

**Die Regulation der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase
während der sexuellen und parasitischen Interaktion von
*Parasitella parasitica***

Dissertation

**Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplom-Biologin Kornelia Schultze
geboren am 14. Juli 1976 in Gera

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer (Jena)
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Aebi (Zürich)
3. Gutachter: Prof. Dr. Heinz Osiewacz (Frankfurt am Main)

angenommen am: 08. 11. 2004

Promotionsprüfung: 11. 01. 2005

Öffentliche Verteidigung: 25. 01. 2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1.Zusammenfassung	3
2.Einleitung.....	5
2.1.Sexuelle Interaktion	5
2.2.Parasitische Interaktionen – Fusionsparasitismus	6
2.3.Das sexuelle Kommunikationssystem der Zygomyceten	8
2.4.Die 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase: ein Enzym des sexuellen Kommunikationssystems der Zygomyceten.....	10
2.5. Natürliche RNA-Interferenz (RNAi) Mechanismen in Eukaryoten	11
2.5.1. mRNA-Degradation während der RNA-Interferenz	13
2.5.2. Repression der Translation während der RNA-Interferenz	14
2.5.3. Modifikation des Chromatins durch RNAi	15
2.6. Retinsäure-Rezeptoren (RAR).....	16
2.7. Zielsetzung	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Verwendete Materialien	19
3.1.1. Organismen	19
3.1.2. Chemikalien	19
3.1.3. Biochemikalien.....	19
3.2. Kultivierung	20
3.2.1. Medien	20
3.2.2. Vorkulturen	20
3.2.3. Induktionskulturen.....	20
3.3. Isolation von DNA, RNA und Proteinen	21
3.3.1. Isolation von genomischer DNA.....	21
3.3.2. Isolation der RNA.....	22
3.3.3. Isolation von Proteinen	22
3.4. Konzentrationsbestimmungen.....	23
3.4.1. Konzentrationsbestimmungen von genomischer DNA und RNA	23
3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	23
3.5. Analytische Methoden.....	24
3.5.1. Southern-Hybridisierung	24

3.5.2. Northern-Hybridisierung.....	24
3.5.3. Transfer der denaturierten DNA und RNA auf Nitrocellulosefilter	25
3.5.4. Hybridisierung von DNA und RNA mit radioaktiv markierten komplementären PCR-Fragmenten	25
3.5.4.1..... Lösung.....	25
3.5.4.2..... Vorhybridisierung	26
3.5.4.3..... Hybridisierung.....	26
3.5.4.4..... Herstellung der radioaktiv markierten PCR-Fragmente	26
3.5.4.4.1.. Radioaktive Markierung beider Stränge eines DNA-Fragments.....	26
3.5.4.4.2.. Radioaktive Markierung eines Strangs eines DNA-Fragments	27
3.5.4.5..... Reinigung der radioaktiv markierten PCR-Fragmente	27
3.5.4.6..... Waschen der Nitrocellulosefilter nach der Hybridisierung.....	28
3.5.4.7..... Autoradiographie.....	28
3.5.5. RT-PCR	28
3.5.5.1..... Synthese von cDNA.....	28
3.5.5.2..... Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
3.5.5.3..... Elektrophorese der PCR-Produkte.....	29
3.5.5.4..... Restriktion der RT-PCR-Produkte.....	31
3.5.6. Western-Analyse.....	31
3.5.6.1..... SDS-Gelelektrophorese	32
3.5.6.2..... Färben des SDS-Gels.....	32
3.5.6.3..... Elektrophoretischer Transfer von Proteinen.....	32
3.5.6.4..... Ponceau-Färbung von Proteinen / Kontrolle des Elektrotransfers	33
3.5.6.5..... Antikörper-Reaktionen	33
4. Ergebnisse.....	35
4.1. Sequenzanalyse des <i>TDH</i> -Genes und der angrenzenden Regionen ..	35
4.2. Promotoranalyse der Gene des <i>TDH</i> -Genclusters.....	40
4.3. Charakterisierung der 4-Dihydromethyltrispurat-Dehydrogenase	45
4.3.1. Das Gen für die 4-Dihydromethyltrispurat-Dehydrogenase kommt in beiden Kreuzungstypen nur einmal vor.....	45
4.3.2..... Die 4-Dihydromethyltrispurat-Dehydrogenase wird in beiden Kreuzungstypen transkribiert	46

4.3.3.....	Bestimmung der Transkriptgröße für das Gen der	
.....	4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase	51
4.3.4.....	(-)-Kreuzungstyp-spezifische Expression der 4-Dihydromethyltrisporat-	
.....	Dehydrogenase in der Kreuzkultur von <i>P. parasitica</i>	51
4.3.5.....	3´RACE-PCR zum Bestimmen der Transkriptlänge von <i>TDH</i>	53
4.3.6.....	Die 5´- und 3´-Bereich des <i>TDH</i> -Transkripts überlappen die der	
.....	benachbarten Genen <i>ORF2</i> und <i>ACT</i>	54
4.3.6.1.....	Der 5´-Bereich des <i>TDH</i> -Transkripts überlappt mit dem 5´-Bereich	
.....	des <i>ORF2</i> -Transkripts.....	54
4.3.6.2.....	Der 3´-Bereich des <i>TDH</i> -Transkripts überlappt mit dem 3´-Bereich	
.....	des <i>ACT</i> -Transkripts	55
4.3.7.	Die 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase ist ein (-)-kreuzungstyp-	
.....	spezifisches Enzym	56
4.4.	Charakterisierung des putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase-Gens	
.....	und des <i>ORF3</i> -Gens.....	59
4.4.1	Das <i>ACT</i> -Gen und das <i>ORF3</i> -Gen treten in beiden Kreuzungstypen	
.....	In unterschiedlicher Anzahl auf.....	59
4.4.2.	Das Transkript der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase und das	
.....	Transkript des entgegengesetzt orientierten <i>ORF3</i> -Gens haben die	
.....	gleiche Größe	60
4.4.3.	Die Introns der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase werden in	
.....	<i>P. parasitica</i> korrekt entfernt	62
4.4.4.....	3´RACE-PCR zum Bestimmen der Transkriptlänge der putativen	
.....	Acyl-CoA-Thioesterhydrolase	64
4.5.	Charakterisierung von <i>ORF1</i> und <i>ORF2</i>	65
4.5.1.....	<i>ORF1</i> und <i>ORF2</i> werden in den Einzel- und Kreuzkulturen von	
.....	<i>P. parasitica</i> expremiert	65
4.5.2.....	(-)-Kreuzungstyp-spezifische Expression von <i>ORF1</i> in der Kreuzkultur	
.....	von <i>P. parasitica</i>	68
4.5.3.....	3´RACE-PCR zum Bestimmen der Transkriptlänge des	
.....	<i>ORF1</i> -Transkripts	69
4.6.....	Charakterisierung des <i>HSP</i> -Gens.....	70

