in der Lage ist, den sterilen Phänotyp der Mutante teilweise zu komplementieren. Die dabei entstehenden Asci und Ascosporen zeigen jedoch im Vergleich zum Wildtyp Defekte in der Verteilung der Ascosporen innerhalb der Asci. Putative Interaktionspartner von SMTA-2 könnten hierbei sowohl an der Ascosporenentwicklung, als auch, durch Interaktion mit Aktinfilamenten und Motorkomplexen, an der räumlichen Bewegung und Ausrichtung der geordneten Sporentetraden beteiligt sein.

Die Lokalisation von SMTA-2 im Cytoplasma (s. 5.3) ist ebenfalls ein Hinweis auf mögliche Interaktionspartner, welche ebenfalls cytoplasmatisch lokalisiert sind (LRG1, PGN1, ARP2/3). Ein direkter Einfluss auf die Genregulation wird durch diese Daten nicht unterstützt. Ein indirekter Einfluss durch die Steuerung der Lokalisation von Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Komplexen lässt sich dabei nicht ausschließen (Abb. 26). Ein wichtiger Punkt hierbei ist ebenfalls, dass die verwendeten Fluoreszenzkonstrukte offenbar nicht die volle Funktionalität des Wildtyp SMTA-2 besitzen. Der C-Terminale Teil von SMTA-2 scheint dabei essentiell zu sein, während der N-Terminale Abschnitt für die Ascosporen- und Ascusentwicklung wichtig, jedoch nicht essentiell ist

(s. 5.2). Die konservierten Aminosäuren Prolin, Prolin und Phenylalanin (PPF), welche als putative funktionelle Domäne in anderen *Sordariomyceten* beschrieben sind (Debuchy, *et al.*, 2010), scheinen in *S. macrospora* keine essentielle Rolle zu spielen. Grundsätzlich kann eine funktionelle Rolle der PPF-Domäne nicht ausgeschlossen werden, da ein rein C-Terminales Konstrukt von SMTA-2 lediglich eine partielle Funktionalität aufweist.

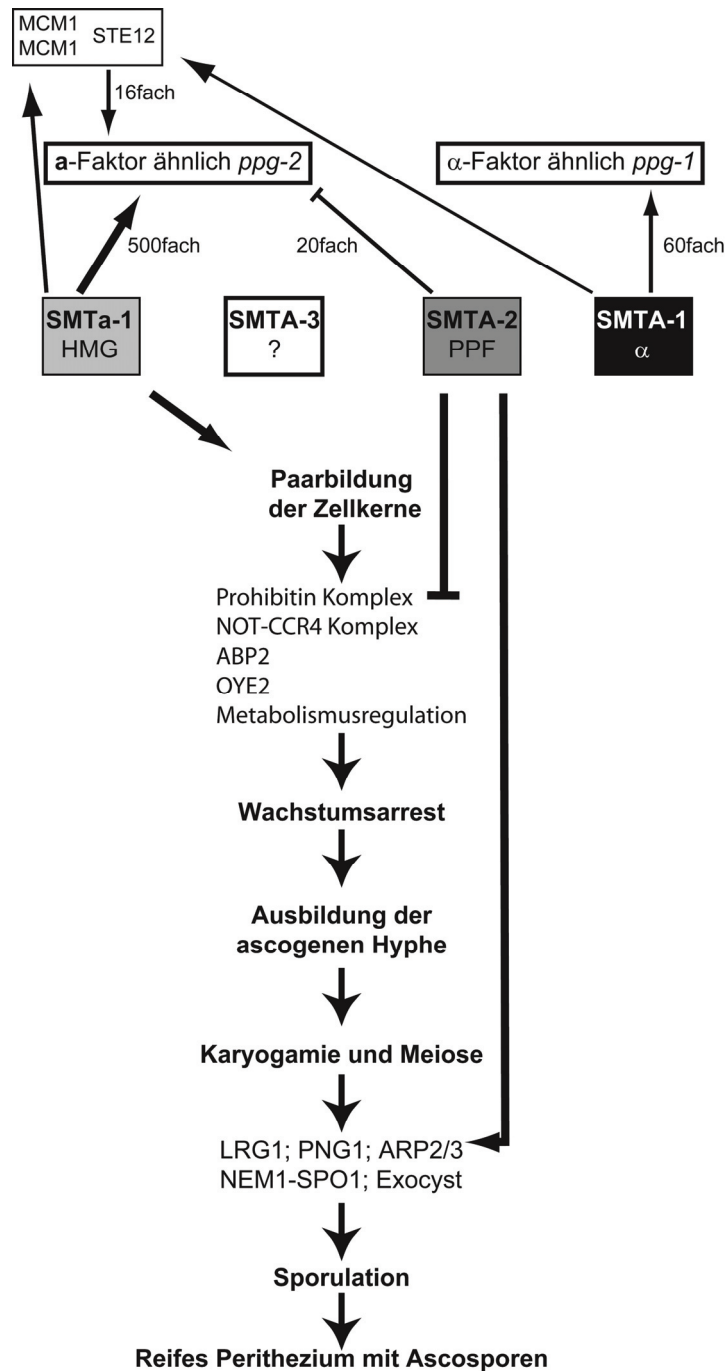


Abbildung 26: Modell der funktionellen Abläufe während der sexuellen Entwicklung in *S. macrospora*.

5.8. Der asexuelle Ascomycet *P. chrysogenum* besitzt funktionelle Pheromone und Rezeptoren

Der filamentöse Ascomycet *Penicillium chrysogenum* besitzt große Bedeutung als Produzent des β -Lactam Antibiotikums Penicillin (Demain und Elander, 1999; Keller, *et al.*, 2005). Obwohl *P. chrysogenum* in der Lage ist, sich vegetativ über Konidiosporen zu vermehren, ist ein sexueller Zyklus nicht bekannt.

Erst kürzlich wurde jedoch das Vorhandensein von Kreuzungstyp-Genen und Komponenten eines Pheromon-Rezeptor-Systems in *P. chrysogenum* nachgewiesen (Hoff, *et al.*, 2008).

Die Gene der putativen Pheromone und Rezeptoren wurden in einem heterologen System in *S. cerevisiae* eingebracht und konstitutiv exprimiert. Bei Behandlung der Hefestämme, welche die Pheromon-Rezeptor Gene exprimieren, mit künstlichem Polypeptid auf Basis der abgeleiteten Proteinsequenz des Pheromon Gens *ppg-1* konnte in Hemmhof-Tests die Induktion eines Wachstumsarrests durch das Pheromon nachgewiesen werden (Abb. 21). In mikroskopischen Studien zeigte sich, dass die so behandelten Zellen eine deutliche „Shmoo“-Bildung zeigen, eine typische Veränderung der Zellmorphologie in *S. cerevisiae* nach Pheromon-Behandlung (Abb. 22). Als Standard wurde der Pheromon-Rezeptor PRE-2 aus *S. macrospora* mit dem entsprechenden künstlichen Pheromon verwendet, da die Funktionalität in diesem heterologen System bereits belegt ist (Mayrhofer und Pöggeler, 2005).

Vergleiche zwischen *S. macrospora* und *P. chrysogenum* zeigen deutlich, dass auch der Pheromon-Rezeptor von *P. chrysogenum* funktionell ist. In dem heterologen Hefesystem ist auch dieser in der Lage, einen Pheromon-induzierten Zellzyklusarrest herbeizuführen.

Auch die Pheromone aus *P. chrysogenum* und *S. macrospora* wurden in Hefe überexprimiert und als Überstand auf die Rezeptor-Stämme gegeben. In keinem Fall konnte hier ein Wachstumsarrest festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte zum einen darauf hindeuten, dass das Pheromon, im Gegensatz zu dem korrespondierenden Rezeptor in *P. chrysogenum* nicht funktionell ist. Da ein Wachstumsarrest allerdings auch bei der *S. macrospora* Positivkontrolle nicht beobachtet werden konnte und die künstlichen Pheromone auf der Sequenz des Pheromons beruhen, ist es wahrscheinlicher, dass die

Diskussion

Pheromone in dem entsprechenden Hefe-Stamm nicht korrekt exprimiert oder sekretiert werden.

Grundsätzlich scheint *P. chrysogenum* über ein funktionierendes Pheromon-Rezeptor-Paar zu verfügen. Es ist nicht klar, ob die Komponenten dieses Systems auch in *P. chrysogenum* exprimiert werden und funktionell sind, jedoch lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass ein sexueller Zyklus in *P. chrysogenum* nicht nur möglich sondern auch recht wahrscheinlich ist. Damit rückt *P. chrysogenum* in die Nähe anderer, medizinisch und industriell relevanter, ursprünglich asexueller Ascomyceten, für die mittlerweile ein sexueller Zyklus beschrieben werden konnte, so zum Beispiel der humanpathogene *Aspergillus fumigatus* (O'Gorman, *et al.*, 2009).

6. Literaturverzeichnis

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.

Anderegg R. J., Betz R., Carr S. A., Crabb J. W., Duntze W. (1988). Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mating hormone **a**-factor. Identification of S-farnesyl cysteine as a structural component. *J Biol Chem* **263**, 18236-40.

Astell C. R., Ahlstrom-Jonasson L., Smith M., Tatchell K., Nasmyth K. A., Hall B. D. (1981). The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **27**, 15-23.

Ballon D. R., Flanary P. L., Gladue D. P., Konopka J. B., Dohlman H. G., Thorner J. (2006). DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses. *Cell* **126**, 1079-93.

Barber M. S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. (2004). Industrial enzymatic production of cephalosporin-based β -lactams. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **88**, 179-215.

Bardwell L. (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**, 339-50.

Becker D. M., Lundblad V. (2001). Introduction of DNA into yeast cells. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 13**, Unit13 7.

Bell S. P., Dutta A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 333-374.

Birnboim H. C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.

Bistis G. N. (1981). Chemotropic interactions between trichogynes and conidia of opposite mating type *Neurospora crassa*. *Mycologia* **73**, 959-975.

Blakeslee A. (1904). Sexual Reproduction in the Mucorinae. *Proc. Am. Acad. Sci* **40**, 205-319.

Bobrowicz P., Pawlak R., Correa A., Bell-Pedersen D., Ebbole D. J. (2002). The *Neurospora crassa* pheromone precursor genes are regulated by the mating type locus and the circadian clock. *Mol Microbiol* **45**, 795-804.

Bölker M., Kahmann R. (1993). Sexual pheromones and mating responses in fungi. *Plant Cell* **5**, 1461-1469.

Borghouts C., Kimpel E., Osiewacz H. D. (1997). Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospira anserina* are under the control of the nuclear gene grisea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10768-10773.

- Borghouts C., Osiewacz H. D. (1998). GRISEA, a copper-modulated transcription factor from *Podospora anserina* involved in senescence and morphogenesis, is an ortholog of MAC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 492-502.
- Borghouts C., Scheckhuber C. Q., Stephan O., Osiewacz H. D. (2002a). Copper homeostasis and aging in the fungal model system *Podospora anserina*: differential expression of PaCtr3 encoding a copper transporter. *Int J Biochem Cell Biol.* **34**, 1355-1371.
- Borghouts C., Scheckhuber C. Q., Werner A., Osiewacz H. D. (2002b). Respiration, copper availability and SOD activity in *P. anserina* strains with different lifespan. *Biogerontology* **3**, 143-153.
- Borghouts C., Werner A., Elthon T., Osiewacz H. D. (2001). Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mol Cell Biol* **21**, 390-399.
- Bowman S. M., Piwowar A., Al Dabbous M., Vierula J., Free S. J. (2006). Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **5**, 587-600.
- Bruhn L., Sprague G. F., Jr. (1994). MCM1 point mutants deficient in expression of α -specific genes: residues important for interaction with α 1. *Mol Cell Biol* **14**, 2534-44.
- Brzonkalik K. (2006). Molekulargenetische Analyse von Kreuzungstypproteinen des filamentösen Ascomyceten *Sordaria macrospora*, Ruhr-Universität.
- Busch S., Schwier E. U., Nahlik K., Bayram Ö., Helmstaedt K., Draht O. W., Krappmann S., Valerius O., Lipscomb W. N., Braus G. H. (2007). An eight-subunit COP9 signalosome with an intact JAMM motif is required for fungal fruit body formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8089-94.
- Camirand A., Heysen A., Grondin B., Herscovics A. (1991). Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the gene encoding a specific processing alpha-mannosidase. *J Biol Chem* **266**, 15120-7.
- Casselton L. A. (2002). Mate recognition in fungi. *Heredity* **88**, 142-7.
- Casselton L. A. (2008). Fungal sex genes-searching for the ancestors. *Bioessays* **30**, 711-714.
- Chang S., Staben C. (1994). Directed replacement of *mt A* by *mt a-1* effects a mating type switch in *Neurospora crassa*. *Genetics* **138**, 75-81.
- Chen H., Crabb J. W., Kinsey J. A. (1998). The *Neurospora aab-1* gene encodes a CCAAT binding protein homologous to yeast HAP5. *Genetics* **148**, 123-30.

- Chen H., Kinsey J. A. (1995). Purification of a heteromeric CCAAT binding protein from *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **249**, 301-8.
- Chen P., Sapperstein S. K., Choi J. D., Michaelis S. (1997). Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone α -factor. *J Cell Biol* **136**, 251-69.
- Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H., Hieter P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-122.
- Coates P. J., Jamieson D. J., Smart K., Prescott A. R., Hall P. A. (1997). The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr Biol* **7**, 607-10.
- Collart M. A., Struhl K. (1993). CDC39, an essential nuclear protein that negatively regulates transcription and differentially affects the constitutive and inducible *HIS3* promoters. *Embo J* **12**, 177-86.
- Collart M. A., Struhl K. (1994). NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes Dev* **8**, 525-37.
- Colot H. V., Park G., Turner G. E., Ringelberg C., Crew C. M., Litvinkova L., Weiss R. L., Borkovich K. A., Dunlap J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10352-7.
- Coppin E., de Renty C., Debuchy R. (2005). The function of the coding sequences for the putative pheromone precursors in *Podospora anserina* is restricted to fertilization. *Eukaryot Cell* **4**, 407-20.
- Costanzo M., Baryshnikova A., Bellay J., Kim Y., Spear E. D., Sevier C. S., Ding H., Koh J. L., Toufighi K., Mostafavi S., Prinz J., St Onge R. P., VanderSluis B., Makhnevych T., Vizeacoumar F. J., Alizadeh S., Bahr S., Brost R. L., Chen Y., Cokol M., Deshpande R., Li Z., Lin Z. Y., Liang W., Marback M., Paw J., San Luis B. J., Shuteriqi E., Tong A. H., van Dyk N., Wallace I. M., Whitney J. A., Weirauch M. T., Zhong G., Zhu H., Houry W. A., Brudno M., Ragibizadeh S., Papp B., Pal C., Roth F. P., Giaever G., Nislow C., Troyanskaya O. G., Bussey H., Bader G. D., Gingras A. C., Morris Q. D., Kim P. M., Kaiser C. A., Myers C. L., Andrews B. J., Boone C. (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425-31.
- de Barros Lopes M., Ho J. Y., Reed S. I. (1990). Mutations in cell division cycle genes CDC36 and CDC39 activate the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone response pathway. *Mol Cell Biol* **10**, 2966-72.
- Debuchy R., Arnaise S., Lecellier G. (1993). The *mat-* allele of *Podospora anserina* contains three regulatory genes required for the development of fertilized female organs. *Mol Gen Genet* **241**, 667-73.