4.6.1.....	Das <i>HSP</i> -Gen existiert als einfache Kopie in beiden Kreuzungstypen	70
4.6.2.	Northern-Analysen ergaben zwei Transkriptgrößen für das <i>HSP</i> -Gen	71
4.6.3.....	(-)-Kreuzungstyp-spezifische Expression des <i>HSP</i> -Gens während der sexuellen Interaktion.....	72
4.6.4.	Das <i>HSP</i> -Gen wird ebenfalls abhängig vom Status der parasitischen Interaktion exprimiert	73
5.	Diskussion	74
6.....	Literatur.....	83
	Selbstständigkeitserklärung	96
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	97
	Besonders bedanken möchte ich mich bei	98
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	99

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Acyl-CoA-Thioesterhydrolase
ADP/	Adenosindiphosphat/
ATP	Adenosintriphosphat
bp/ kb	Basenpaar/ Kilobasenpaar
COG _s	Datenbank für Proteinfamilien (Clusters of orthologous groups of proteins)
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2C2	Protein des miRNP-Komplexes
EMBL	Datenbank der European Molecular Biology Laboratories
ERI1	3´5´-Exonuklease (ER-associated Ras Inhibitor 1)
FRC	Pilz-Referenz-Zentrum Jena (Fungal Reference Centre Jena)
FSU	Friedrich Schiller Universität
g	Erdbeschleunigung
Germin3	Protein des miRNP-Komplexes
Germin4	Protein des miRNP-Komplexes
GTP	Guanosintriphosphat
HSP	Hitze Schock Protein
miRNAs	kleine doppelsträngige RNA beteiligt an der RNA-Interferenz (microRNAs)
miRNP	Multiproteinkomplex beteiligt an der RNA-Interferenz (microribonucleoproteins)
MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NADP ⁺ /	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADPH	(oxidierte/reduzierte Form)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-CoR	Repressor beteiligt an der RNA-Interferenz (nuclear receptor corepressor)
OD	Optische Dichte

Abkürzungsverzeichnis

ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pfam	Datenbank für Proteinfamilien (Protein families database of alignments and HMMs (Hidden Markov Modell))
RACE	Methode zur Amplifikation von cDNA-Enden (Rapid Amplification of cDNA Ends)
RAR	Retinsäure-Rezeptoren
rasiRNAs	kleine doppelsträngige RNA beteiligt an der RNA-Interferenz (repeat-associated short interfering RNAs)
RISC	Multiproteinkomplex beteiligt an der RNA-Interferenz (RNAi-induced silencing complex)
RITS	Multiproteinkomplex beteiligt an der RNA-Interferenz (RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
SAP/SAF	Nukleinsäure-Bindedomänen
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNAs	kleine doppelsträngige RNA beteiligt an der RNA-Interferenz (short interfering RNAs)
SMRT	Repressor beteiligt an der RNA-Interferenz (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor)
TDH	4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TTP	Thymidintriphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtszent

1. Zusammenfassung

Parasitella parasitica ist ein fakultativer Fusionsparasit, der zur Ordnung der Mucorales gehört. *P. parasitica* ist in der Lage, mit zahlreichen Arten der Mucorales in parasitische Wechselwirkung zu treten. Im Verlauf der parasitischen Interaktion wird genetischen Materials des Parasiten in die Wirte übertragen. Die Partnererkennung während der sexuellen und parasitischen Interaktion basiert auf dem Trisporoid-Signal-System.

Die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase (TDH) ist ein Schlüsselenzym in der Trisporinsäure-Biosynthese. Das Enzym katalysiert die (-)-Kreuzungstyp-spezifische Umsetzung von 4-Dihydromethyltrisorat zu Methyltrisorat. Das Gen für die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase ist in einem kompakten Gencluster lokalisiert. Die 3'-Enden des *TDH*-Gens und eines weiteren Gens, das für eine putative Acyl-CoA-Thioesterhydrolase (ACT) kodiert, sind nur durch 70 bp von einander getrennt. Die Polyadenylierungsstellen beider Gene überlappen. Das *TDH*-Gencluster enthält zudem drei weitere Gene unbekannter Funktion. Zwei dieser Gene (*ORF1* und *ORF2*) grenzen im 5'-Bereich an das *TDH*-Gen, das dritte Gen (*ORF3*) überlagert vollständig, aber in entgegengesetzter Orientierung, den 3'-Bereich des *ACT*-Gens. 4 kb vom *TDH*-Gencluster entfernt, befindet sich ein weiteres Gen, das für ein mögliches Hitzeschock Protein (HSP) kodiert.

Das Transkript der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase wurde in den nicht stimulierten Einzelkulturen und während der sexuellen Reaktion gebildet. Das Enzym wurde dagegen ausschließlich im (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur nachgewiesen. Folglich wird das Transkript der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase im unstimulierten (+)-Kreuzungstyp posttranskriptional reguliert. In entwickelten sexuellen und parasitischen Strukturen ist die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase aktiv. Während der sexuellen Interaktion werden die *TDH*-Transkripte ausschließlich vom (-)-Kreuzungstyp gebildet. Das Gen der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase des (+)-Kreuzungstyps wird während der sexuellen Reaktion transkriptional reguliert.

Das Transkript der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase wird im (+)-Kreuzungstyp und bei Kokultivierung gleicher Kreuzungstypen des Parasiten und des Wirts exprimiert. Das *ACT*-Transkript überlappt im 3'-Bereich mit dem Transkript der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase. Unter diesen Umständen wird kein *TDH*-

Zusammenfassung

Translationsprodukt erwartet. Die in der sexuellen Reaktion erhaltenen *ORF1*-Transkripte werden ausschließlich vom (-)-Kreuzungstyp gebildet. Die Expression des *ORF1*-Gens des (+)-Kreuzungstyps wird während der sexuellen Interaktion unterdrückt. Das *HSP*-Gen wird verstärkt während der sexuellen Entwicklung und während der parasitischen Interaktion komplementärer Kreuzungspartner exprimiert. Bei Kokultivierung gleicher Kreuzungstypen von Parasit und Wirt wird das *HSP*-Gen nicht transkribiert.

Aus den Ergebnissen wurden Modelle für die Regulation der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase in *P. parasitica* entwickelt.

2. Einleitung

2.1. Sexuelle Interaktion

Parasitella parasitica ist ein heterothallischer Zygomycet, der zur Ordnung der Mucorales und der Familie der Mucoraceae gehört. *P. parasitica* ist in der Lage, sich sowohl sexuell als auch asexuell fortzupflanzen. Die asexuelle Fortpflanzung erfolgt über Mitosporen. Diese werden in Sporangien gebildet, die sich am Ende von Lufthyphen entwickeln. Als Folge des sexuellen Zyklus werden Zygosporen gebildet. Zu Beginn des sexuellen Fortpflanzungsprozesses wachsen Progametangien aufeinander zu und treten anschließend miteinander in Kontakt (Abb.:1). An diesen Kontaktstellen schwellen die Progametangien an. In den Schwellungen sammeln sich zahlreiche Kerne.