Debuchy R., Berteaux-Lecelier V., Silar P. (2010). Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes in K. A. Borkovich and D. J. Ebbole (Eds), *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*, ASM Press, pp. 501-535.

Debuchy R., Turgeon B. G. (2006). Mating-type structure, evolution, and function in euascomycetes. in U. Kües and R. Fischer (Eds), *Growth, differentiation and sexuality.*, Springer, pp. 293-323.

Demain A. L., Elander R. P. (1999). The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**, 5-19.

Deschamps J., Wiame J. M. (1979). Mating-type effect on *cis* mutations leading to constitutivity of ornithine transaminase in diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **92**, 749-58.

Dohlman H. G., Song J., Ma D., Courchesne W. E., Thorner J. (1996). *Sst2*, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gp α 1 (the G-protein alpha subunit). *Mol Cell Biol* **16**, 5194-209.

Dohlman H. G., Thorner J. W. (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu Rev Biochem* **70**, 703-54.

Dolan J. W., Fields S. (1991). Cell-type-specific transcription in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1088**, 155-69.

Donalies U. E., Stahl U. (2002). Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of MET14 and SSU1. *Yeast* **19**, 475-84.

dos Remedios C. G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I. V., Tsubakihara M., Berry D. A., Nosworthy N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**, 433-73.

Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-45.

Duarte M., Videira A. (2000). Respiratory chain complex I is essential for sexual development in *Neurospora* and binding of iron sulfur clusters are required for enzyme assembly. *Genetics* **156**, 607-15.

Duncker B. P., Chesnokov I. N., McConkey B. J. (2009). The origin recognition complex protein family. *Genome Biol.* **10**, 214.

Dyer P. S. (2008). Evolutionary biology: genomic clues to original sex in fungi. *Curr Biol* **18**, R207-9.

Engl I., Nowrousian M., Kück U. (2007a). Regulation of melanin biosynthesis via the dihydroxynaphthalene pathway is dependent on sexual development in the ascomycete *Sordaria macrospora*. *FEMS Microbiol Lett* **275**, 62-70.

Engl I., Würtz C., Witzel-Schlomp K., Zhang H. Y., Hoff B., Nowrousian M., Rottensteiner H., Kück U. (2007b). The WW domain protein PRO40 is required for fungal fertility and associates with Woronin bodies. *Eukaryot Cell* **6**, 831-43.

Englund P. T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem* **62**, 121-38.

Esser K. (2000). Cryptogams-Cyanaobacteria, Fungi, Algae and Lichens. Cambridge University Press.

Favot L., Hall S. M., Haworth S. G., Kemp P. R. (2005). Cytoplasmic YY1 is associated with increased smooth muscle-specific gene expression: implications for neonatal pulmonary hypertension. *Am J Pathol* **167**, 1497-509.

Fernandez E., Moreno F., Rodicio R. (1992). The ICL1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **204**, 983-90.

Ferreira A. V., An Z., Metzenberg R. L., Glass N. L. (1998). Characterization of *mat A-2*, *mat A-3* and Δ *matA* mating-type mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **148**, 1069-79.

Ferreira A. V., Saupé S., Glass N. L. (1996). Transcriptional analysis of the *mt A* idiomorph of *Neurospora crassa* identifies two genes in addition to *mt A-1*. *Mol Gen Genet* **250**, 767-74.

Fleming A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226-236.

Fraering P., Imhof I., Meyer U., Strub J. M., van Dorsselaer A., Vionnet C., Conzelmann A. (2001). The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol Biol Cell* **12**, 3295-306.

Galagan J. E., Calvo S. E., Cuomo C., Ma L. J., Wortman J. R., Batzoglou S., Lee S. I., Basturkmen M., Spevak C. C., Clutterbuck J., Kapitonov V., Jurka J., Scaccocchio C., Farman M., Butler J., Purcell S., Harris S., Braus G. H., Draht O., Busch S., D'Enfert C., Bouchier C., Goldman G. H., Bell-Pedersen D., Griffiths-Jones S., Doonan J. H., Yu J., Vienken K., Pain A., Freitag M., Selker E. U., Archer D. B., Penalva M. A., Oakley B. R., Momany M., Tanaka T., Kumagai T., Asai K., Machida M., Nierman W. C., Denning D. W., Caddick M., Hynes M., Paoletti M., Fischer R., Miller B., Dyer P., Sachs M. S., Osmani S. A., Birren B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-15.

Galgoczy D. J., Cassidy-Stone A., Llinas M., O'Rourke S. M., Herskowitz I., DeRisi J. L., Johnson A. D. (2004). Genomic dissection of the cell-type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18069-74.

Gentleman R. C., Carey V. J., Bates D. M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A. J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J. Y., Zhang J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**, R80.

Georgatsou E., Mavrogiannis L. A., Fragiadakis G. S., Alexandraki D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* **272**, 13786-13792.

Glass N. L., Grotelueschen J., Metzenberg R. L. (1990a). *Neurospora crassa* A mating-type region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4912-6.

Glass N. L., Lee L. (1992). Isolation of *Neurospora crassa* A mating type mutants by repeat induced point (RIP) mutation. *Genetics* **132**, 125-33.

Glass N. L., Metzenberg R. L., Raju N. B. (1990b). Homothallic Sordariaceae from nature: The absence of strains containing only the a mating type sequence. *Experimental Mycology* **14**, 274-289.

Glass N. L., Smith M. L. (1994). Structure and function of a mating-type gene from the homothallic species *Neurospora africana*. *Mol Gen Genet* **244**, 401-9.

Glass N. L., Vollmer S. J., Staben C., Grotelueschen J., Metzenberg R. L., Yanofsky C. (1988). DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science* **241**, 570-3.

Gorlatova N., Tchorzewski M., Kurihara T., Soda K., Esaki N. (1998). Purification, characterization, and mechanism of a flavin mononucleotide-dependent 2-nitropropane dioxygenase from *Neurospora crassa*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1029-33.

Grosschedl R., Giese K., Pagel J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* **10**, 94-100.

Guo W., Roth D., Walch-Solimena C., Novick P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *Embo J* **18**, 1071-80.

Haller K., Rambaldi I., Daniels E., Featherstone M. (2004). Subcellular localization of multiple PREP2 isoforms is regulated by actin, tubulin, and nuclear export. *J Biol Chem* **279**, 49384-94.

Hartman J. L. t., Garvik B., Hartwell L. (2001). Principles for the buffering of genetic variation. *Science* **291**, 1001-4.

Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C., Pegler D. N. (1995). Dictionary of the fungi, 8 edn. Univeristy press.

Herker E., Jungwirt H., Lehmann K. A., Maldener C., Fröhlich K. U., Wissing S., Büttner S., Fehr M., Sigrist S., Madeo F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **164**, 501-507.

Herskowitz I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 536-53.

Herskowitz I. (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* **342**, 749-57.

Hoff B., Pöggeler S., Kück U. (2008). Eighty years after its discovery, Fleming's *Penicillium* strain discloses the secret of its sex. *Eukaryot Cell* **7**, 465-70.

Hoffman C. S. (2001). Preparation of yeast DNA. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 13**, Unit13 11.

Horton P., Park K. J., Obayashi T., Fujita N., Harada H., Adams-Collier C. J., Nakai K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* **35**, W585-7.

Hsueh Y. P., Heitman J. (2008). Orchestration of sexual reproduction and virulence by the fungal mating-type locus. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 517-524.

Huang Z., Zang K., Reichardt L. F. (2005). The origin recognition core complex regulates dendrite and spine development in postmitotic neurons. *J. Cell Biol.* **170**, 527-535.

Hull C. M., Johnson A. D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**, 1271-5.

Idnurm A., Walton F. J., Floyd A., Heitman J. (2008). Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature* **451**, 193-6.

Iraqui I., Vissers S., Cartiaux M., Urrestarazu A. (1998). Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol Gen Genet* **257**, 238-48.

Jacobsen S., Wittig M., Pöggeler S. (2002). Interaction between mating-type proteins from the homothallic fungus *Sordaria macrospora*. *Curr Genet* **41**, 150-8.

James P., Halladay J., Craig E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-36.

Janus D., Hoff B., Hofmann E., Kück U. (2007). An efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene. *Appl Environ Microbiol* **73**, 962-70.

Jentsch S., Schlenker S. (1995). Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* **82**, 881-4.

Johnson A. D. (1995). Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 552-8.

Kanematsu S., Adachi Y., Ito T. (2007). Mating-type loci of heterothallic *Diaporthe* spp.: homologous genes are present in opposite mating-types. *Curr Genet* **52**, 11-22.

Kang Y. S., Kane J., Kurjan J., Stadel J. M., Tipper D. J. (1990). Effects of expression of mammalian G α and hybrid mammalian-yeast G α proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **10**, 2582-90.

Keller N. P., Turner G., Bennett J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**, 937-47.

Kim H., Borkovich K. A. (2004). A pheromone receptor gene, *pre-1*, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **52**, 1781-98.

Kim H., Borkovich K. A. (2006). Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **5**, 544-54.

Kim H., Metzenberg R. L., Nelson M. A. (2002). Multiple functions of *mfa-1*, a putative pheromone precursor gene of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **1**, 987-99.

Kim H. K., Lee T., Yun S. H. (2008). A putative pheromone signaling pathway is dispensable for self-fertility in the homothallic ascomycete *Gibberella zeae*. *Fungal Genet Biol* **45**, 1188-96.

Kim Y., Gentry M. S., Harris T. E., Wiley S. E., Lawrence J. C., Jr., Dixon J. E. (2007). A conserved phosphatase cascade that regulates nuclear membrane biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6596-601.

Kispal G., Steiner H., Court D. A., Rolinski B., Lill R. (1996). Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem* **271**, 24458-64.

Kitagaki H., Wu H., Shimoi H., Ito K. (2002). Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **46**, 1011-22.

Klix V. (2007). Molekulargenetische Analyse des Kreuzungstyp-Locus des filamentösen Ascomyceten *Sordaria macrospora*, Ruhr-Universität.

Klix V., Nowrousian M., Ringelberg C., Loros J. J., Dunlap J. C., Pöggeler S. (2010). Functional characterization of *MAT1-1*-specific mating-type genes in the homothallic

ascomycete *Sordaria macrospora* provides new insights into essential and nonessential sexual regulators. *Eukaryot Cell* **9**, 894-905.

Knoll L. J., Johnson D. R., Gordon J. I. (1994). Biochemical studies of three *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p. *J Biol Chem* **269**, 16348-56.

Kopito R. R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**, 427-30.

Kothe E. (2008). Sexual attraction: on the role of fungal pheromone/receptor systems (A review). *Acta Microbiol Immunol Hung* **55**, 125-43.

Kuchler K., Sterne R. E., Thorner J. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *Embo J* **8**, 3973-84.

Kück U., Pöggeler S., Nowrousian M., Nolting N., Engh I. (2009). *Sordaria macrospora*, a model system for fungal development in T. Anke and D. Weber (Eds), *The Mycota. Physiology and genetics: selected basic and applied aspects*, Springer Verlag, pp. 17-39.

Kurjan J. (1993). The pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **27**, 147-79.

Lecellier G., Silar P. (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr Genet* **25**, 122-3.

Lee J., Lee T., Lee Y. W., Yun S. H., Turgeon B. G. (2003). Shifting fungal reproductive mode by manipulation of mating type genes: obligatory heterothallism of *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol* **50**, 145-52.

Lee J., Leslie J. F., Bowden R. L. (2008). Expression and function of sex pheromones and receptors in the homothallic ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryot Cell* **7**, 1211-21.

Lee M. W., Kim B. J., Choi H. K., Ryu M. J., Kim S. B., Kang K. M., Cho E. J., Youn H. D., Huh W. K., Kim S. T. (2007). Global protein expression profiling of budding yeast in response to DNA damage. *Yeast* **24**, 145-54.

Leidich S. D., Drapp D. A., Orlean P. (1994). A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem* **269**, 10193-6.

Leidich S. D., Kostova Z., Latek R. R., Costello L. C., Drapp D. A., Gray W., Fassler J. S., Orlean P. (1995). Temperature-sensitive yeast GPI anchoring mutants gpi2 and gpi3 are defective in the synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol. *J Biol Chem* **270**, 13029-35.

Li H., Zhou H., Luo Y., Ouyang H., Hu H., Jin C. (2007). Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* **64**, 1014-27.

- Lin X., Heitman J. (2007). Mechanisms of homothallism in fungi and transitions between heterothallism and homothallism. in J. Heitman, J. W. Kronstad, J. W. Taylor and L. A. Casselton (Eds), *Sex in fungi*, ASM Press, pp. 35-57.
- Lussier M., Sdicu A. M., Camirand A., Bussey H. (1996). Functional characterization of the *YURI*, *KTR1*, and *KTR2* genes as members of the yeast *KRE2/MNT1* mannosyltransferase gene family. *J Biol Chem* **271**, 11001-8.
- Lyons T. J., Villa N. Y., Regalla L. M., Kupchak B. R., Vagstad A., Eide D. J. (2004). Metalloregulation of yeast membrane steroid receptor homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5506-11.
- MacPherson S., Larochelle M., Turcotte B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 583-604.
- Marbach K., Fernández-Larrea J., Stahl U. (1994). Reversion of a long-living, undifferentiated mutant of *Podospora anserina* by copper. *Curr Genet* **26**, 184-186.
- März S., Funakoshi Y., Negishi Y., Suzuki T., Seiler S. (2009). The *Neurospora* peptide-N-glycanase ortholog PNG1 is essential for cell polarity despite its lack of enzymatic activity. *J Biol Chem* **285**, 2326-32.
- Masloff S., Jacobsen S., Pöggeler S., Kück U. (2002). Functional analysis of the C6 zinc finger gene *pro1* involved in fungal sexual development. *Fungal Genet Biol* **36**, 107-16.
- Masloff S., Pöggeler S., Kück U. (1999). The *pro1(+)* gene from *Sordaria macrospora* encodes a C6 zinc finger transcription factor required for fruiting body development. *Genetics* **152**, 191-9.
- Mayrhofer S., Pöggeler S. (2005). Functional characterization of an α -factor-like *Sordaria macrospora* peptide pheromone and analysis of its interaction with its cognate receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**, 661-72.
- Mayrhofer S., Weber J. M., Pöggeler S. (2006). Pheromones and pheromone receptors are required for proper sexual development in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. *Genetics* **172**, 1521-33.
- McConville M. J., Ferguson M. A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J* **294 (Pt 2)**, 305-24.
- Mehta S. Q., Hiesinger P. R., Beronja S., Zhai R. G., Schulze K. L., Verstreken P., Cao Y., Zhou Y., Tepass U., Crair M. C., Bellen H. J. (2005). Mutations in *Drosophila sec15* reveal a function in neuronal targeting for a subset of exocyst components. *Neuron* **46**, 219-32.