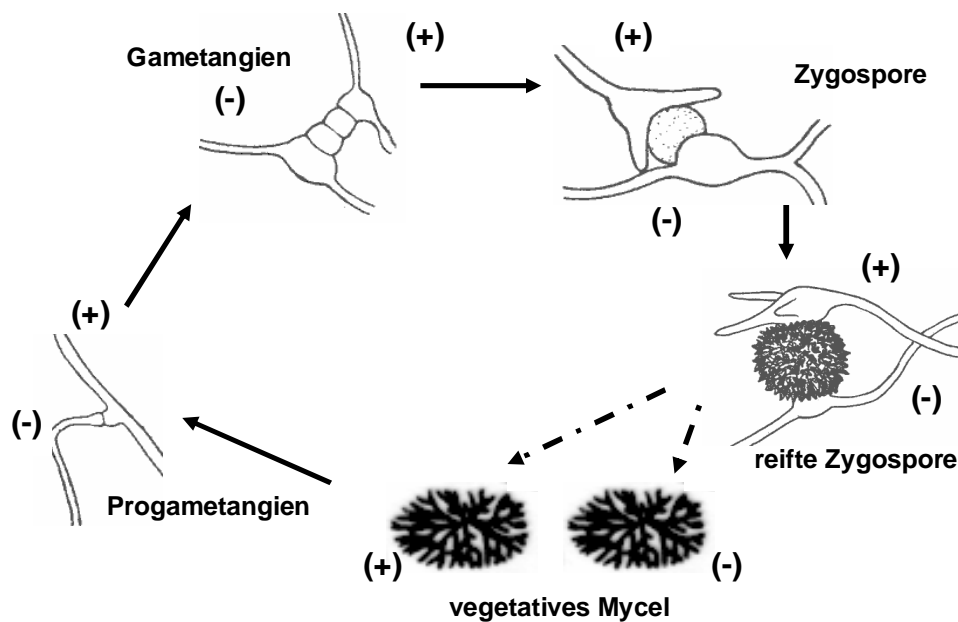


Abb.1: Sexueller Lebenszyklus des heterothallischen Zygomyceten *Parasitella parasitica*. An der Kontaktstelle zu einer sexuell differenzierten Hyphe entwickeln sich Progametangien. Diese Hyphen schwellen zunächst an, Kerne wandern ein. Schließlich kommt es zur Differenzierung von Gametangien. Durch die Fusion der Gametangien mischen sich die Kerne der beiden Kreuzungspartner. Aus der Fusionszone entwickelt sich die Zygospore, in der Kernfusion und Meiose stattfinden. (Abbildung entnommen: Burgeff, 1924; Jones, *et al.*, 1981)

Die Progametangien differenzieren sich durch Einziehen von Septen in Gametangien und Suspensoren. Anschließend löst sich die Zellwand zwischen den Gametangien der beiden Kreuzungspartner auf. Danach vermischen sich die Kerne der beiden

Kreuzungstypen (Abb.:1). Die sich anschließende Kernfusion und Meiose findet in der Zygosporangium statt, die sich aus dem Fusionsbereich der beiden Kreuzungstypen entwickelt (Bergman *et al.*, 1969; Eslava *et al.*, 1975). Durch Einlagerung von Pigmenten in die Zygosporangium wird deren Bildung abgeschlossen. Die Zygosporangium kann zum einen als Überdauerungsform genutzt werden und zum anderen zu einem Keimsporangium auskeimen, welches vegetative Sporen freisetzt.

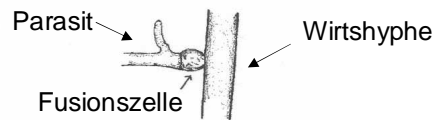
2.2. Parasitische Interaktion - Fusionsparasitismus

Neben der sexuellen Reaktion mit einem kompatiblen Kreuzungspartner ist *P. parasitica* auch in der Lage, mit verschiedenen anderen Gattungen der Mucoraceae parasitische Wechselwirkungen einzugehen. Die meisten der von *Parasitella* infizierbaren Gattungen, wie z.B. *Absidia*, *Thamnidium* oder *Blakeslea* sind biotechnologisch relevant. Vertreter der Gattungen *Absidia* und *Thamnidium* werden zur Biotransformation von Steroiden eingesetzt. *Blakeslea trispora* wird zur Produktion von β -Carotin im industriellen Maßstab genutzt.

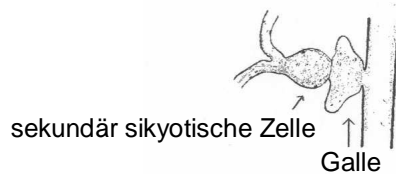
Analogien zwischen der sexuellen und der parasitischen Interaktion bestehen in der Herausbildung von differenzierten Strukturen, in Anwesenheit eines komplementären Kreuzungspartners und in der Entwicklung einer Dauersporangium am Ende des Prozesses (Wöstemeyer *et al.*, 1997).

Zu Beginn der parasitischen Interaktion treten die Hyphen von Parasit und Wirt miteinander in Kontakt. Parallel zur sexuellen Reaktion kommt es zum Anschwellen der Hyphe des Parasiten an der Kontaktstelle mit der Wirtshyphe. Dieser vom Parasiten gebildete angeschwollene Hyphenbereich wird als primär sikyotische Zelle bezeichnet (Abb.:2a). Der Parasit transportiert Zellkerne in diese primär sikyotische Zelle. Anschließend zieht der Parasit, unmittelbar an die primär sikyotische Zelle grenzend, ein Septum ein. Die primär sikyotische Zelle fusioniert mit der Wirtshyphe. Es kommt zur begrenzten Plasmafusion zwischen Parasit und Wirt. Im Anschluss daran bildet der Parasit die sekundär sikyotische Zelle aus, die Schröpfkopfzelle (Abb.:2b,c). Diese differenziert sich zur Sikyospore, die vom Wirt mit einer gallenartigen Struktur umgeben wird, die sich aus dem primären Fusionsbereich entwickelt (Abb.:3).