Meile L., Rohr L. M., Geissmann T. A., Herensperger M., Teuber M. (2001). Characterization of the D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (xpf) from *Bifidobacterium lactis*. *J Bacteriol* **183**, 2929-36.

Messenguy F., Dubois E. (1993). Genetic evidence for a role for MCM1 in the regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 2586-92.

Metzenberg R. L., Glass N. L. (1990). Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays* **12**, 53-59.

Middelhoven W. J. (1964). The Pathway of Arginine Breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **93**, 650-2.

Mount D. B., Romero M. F. (2004). The *SLC26* gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch* **447**, 710-21.

Mullis K. B., Faloona F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.

Mushegian A. R., Koonin E. V. (1994). Unexpected sequence similarity between nucleosidases and phosphoribosyltransferases of different specificity. *Protein Sci* **3**, 1081-8.

Nasmyth K. A. (1982). The regulation of yeast mating-type chromatin structure by SIR: an action at a distance affecting both transcription and transposition. *Cell* **30**, 567-78.

Neiman A. M. (1998). Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *J Cell Biol* **140**, 29-37.

Nelson M. A., Metzenberg R. L. (1992). Sexual development genes of *Neurospora crassa*. *Genetics* **132**, 149-62.

Nierman W. C., Pain A., Anderson M. J., Wortman J. R., Kim H. S., Arroyo J., Berriman M., Abe K., Archer D. B., Bermejo C., Bennett J., Bowyer P., Chen D., Collins M., Coulsen R., Davies R., Dyer P. S., Farman M., Fedorova N., Feldblyum T. V., Fischer R., Fosker N., Fraser A., Garcia J. L., Garcia M. J., Goble A., Goldman G. H., Gomi K., Griffith-Jones S., Gwilliam R., Haas B., Haas H., Harris D., Horiuchi H., Huang J., Humphray S., Jimenez J., Keller N., Khouri H., Kitamoto K., Kobayashi T., Konzack S., Kulkarni R., Kumagai T., Lafon A., Latge J. P., Li W., Lord A., Lu C., Majoros W. H., May G. S., Miller B. L., Mohamoud Y., Molina M., Monod M., Mouyna I., Mulligan S., Murphy L., O'Neil S., Paulsen I., Penalva M. A., Perteu M., Price C., Pritchard B. L., Quail M. A., Rabinowitsch E., Rawlins N., Rajandream M. A., Reichard U., Renauld H., Robson G. D., Rodriguez de Cordoba S., Rodriguez-Pena J. M., Ronning C. M., Rutter S., Salzberg S. L., Sanchez M., Sanchez-Ferrero J. C., Saunders D., Seeger K., Squares R., Squares S., Takeuchi M., Tekaiia F., Turner G., Vazquez de Aldana C. R., Weidman J., White O., Woodward J., Yu J. H., Fraser C., Galagan J. E., Asai K., Machida M., Hall N., Barrell B., Denning D. W. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151-6.

- Nolting N., Pöggeler S. (2006a). A MADS box protein interacts with a mating-type protein and is required for fruiting body development in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. *Eukaryot Cell* **5**, 1043-56.
- Nolting N., Pöggeler S. (2006b). A STE12 homologue of the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora* interacts with the MADS box protein MCM1 and is required for ascosporeogenesis. *Mol Microbiol* **62**, 853-68.
- Norais N., Prome D., Velours J. (1991). ATP synthase of yeast mitochondria. Characterization of subunit d and sequence analysis of the structural gene ATP7. *J Biol Chem* **266**, 16541-9.
- Nordgard O., Dahle O., Andersen T. O., Gabrielsen O. S. (2001). JAB1/CSN5 interacts with the GAL4 DNA binding domain: a note of caution about two-hybrid interactions. *Biochimie* **83**, 969-71.
- Nowrousian M., Frank S., Koers S., Strauch P., Weitner T., Ringelberg C., Dunlap J. C., Loros J. J., Kück U. (2007a). The novel ER membrane protein PRO41 is essential for sexual development in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *Mol Microbiol* **64**, 923-37.
- Nowrousian M., Masloff S., Pöggeler S., Kück U. (1999). Cell differentiation during sexual development of the fungus *Sordaria macrospora* requires ATP citrate lyase activity. *Mol Cell Biol* **19**, 450-60.
- Nowrousian M., Piotrowski M., Kück U. (2007b). Multiple layers of temporal and spatial control regulate accumulation of the fruiting body-specific protein APP in *Sordaria macrospora* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **44**, 602-14.
- Nowrousian M., Ringelberg C., Dunlap J. C., Loros J. J., Kück U. (2005). Cross-species microarray hybridization to identify developmentally regulated genes in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *Mol Genet Genomics* **273**, 137-49.
- Nowrousian M., Würtz C., Pöggeler S., Kück U. (2004). Comparative sequence analysis of *Sordaria macrospora* and *Neurospora crassa* as a means to improve genome annotation. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 285-292.
- Odat O., Matta S., Khalil H., Kampranis S. C., Pfau R., Tsihchlis P. N., Makris A. M. (2007). Old yellow enzymes, highly homologous FMN oxidoreductases with modulating roles in oxidative stress and programmed cell death in yeast. *J Biol Chem* **282**, 36010-23.
- O'Gorman C. M., Fuller H. T., Dyer P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**, 471-4.
- Paoletti M., Rydholm C., Schwier E. U., Anderson M. J., Szakacs G., Lutzoni F., Debeaupuis J. P., Latge J. P., Denning D. W., Dyer P. S. (2005). Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol* **15**, 1242-8.

Paoletti M., Seymour F. A., Alcocer M. J., Kaur N., Calvo A. M., Archer D. B., Dyer P. S. (2007). Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **17**, 1384-9.

Perkins D. D., Barry E. G. (1977). The cytogenetics of *Neurospora*. *Adv Genet* **19**, 133-285.

Pesin J. A., Orr-Weaver T. L. (2008). Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **24**, 475-499.

Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36.

Pinto S., Quintana D. G., Smith P., Mihalek R. M., Hou Z. H., Boynton S., Jones C. J., Hendricks M., Velinzon K., Wohlschlegel J. A., Austin R. J., Lane W. S., Tully. T., Dutta A. (1999). *latheo* encodes a subunit of the origin recognition complex and disrupts neuronal proliferation and adult olfactory memory when mutant. *Neuron* **23**, 45-54.

Pöggeler S. (2000). Two pheromone precursor genes are transcriptionally expressed in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. *Curr Genet* **37**, 403-11.

Pöggeler S. (2001). Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 589-601.

Pöggeler S. (2002). Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* **42**, 153-60.

Pöggeler S. (2007). MAT and its role in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora* in J. Heitman, J. W. Kronstad, J. W. Taylor and L. Casselton (Eds), *Sex in Fungi*, ASM Press, pp. 171-188.

Pöggeler S., Kück U. (2000). Comparative analysis of the mating-type loci from *Neurospora crassa* and *Sordaria macrospora*: identification of novel transcribed ORFs. *Mol Gen Genet* **263**, 292-301.

Pöggeler S., Kück U. (2001). Identification of transcriptionally expressed pheromone receptor genes in filamentous ascomycetes. *Gene* **280**, 9-17.

Pöggeler S., Kück U. (2004). A WD40 repeat protein regulates fungal cell differentiation and can be replaced functionally by the mammalian homologue striatin. *Eukaryot Cell* **3**, 232-40.

Pöggeler S., Kück U. (2006). Highly efficient generation of signal transduction knockout mutants using a fungal strain deficient in the mammalian *ku70* ortholog. *Gene* **378**, 1-10.

Pöggeler S., Masloff S., Hoff B., Mayrhofer S., Kück U. (2003). Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. *Curr Genet* **43**, 54-61.

Pöggeler S., Nowrousian M., Kück U. (2006a). Fruiting body development in ascomycetes in U. Kues and R. Fischer (Eds), *The Mycota I: Growth, Differentiation and Sexuality*, Springer Verlag, pp. 325-355.

Pöggeler S., Nowrousian M., Ringelberg C., Loros J. J., Dunlap J. C., Kück U. (2006b). Microarray and real-time PCR analyses reveal mating type-dependent gene expression in a homothallic fungus. *Mol Genet Genomics* **275**, 492-503.

Pöggeler S., Risch S., Kück U., Osiewacz H. D. (1997). Mating-type genes from the homothallic fungus *Sordaria macrospora* are functionally expressed in a heterothallic ascomycete. *Genetics* **147**, 567-80.

Pronk J. T., Yde Steensma H., Van Dijken J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 1607-33.

Pyrzak W., Miller K. Y., Miller B. L. (2008). Mating type protein Mat1-2 from asexual *Aspergillus fumigatus* drives sexual reproduction in fertile *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**, 1029-40.

Raper K. B., Alexander D. F., Coghill R. D. (1944). Penicillin: II. Natural Variation and Penicillin Production in *Penicillium notatum* and Allied Species. *J Bacteriol* **48**, 639-59.

Raudaskoski M., Kothe E. (2010). Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. *Eukaryot Cell* **9**, 847-59.

Reed S. I. (1980). The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division. *Genetics* **95**, 561-77.

Roca M. G., Kuo H. C., Lichius A., Freitag M., Read N. D. (2010). Nuclear dynamics, mitosis and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*.

Ruepp A., Zollner A., Maier D., Albermann K., Hani J., Mokrejs M., Tetko I., Guldener U., Mannhaupt G., Munsterkötter M., Mewes H. W. (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**, 5539-45.

Saeed A. I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., Thiagarajan M., Sturn A., Snuffin M., Rezantsev A., Popov D., Ryltsov A., Kostukovich E., Borisovsky I., Liu Z., Vinsavich A., Trush V., Quackenbush J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**, 374-8.

Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual.*, 2nd Ed. edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Samson R. A., Hadlok R., Stolk A. C. (1977). A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. *Antonie Van Leeuwenhoek* **43**, 169-75.

Sanchez J. P., Murakami Y., Huberman J. A., Hurwitz J. (1998). Isolation, characterization, and molecular cloning of a protein (Abp2) that binds to a *Schizosaccharomyces pombe* origin of replication (*ars3002*). *Mol Cell Biol* **18**, 1670-81.

Saupe S., Stenberg L., Shiu K. T., Griffiths A. J., Glass N. L. (1996). The molecular nature of mutations in the mt A-1 gene of the *Neurospora crassa* A idiomorph and their relation to mating-type function. *Mol Gen Genet* **250**, 115-22.

Schimek C., Wostemeyer J. (2009). Carotene derivatives in sexual communication of zygomycete fungi. *Phytochemistry* **70**, 1867-75.

Schneider R., Hitomi M., Ivessa A. S., Fasch E. V., Kohlwein S. D., Tartakoff A. M. (1996). A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol Cell Biol* **16**, 7161-72.

Seiler S., Plamann M. (2003). The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* **14**, 4352-64.

Seo J. A., Han K. H., Yu J. H. (2004). The *gprA* and *gprB* genes encode putative G protein-coupled receptors required for self-fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **53**, 1611-23.

Severin F. F., Hyman A. A. (2002). Pheromone induces cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* **12**, R233-R445.

Sharifmoghadam M. R., de Leon N., Hoya M., Curto M. A., Valdivieso M. H. (2010). Different steps of sexual development are differentially regulated by the Sec8p and Exo70p exocyst subunits. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 71-80.

Shen W. C., Bobrowicz P., Ebbole D. J. (1999). Isolation of pheromone precursor genes of *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* **27**, 253-63.

Shen X., Ranallo R., Choi E., Wu C. (2003). Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell* **12**, 147-55.

Shima J., Sakata-Tsuda Y., Suzuki Y., Nakajima R., Watanabe H., Kawamoto S., Takano H. (2003). Disruption of the CAR1 gene encoding arginase enhances freeze tolerance of the commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 715-8.

Shore P., Sharrocks A. D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* **229**, 1-13.

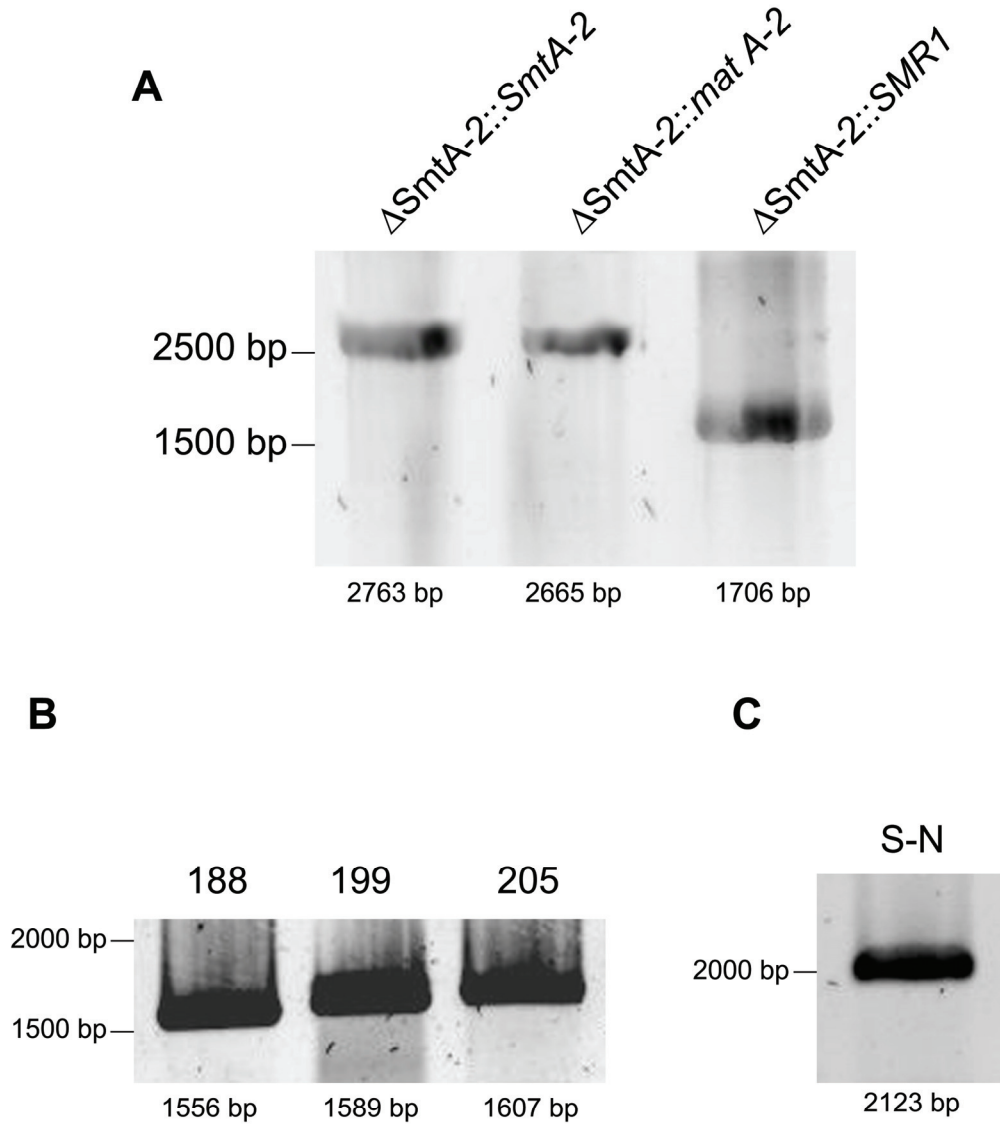
- Shuster E. O., Byers B. (1989). Pachytene arrest and other meiotic effects of the start mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **123**, 29-43.
- Singh A., Chen E. Y., Lugovoy J. M., Chang C. N., Hitzeman R. A., Seeburg P. H. (1983). *Saccharomyces cerevisiae* contains two discrete genes coding for the α -factor pheromone. *Nucleic Acids Res* **11**, 4049-63.
- Siniossoglou S., Santos-Rosa H., Rappsilber J., Mann M., Hurt E. (1998). A novel complex of membrane proteins required for formation of a spherical nucleus. *Embo J* **17**, 6449-64.
- Skatrud P. L., Queener S. W., Carr L. G., Fisher D. L. (1987). Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet* **12**, 337-48.
- Smyth G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3.
- Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
- Souza C. A., Silva C. C., Ferreira A. V. (2003). Sex in fungi: lessons of gene regulation. *Genet Mol Res* **2**, 136-47.
- Sprague G. F., Jr. (1991). Assay of yeast mating reaction. *Methods Enzymol* **194**, 77-93.
- Staben C., Yanofsky C. (1990). *Neurospora crassa* a mating-type region. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4917-21.
- Steensma H. Y., Holterman L., Dekker I., van Sluis C. A., Wenzel T. J. (1990). Molecular cloning of the gene for the E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **191**, 769-74.
- Stötzler D., Klitz H. H., Duntze W. (1976). Primary structure of the α -factor peptides from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **69**, 397-400.
- Strathern J. N., Klar A. J., Hicks J. B., Abraham J. A., Ivy J. M., Nasmyth K. A., McGill C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell* **31**, 183-92.
- TerBush D. R., Maurice T., Roth D., Novick P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**, 6483-94.
- Thompson-Coffe C., Zickler D. (1993). Cytoskeleton interactions in the ascus development and sporulation of *Sordari macrospora*. *Journal of Cell Science*, 883-898.