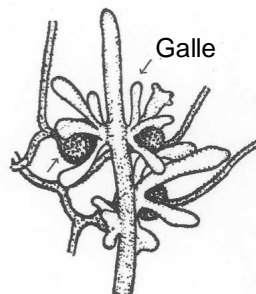
Die Parasit-Wirt-Interaktion ist somit verbunden mit einer lokalen Zytoplasma-Fusion zwischen beiden Organismen und dem Transfer von Zellkernen vom Parasiten zum



(a) frühe Phase der parasitischen Interaktion



(b) Bildung der sekundären sikyotischen Zelle



(c) reife Sikyospore

Abb.2: Prozess der parasitischen Interaktion (a) Zeigt die frühe Phase einer parasitischen Interaktion. Die Hyphen des Parasiten und des Wirts sind miteinander in Kontakt getreten. Der Parasit hat die primäre sikyotische Zelle ausgebildet. (b) Die sekundäre sikyotische Zelle wurde ausgebildet. Diese wird seitens des Wirts mit einer gallenartigen Struktur umgeben. (c) Darstellung einer reifen Sikyospore als Ergebnis der parasitischen Interaktion von *P. parasitica* mit ihrem Wirt *A. glauca*. (Abbildungen entnommen: Burgeff, 1924)

Wirt. Der Transfer von genetischem Material konnte durch die Komplementation von Methionin- und Histidin-auxotrophen *A. glauca* Mutanten sowie durch den Transfer eines Plasmids, das ein Neomycin-Resistenzgen trug, gezeigt werden (Kellner *et al.*, 1993). Was mit den Kernen des Parasiten im Wirt geschieht, ist unklar. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die Kerne der Kreuzungspartner miteinander fusionieren und so aneuploide Endprodukte entstehen könnten. Dafür wurden allerdings bisher keine Hinweise gefunden. Andererseits könnten die Rekombinanten durch Transformationsereignisse entstanden sein. Nach dieser Vorstellung löst sich der Zellkern des Parasiten nach dem Eintritt in die Wirtshyphe auf. Die entstandenen DNA-Fragmente könnten so durch Transformation in den Zellkern des Wirts gelangen und

dort als sich autonom replizierende Plasmide weiter existieren (Wöstemeyer, *et al.*, 2002).

Bei der parasitischen Interaktion von *P. parasitica* mit ihrem Wirt *Absidia glauca* werden nur dann Sikyosporen erhalten, wenn Parasit und Wirt komplementären Kreuzungstypen angehören. Dagegen ist die Sikyosporenbildung unvollständig in einer Interaktion eines Parasiten und eines Wirts des gleichen Kreuzungstyps. Ein Zusammenhang zwischen der sexuellen und der parasitischen Interaktion bei Zygomyceten wurde bereits von Burgeff (1924) vermutet. Diese These wird durch die gemeinsame Trisporsäure Produktion bei einer Kokultivierung von komplementären *Parasitella* und *Absidia* Stämmen unterstützt (Wöstemeyer *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass das sexuelle Kommunikationssystem der Zygomyceten in den Prozess der Wirtserkennung involviert sein muss.

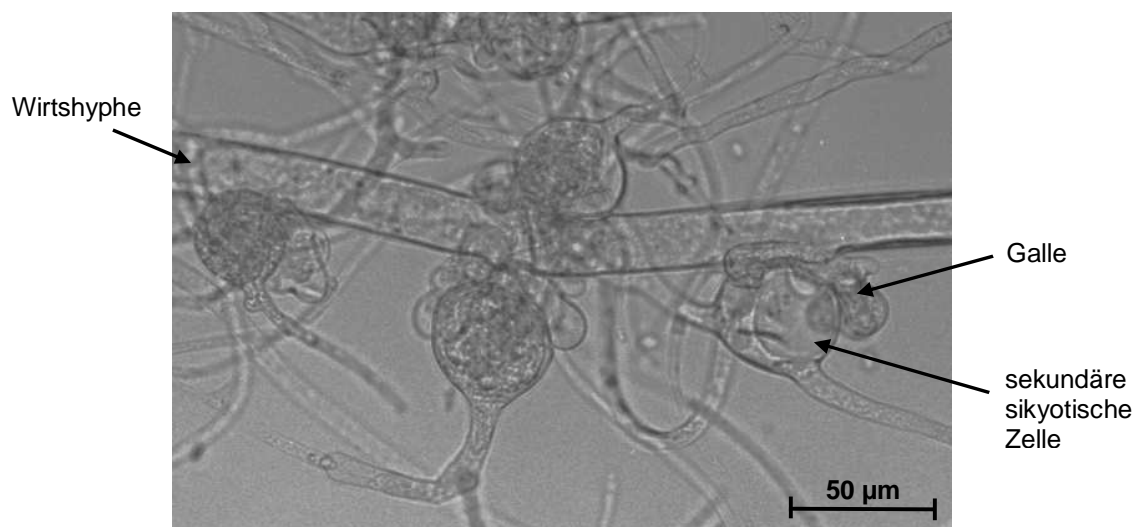


Abb.3: Fusionsparasitismus. Sikyosporenbildung zwischen *P. parasitica* mit ihrem Wirt *T. elegans*. Die parasitische Interaktion ist bereits abgeschlossen. Der Parasit hat die sekundären sikyotischen Zellen ausgebildet, die der Wirt mit einer gallenartigen Struktur umgibt. Die Wirtshyphe befindet sich im Zentrum der Abbildung. (Fotographie: Dr. Christine Schimek)

2.3. Das sexuelle Kommunikationssystem der Zygomyceten

Das sexuelle Kommunikationssystem der Zygomyceten basiert auf der kooperativen Biosynthese des Sexualhormons Trisporsäure durch beide Kreuzungspartner. Bei den Trisporoiden handelt es sich um Derivate von β -Carotin. Die Aktivität und Spezifität der Trisporoide wird durch funktionelle Gruppen am Ring bzw. an der C₁₃-Position der Isoprenoidseitenkette hervorgerufen (Gooday, 1994). Die Trisporsäure zeigt strukturelle

Einleitung

Ähnlichkeiten zu den Retinoiden der Vertebraten. Im Verlauf der sexuellen Reaktion wirken Trisporoide auf unterschiedliche Weise: sie sind für die Partnererkennung verantwortlich, bewirken die Entwicklung sexuell differenzierter Hyphen und steuern die Regulation der sexuellen Morphogenese zum späteren Zeitpunkt der sexuellen Entwicklung (Gooday 1978, van den Ende 1984).

Die am Ende der Biosynthesekette stehende Trisporosäure kann nur dann gebildet werden, wenn tatsächlich beide Kreuzungspartner beteiligt sind, da keiner der beiden allein in der Lage ist das Sexualhormon zu synthetisieren. Nur die frühen Syntheseschritte sind in beiden Kreuzungstypen identisch. So wird sowohl im (+)- als auch im (-)-Kreuzungstyp durch Oxidation des β -Carotins die gemeinsame Vorstufe 4-Dihydrotrisporin produziert.