- Tian C., Kasuga T., Sachs M. S., Glass N. L. (2007). Transcriptional profiling of cross pathway control in *Neurospora crassa* and comparative analysis of the Gcn4 and CPC1 regulons. *Eukaryot Cell* **6**, 1018-1029.
- Tucker C. L., Peteya L. A., Pittman A. M., Zhong J. (2009). A genetic test for yeast two-hybrid bait competency using RanBPM. *Genetics* **182**, 1377-9.
- Turgeon B. G., Debuchy R. (2007). Cochliobolus and Podospora: Mechanisms of sex determination and the evolution of reproductive lifestyle. in J. Heitman, J. W. Kronstad, J. W. Taylor and L. Casselton (Eds), *Sex in fungi.*, ASM Press, pp. 93-121.
- Turgeon B. G., Yoder O. C. (2000). Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **31**, 1-5.
- Urban-Grimal D., Labbe-Bois R. (1981). Genetic and biochemical characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* blocked in six different steps of heme biosynthesis. *Mol Gen Genet* **183**, 85-92.
- van den Ende H. (1967). Sexual factor of the Mucorales. *Nature* **215**, 211-2.
- Vassal A., Boulet A., Decoster E., Faye G. (1992). QRI8, a novel ubiquitin-conjugating enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1132**, 211-3.
- Videira A., Kasuga T., Tian C., Lemos C., Castro A., Glass N. L. (2009). Transcriptional analysis of the response of *Neurospora crassa* to phytosphingosine reveals links to mitochondrial function. *Microbiology* **155**, 3134-41.
- Vierula P. J. (1997). Cloning and characterization of a *Neurospora crassa* ribosomal protein gene, *crps-7*. *Curr Genet* **31**, 139-43.
- Vogt N., Seiler S. (2008). The RHO1-specific GTPase-activating protein LRG1 regulates polar tip growth in parallel to Ndr kinase signaling in *Neurospora*. *Mol Biol Cell* **19**, 4554-69.
- Vossen J. H., Ram A. F., Klis F. M. (1995). Identification of SPT14/CWH6 as the yeast homologue of hPIG-A, a gene involved in the biosynthesis of GPI anchors. *Biochim Biophys Acta* **1243**, 549-51.
- Wang Y., Dohlman H. G. (2004). Pheromone signaling mechanisms in yeast: a prototypical sex machine. *Science* **306**, 1508-9.
- Winter D., Podtelejnikov A. V., Mann M., Li R. (1997). The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol* **7**, 519-29.
- Woo P. C., Chong K. T., Tse H., Cai J. J., Lau C. C., Zhou A. C., Lau S. K., Yuen K. Y. (2006). Genomic and experimental evidence for a potential sexual cycle in the pathogenic thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. *FEBS Lett* **580**, 3409-16.

- Xue Y., Li A., Wang L., Feng H., Yao X. (2006). PPSP: prediction of PK-specific phosphorylation site with Bayesian decision theory. *BMC Bioinformatics* **7**, 163.
- Yamashita M., Kurokawa K., Sato Y., Yamagata A., Mimura H., Yoshikawa A., Sato K., Nakano A., Fukai S. (2010). Structural basis for the Rho- and phosphoinositide-dependent localization of the exocyst subunit Sec3. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 180-6.
- Yarden O., Plamann M., Ebbole D. J., Yanofsky C. (1992). *cot-1*, a gene required for hyphal elongation in *Neurospora crassa*, encodes a protein kinase. *Embo J* **11**, 2159-66.
- Yokogawa T., Shimada N., Takeuchi N., Benkowski L., Suzuki T., Omori A., Ueda T., Nishikawa K., Spremulli L. L., Watanabe K. (2000). Characterization and tRNA recognition of mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **275**, 19913-20.
- Yuan Y. O., Stroke I. L., Fields S. (1993). Coupling of cell identity to signal response in yeast: interaction between the $\alpha 1$ and STE12 proteins. *Genes Dev* **7**, 1584-97.
- Zhang L., Baasiri R. A., Van Alfen N. K. (1998). Viral repression of fungal pheromone precursor gene expression. *Mol Cell Biol* **18**, 953-9.
- Zheng B., Han M., Bernier M., Wen J. K. (2009). Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Febs J* **276**, 2669-85.

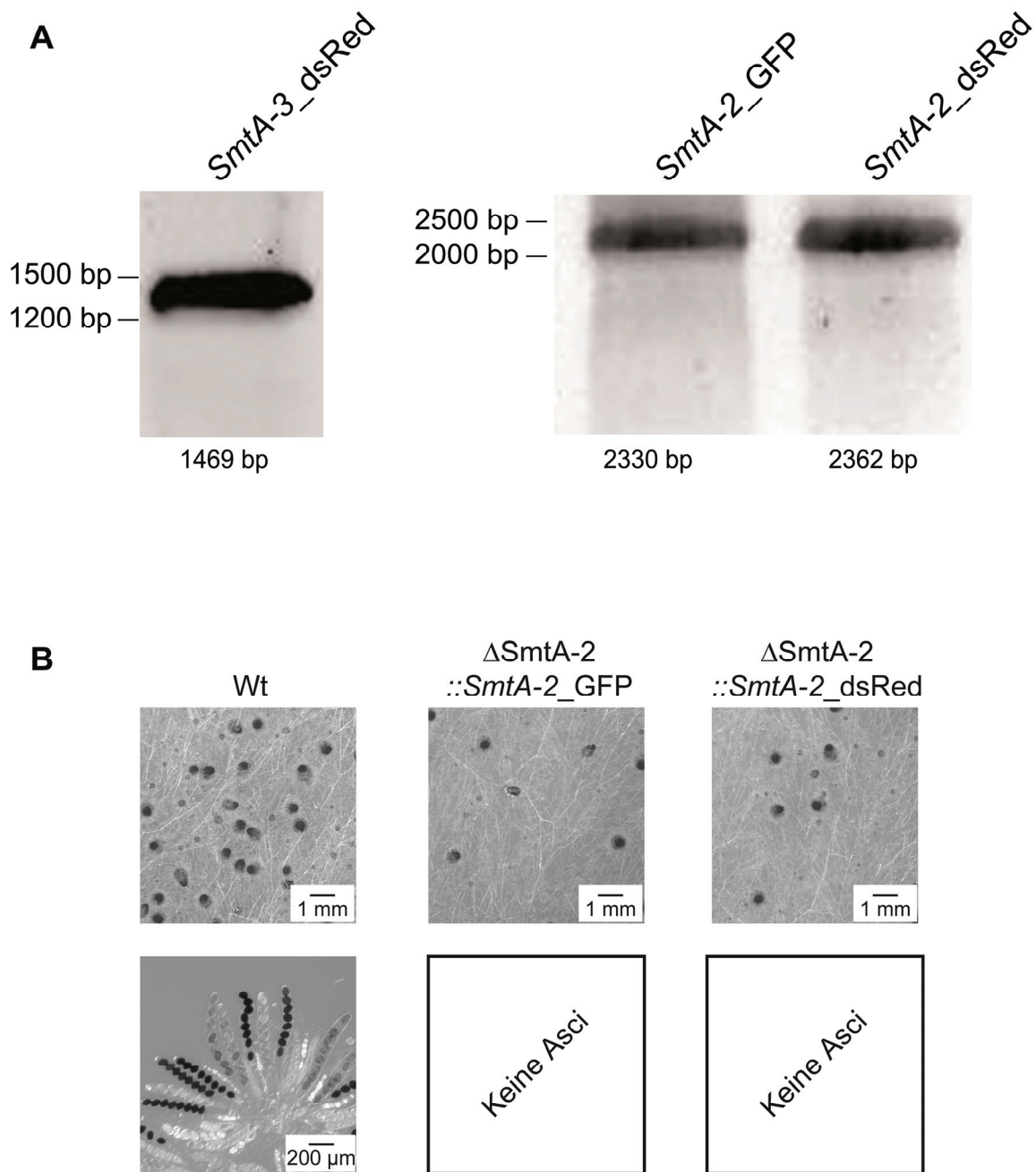
7. Anhang

7.1. Überprüfung der Integration der Komplementationskonstrukte



Anhang A1: Überprüfung der Integration der verschiedenen Komplementationskonstrukte in Δ SmtA-2. Die Analyse wurde mittels PCR mit den Starteroligonukleotiden pRS-Seq-F / pRS-Seq-r durchgeführt. Die erwarteten Bandengrößen für die Komplementation mit *S. macrospora* SmtA-2, *N. crassa* mat A-2 und *P. anserina* SMR1 (A) sind angegeben. Ebenfalls aufgeführt sind die Ergebnisse für die Komplementationskonstrukte A2-188, A2-199, A2-205 (B) und A2-SN (C).

7.2. Überprüfung der Integration der Fluoreszenzkonstrukte



Anhang A2: (A) Überprüfung der Integration der verschiedenen Fluoreszenzkonstrukte in die *S. macrospora* Transformanten mit den Starteroligonukleotiden 1783-f / 1783-r. Die Nukleotide binden im Promotor bzw. Terminator der Konstrukte. Gesamt-DNA der Transformanten wurde nach 3 Tagen Wachstum auf BMM-Flüssigmedium isoliert. (B) Komplementation der Fluoreszenzkonstrukte *SmtA-2_GFP* und *SmtA-2_dsRed* in Δ SmtA-2. Es konnte in keiner der Transformanten eine vollständige Komplementation des sterilen Phänotyps der Mutante beobachtet werden.

7.3. Curriculum vitae V.Klix

Personal Data

Name Volker Klix, Dipl-Biol.
Birth details 29.04.1982 in Essen, Germany

Education

Dr. rer.-nat. (PhD.) at the Georg-August University Göttingen, Germany (begin 04/2007)

- Topic of doctoral thesis: „Charakterisierung des Kreuzungstyp-Locus des filamentösen Ascomyceten *Sordaria macrospora*“ (Functional characterization of the mating-type locus of the filamentous ascomycete *Sordaria macrospora*)

Diploma thesis at the Ruhr-University Bochum, Germany (10/2002 – 03/2007)

- Topic of diploma thesis: “Molekulargenetische Charakterisierung des Kreuzungstyp-Locus des filamentösen Ascomyceten *Sordaria macrospora*” (Molecular and genetic characterization of the mating-type locus of the filamentous ascomycete *Sordaria macrospora*)
- Grade “Sehr gut” equates Grade A

Abitur at the Gymnasium Borbeck, Essen, Germany (1992 – 2001)

- Grade “Gut” equates Grade B

Practical Experience

Doctoral research (04/2007 – 10/2010)

Georg-August University Göttingen, Germany, Dept. Genetics of Eukaryotic Microorganisms (advisor: Prof. Dr. Stefanie Pöggeler)

Characterization of the *MATI-1* mating-type genes of the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*

- Experience with nucleic acid isolation
- Experience with handling of *E. coli* and *S. cerevisiae*
- Performed transformation of *S. macrospora*
- Created mutant strains of different genes
- Experience with Southern blot-, real-Time PCR- and microarray analysis
- Experience with heterologous gene expression in *S. cerevisiae*
- Created fluorescence tagged versions of different proteins and performed fluorescence microscopy
- Experience with sequence analysis, use of Blast algorithms in public databases

Publications

Klix V, Nowrousian M, Ringelberg C, Loros JJ, Dunlap JC, Pöggeler S. (2010) Functional characterization of MAT1-1-specific mating-type genes in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora* provides new insights into essential and nonessential sexual regulators. *Eukaryot. Cell* 9(6): 894-905

Klix V, Nowrousian M, Ringelberg C, Loros JJ, Dunlap JC, Pöggeler S. (2010) Characterization of mating-type mutants of the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora* by real-Time PCR, cross-species microarray and yeast-two-hybrid analysis. *Biospektrum, Abstractband zur VAAM-Jahrestagung 2010 (Sonderband)*

Klix V, Nowrousian M, Ringelberg C, Loros JJ, Dunlap JC, Pöggeler S. (2009) Cross-species microarray and real-Time PCR analysis of differentially regulated genes in mating-type mutants of the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. *Biospektrum, Abstractband zur VAAM-Jahrestagung 2009 (Sonderband)*

Teaching experience

2006 - 2007 Instructor in practical courses at the Ruhr-University Bochum, GER

2007 – present Supervision of students in practical courses/lab courses

Supervision of Diploma- and Bachelor students at the Dept. Genetics of Eukaryotic Microorganisms

Conference Proceedings

2007 VAAM Symposium „Molecular Biology of Fungi“, Hamburg (GER)
poster presentation

2008 9th European Conference on Fungal Genetics, Edinburgh (UK)
poster presentation

2009 VAAM Symposium „Molecular Biology of Fungi“, Münster (GER)
Talk: “Cross-species microarray and real-Time PCR analysis for characterization of mating-type mutants of the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*”

VAAM annual meeting, 2009, Bochum (GER)

poster presentation

2010 3. joined VAAM/DGHM annual meeting, Hannover (GER)

poster presentation