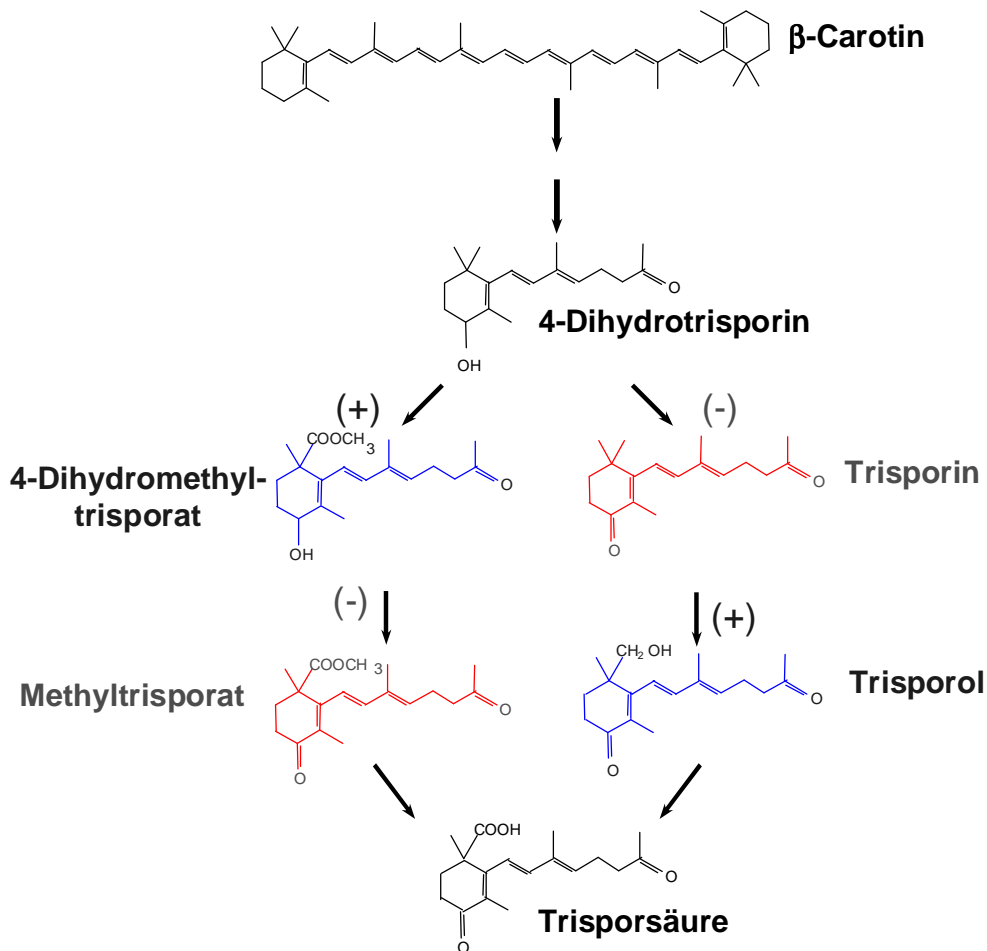


Abb.4: Biosyntheseweg des Sexualhormons der Zygomyceten, der Trisporosäure, durch die komplementären Kreuzungspartner (nach Werkman, 1976).

Der (+)-Kreuzungstyp wandelt 4-Dihydrotrisorin zu 4-Dihydromethyltrisorat um. Im (-)-Kreuzungstyp wird aus dem 4-Dihydrotrisorin das Trisorin gebildet. Beide Substanzen wirken als Pheromone und haben somit eine große Bedeutung beim Finden der beiden Kreuzungspartner.

Die Vorstufe des (+)-Kreuzungstyps, das 4-Dihydromethyltrisorat, wird im (-)-Kreuzungstyp zu Methyltrisorat umgesetzt. Diese Reaktion wird durch die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase katalysiert. Trisporsäure entsteht in einem letzten Schritt, katalysiert von einer (-)-kreuzungstyp-spezifischen Esterase. Trisporsäure wirkt induzierend auf die Biosynthese der Carotinoide (van den Ende, 1968) und steigert die Synthese der eigenen Vorstufen (Werkman & van den Ende, 1973). Desweiteren werden die Produktion und die Aktivität der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase stimuliert (Werkman, 1976) (Czempinski *et al.*, 1996). Möglicherweise sind die Wirkmechanismen der Trisporsäure ähnlich denen der Retinsäure, die strukturellen Ähnlichkeiten sprechen dafür. Retinsäure bildet durch Bindung an einen Retinsäure-Rezeptor einen Rezeptor-Liganden-Komplex, der als Transkriptionsfaktor für die Expression funktionell wichtiger Gene verantwortlich ist. Das sexuelle Kommunikationssystem der Zygomyceten funktioniert in weiten Bereichen artenübergreifend. So kann Trisporsäure aus *Blakeslea trispora* die Zygophorenbildung in *Mucor mucedo* induzieren (Werkman & van den Ende, 1973).

2.4. Die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase: ein Enzym des sexuellen Kommunikationssystems der Zygomyceten

Die (-)-kreuzungstyp-spezifische 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase (TDH) katalysiert die Umwandlung des (+)-kreuzungstyp-spezifischen Pheromons, dem 4-Dihydromethyltrisorat zu Methyltrisorat. Das Enzym nutzt NADP⁺ als Kofaktor und gehört zur Aldo / Keto-Reduktase-Superfamilie. Aus *Mucor mucedo*, einem der Wirte von *P. parasitica*, wurde das Enzym bereits isoliert. Das Molekulargewicht der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase in *M. mucedo* beträgt 33 kDa (Czempinski *et al.*, 1996).

In *M. mucedo* konnte jedoch die Existenz einer weiteren Dehydrogenase nachgewiesen werden. Die 4-Dihydrotrisorin-Dehydrogenase katalysiert ausschließlich Bildung des (-)-kreuzungstyp-spezifischen Pheromons Trisorin (persönliche Mitteilung Caroline Walter). Die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase wandelt in *M. mucedo* sowohl

4-Dihydromethyltrisporet zu Methyltrisporet als auch 4-Dihydrotrisporetin zu Trisporetin um. Ob die 4-Dihydromethyltrisporet-Dehydrogenase in *P. parasitica* auch die (-)-kreuzungstyp-spezifische Umwandlung von 4-Dihydrotrisporetin zu Trisporetin katalysiert, ist nicht bekannt.

2.5. Natürliche RNA-Interferenz (RNAi) Mechanismen in Eukaryoten

Eine Möglichkeit der posttranskriptionalen Genregulation ist der RNA-Interferenz-Mechanismus. Dieser natürliche Mechanismus ist weit verbreitet, er wurde in Protozoen, Invertebraten, Pflanzen und Vertebraten sowie bei Algen und Pilzen nachgewiesen. Die RNA-Interferenz lässt sich in drei Teilreaktionen untergliedern, die sequenz-spezifische RNA-Degradation, die Chromatin Modifikation sowie die Repression der Translation (Agrawal, 2003; Meister & Tuschl, 2004) (Abb.:5). In *Arabidopsis thaliana* und in *Drosophila melanogaster* kommen alle drei Prozesse vor (Meister & Tuschl, 2004). In *Schizosaccharomyces pombe* hingegen wurden die sequenz-spezifische Degradation der mRNA und die Modifikation des Chromatins nachgewiesen (Meister & Tuschl, 2004). In *Caenorhabditis elegans* und den Vertebraten kommen mRNA-Degradationsprozesse und die Repression der Translation vor (Meister & Tuschl, 2004). Die RNA-Interferenz-Mechanismen treten immer dann auf, wenn doppelsträngige RNA (dsRNA) vorliegt. Diese kann durch die Interaktion von komplementären RNA-Molekülen, durch endogene Prozesse innerhalb der Zelle (MicroRNA) oder durch eine RNA abhängige RNA-Polymerase (RdRP) entstehen. Die MicroRNA-Moleküle bestehen aus exakt 70 Nukleotiden, die in einer Haarnadelstruktur im Zytoplasma vorliegen (Dorsett & Tuschl, 2004). Auch die verschiedenen RNAi-Prozesse finden alle im Zytoplasma statt. Dort werden die dsRNAs von dsRNA-prozessierenden Enzymen erkannt, und zu kleinen dsRNA-Molekülen von 21-28 Nukleotiden abgebaut. Solche kleinen dsRNA-Moleküle sind die siRNAs, die rasiRNAs und die miRNAs (Meister & Tuschl, 2004). Eines der dsRNA-prozessierenden Enzyme ist Dicer. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine dsRNA-spezifische RNase, die homolog zur RNase III der Prokaryoten ist. Das konservierte Protein wurde in Invertebraten, Vertebraten, Pflanzen und Pilzen nachgewiesen. Dicer ist ein ATP-abhängiges Enzym mit einer N-terminalen Helicase-Domäne sowie zwei RNase III Motiven. Das dsRNA-Bindemotiv befindet sich am C-Terminus.

Einleitung

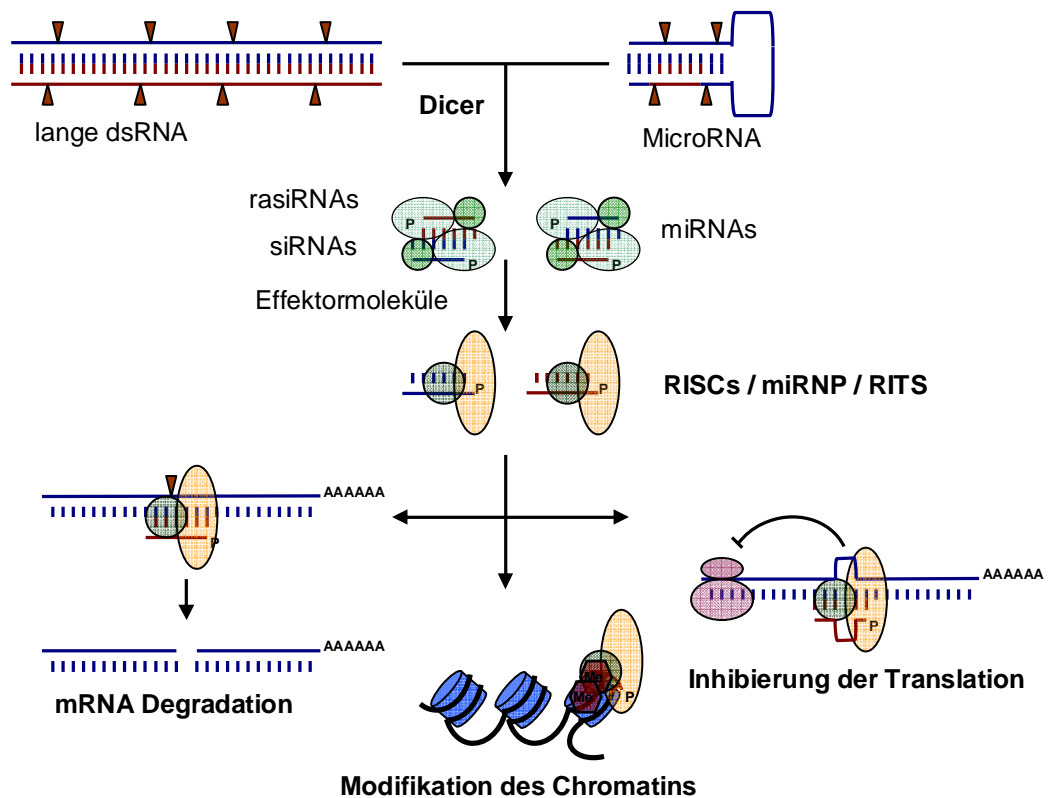


Abb.5: Übersicht über die natürlichen Antisense-Regulationsmechanismen in Eukaryoten. Doppelsträngige RNA entsteht entweder endogen oder durch Aneinanderlagerung komplementärer RNA-Stränge. Durch dsRNA prozessierende Enzyme, wie zum Beispiel Dicer, wird Doppelstrang-RNA zu einheitlichen Bruchstücken von 21-28 nt zerlegt (siRNAs, rasiRNAs, miRNAs). Diese binden an dsRNA-Binde-Proteinen. Der entstandene Proteinkomplex bewirkt dann die mRNA-Degradation, die Modifikationen am Chromatin oder die Inhibition der mRNA-Translation. (modifiziert nach: Dorsett&Tuschl, 2004).

Die Anzahl der Dicer-ähnlichen Proteine variiert in den einzelnen Organismen (Meister & Tuschl, 2004).

Die siRNAs (short interfering RNAs) sind nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression regulieren. Sie sind an der mRNA-Degradation beteiligt. Die rasiRNAs (repeat-associated short interfering RNAs) werden für den Prozess der DNA-Methylierung benötigt (Meister & Tuschl, 2004). Auch bei den miRNAs (microRNAs) handelt es sich um nicht-kodierende RNA-Moleküle. Die miRNAs sind an der Reprimierung der Translation und an der mRNA-Degradation beteiligt (Nelson, *et al.* 2004). Die siRNAs, rasiRNAs und die miRNAs werden von ds-RNA-bindenden Effektormolekülen erkannt und gebunden. Jeweils ein Einzelstrang der siRNAs,

asiRNAs oder der miRNAs wird anschließend an verschiedene Multiproteinkomplexe weitergeleitet (Dorsett & Tuschl, 2004). Solche Multiproteinkomplexe sind der RISC-, der miRNP- oder der RITS-Komplex. Die Spezifität der Reaktion wird durch diese Proteinkomplexe vermittelt. Der RISC-Komplex (RNAi-induced silencing complex) katalysiert die spezifische Degradation von mRNA-Molekülen. Die Spezifität wird von der gebundenen siRNA vermittelt, die die Bindung des RISC-Komplexes an die degradierende mRNA bewirkt (Dorsett & Tuschl, 2004). Der miRNP-Komplex (microribonucleoproteins) bindet miRNAs und verhindert die Translation der komplementären mRNA (Nelson *et al.* 2004). Der RITS-Komplex (RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing) bindet die asiRNAs und katalysiert die sequenz-spezifische Methylierung des Chromatins (Verdel, *et al.*, 2004).

2.5.1. mRNA-Degradation während der RNA-Interferenz

Bei der sequenz-spezifischen Degradation komplementärer oder teilweise komplementärer mRNAs werden siRNA- oder miRNA-Einzelstränge vom RISC-Multiproteinkomplex gebunden. Die Einzelstrang-RNA vermittelt die Bindung des Multiproteinkomplexes an die zu degradierende komplementäre mRNA. Die Bindungsstelle für siRNAs und miRNAs mit der zu degradierenden mRNA liegt mindestens 10 Nukleotide entfernt vom 5'-Bereich der mRNA statt (Dorsett & Tuschl, 2004). Die Degradation der mRNA erfolgt im Zentrum der komplementären Stränge, die durch die Paarung der mRNA mit der siRNA oder miRNA entstanden sind (Meister & Tuschl, 2004). Für diesen Prozess wird kein ATP benötigt. Der ATP-Verbrauch während der mRNA-Degradation ist auf die Tätigkeit von RNA-Helicasen zurückzuführen. Der RISC-Komplex katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe der mRNA (Martinez & Tuschl, 2001).

Ein negativer Regulator im RNAi-Prozess ist ERI1 (ER-associated Ras Inhibitor 1). Dieses Enzym wurde erstmals in neuronalen Zellen von *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen und ist dort Antagonist des Dicer-Enzyms. ERI1 verfügt über eine 3'5'Exonuklease-Aktivität und baut siRNAs ab (Kennedy, *et al.*, 2004). ERI1 entfernt die beiden Nukleotide der überhängenden Enden der siRNA (Abb.:6). Die so veränderten siRNAs sind instabil und können sie nicht mehr an den RISC-Multiproteinkomplex binden. ERI1 verringert so die Menge der von Dicer gebildeten siRNAs, parallel dazu sinkt der Anteil abgebauter mRNAs.

Einleitung

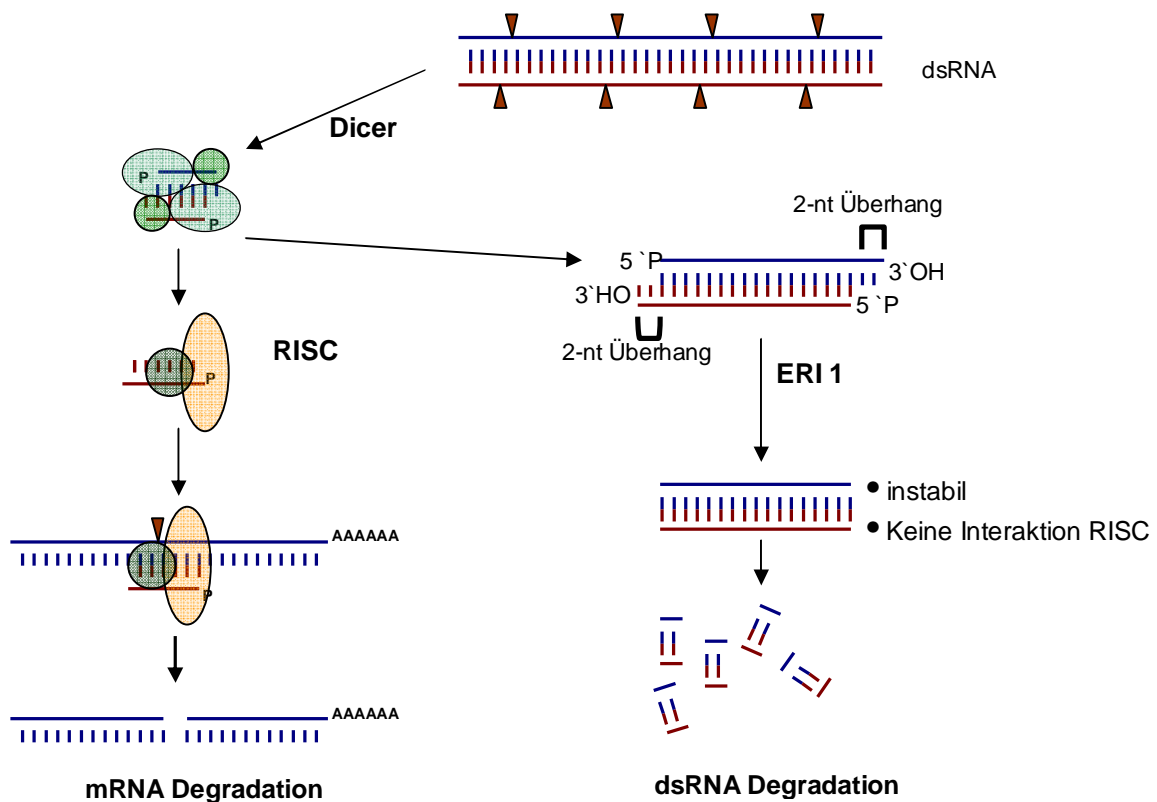


Abb.6: Abbauprozess von mRNA in *Caenorhabditis elegans*. In *C. elegans* wurde ERI1, ein Antagonist zu Dicer nachgewiesen. Dieses Enzym verringert die Menge gebildeter siRNAs. (Abbildung modifiziert nach (Dorsett & Tuschl, 2004).

2.5.2. Repression der Translation während der RNA-Interferenz

Die Translation wird während der Elongations- bzw. der Terminationsreaktion unterdrückt. Die Initiationsreaktion ist von diesem RNAi-Mechanismus nicht betroffen (Meister & Tuschl, 2004). Der Prozess wurde erstmal für *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Olsen & Ambros, 1999). Auch bei der Steuerung der Genregulation menschlicher neuronaler Zelllinien wurde eine RNAi-vermittelte Repression der Translation vermutet (Nelson, *et al.*, 2004). In beiden Fällen konnte eine Kosedimentation der Proteine des miRNP-Multiproteinkomplexes und der miRNAs mit den Polyribosomen gezeigt werden. Im Menschen wird die miRNA durch eine Untereinheit des miRNP-Komplexes gebunden (Abb.:7), die die Bindung mit der zu inhibierenden mRNA vermittelt. Nelson *et al.* postulieren ein weiteres unbekanntes Protein, welches die Wechselwirkung mit den Ribosomen katalysieren soll (Abb.7).

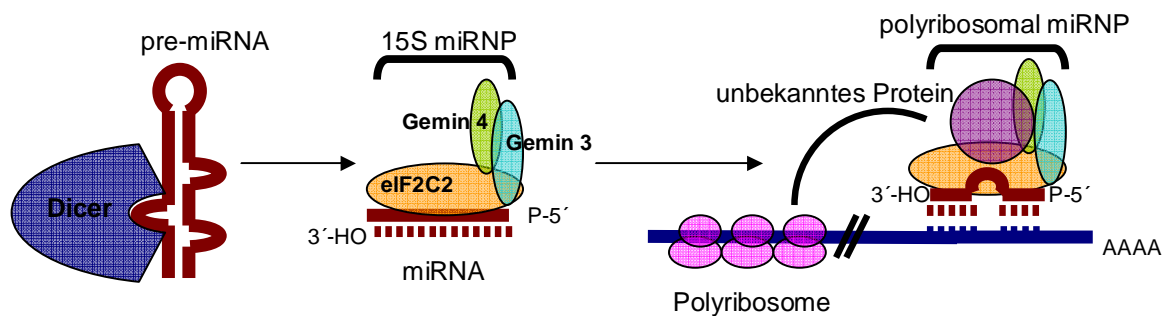


Abb.7: Modell der Repression der Translation in neuronalen Zelllinien des Menschen. Nach dem Entstehen der miRNAs durch Dicer werden diese an den miRNP-Multiproteinkomplex gebunden. Dies wird durch die Untereinheit eIF2C2 katalysiert. Bei Gemin3 handelt es sich vermutlich um eine putative RNA Helicase. Die miRNA vermittelt die Bindung an die zu inhibierenden mRNA. Die Repression der Translation wird durch die Interaktion des miRNP-Komplex mit den Ribosomen erreicht. Dafür muss der miRNP-Komplex ein unbekanntes Protein binden. Dieses Protein wird durch die Untereinheiten Gemin4 und eIF2C2 des miRNP-Komplexes gebunden (nach Nelson, *et al.*, 2004).

2.5.3. Modifikation des Chromatins durch RNAi

Der dritte Mechanismus der RNA-Interferenz ist die Modifikation des Chromatins. Dieser Prozess ist aus *Arabidopsis thaliana* (Zilberman, *et al.*, 2003), *Drosophila melanogaster* (Pal-Bhadra, *et al.*, 2002) und *Schizosaccharomyces pombe* (Verdel, *et al.*, 2004) bekannt. Die Inhibierung der Genexpression erfolgt dabei entweder durch Methylierung des Cytosins in der DNA oder durch die Methylierung von Lysin 9 am Histon 3. Durch die Methylierung verstärkt sich die Bindung zwischen DNA und Histonen, hierdurch wird die Transkription der Gene erschwert. Die Modifikation des Chromatins wird durch den RITS-Komplex katalysiert. In *S. pombe* setzt sich der RITS-Komplex aus drei Untereinheiten zusammen (Abb.:8) (Verdel, *et al.*, 2004). Die Ago1-Untereinheit bindet die rasiRNAs, die für die Lokalisation des Proteinkomplexes auf dem Heterochromatin benötigt werden. Chp1-Untereinheit bindet eine Methyltransferase, die das Lysin 9 am Histon 3 methyliert. Die Tas3-Untereinheit wird ebenfalls für die Lokalisation des Proteinkomplexes auf dem Heterochromatin benötigt. Die Degradation der dsRNA erfolgt auch in *S. pombe* wie in den beiden anderen RNAi-Mechanismen, durch Dicer (Meister & Tuschl, 2004; Verdel, *et al.*, 2004) (Abb.:8).

Einleitung

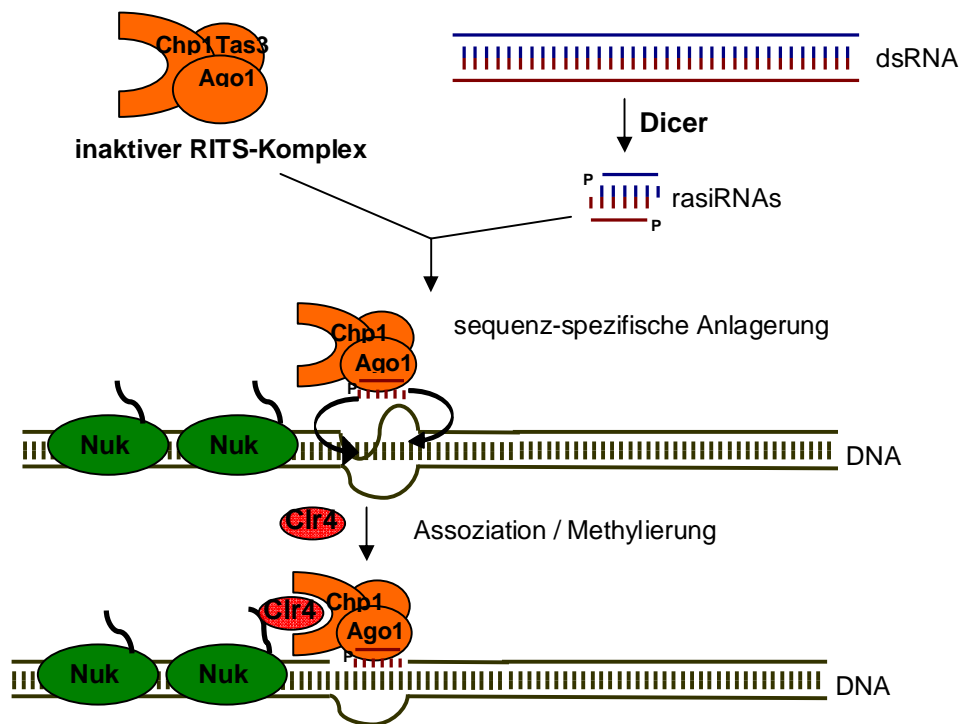


Abb.8: Methylierung des Heterochromatins in *S. pombe*. Der Vorgang wird durch den RITS-Komplex katalysiert. Die sequenz-spezifische Bindung erfolgt durch die rasiRNAs. Durch die Bindung einer Methyltransferase an die Chp1-Untereinheit des RITS-Komplexes wird die H3-K9 Methylierung ermöglicht (Abbildung modifiziert: Verdel, *et al.*, 2004; Meister & Tuschl, 2004).

2.6. Retinsäure-Rezeptoren (RAR)

Pilze sind entwicklungsgeschichtlich eine Schwestergruppe der Metazoa. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Sexualhormons der Zygomyceten zur Retinsäure lässt sich auch ein ähnlicher Wirkungsmechanismus vermuten. Die Retinsäure bindet an den Retinsäure-Rezeptor. Es entsteht ein Rezeptor-Liganden-Komplex. Retinsäure-Rezeptoren gehören zur Familie der Nuklear-Hormon-Rezeptoren, die daneben noch die Steroid-Rezeptoren, die Thyroidhormon-Rezeptoren und die Vitamin D-Rezeptoren umfasst. Alle diese Rezeptoren sind Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der organismischen Entwicklung und Differenzierung spielen (Apriletti, *et al.*, 1998; Chambon, 1996; Mangelsdorf, *et al.*, 1995; Mangelsdorf & Evans, 1995; Sucov & Evans, 1995). Alle Rezeptoren weisen eine zentrale DNA-Bindedomäne und eine C-terminale Hormonbindedomäne auf (Tsai & O'Malley, 1994; Yen, 2001; Zang & Lazar, 2000). Sie regulieren die Transkription, durch Bindung an eine aufwärts des zu regulierenden Gens gelegenen Bindestelle der DNA (Glass, 1996). Die Nuklear-Hormon-Rezeptoren können ihre Zielgene aktivieren oder reprimieren. Ihre Wirkung wird

dabei von der Konzentration und der Struktur des Liganden sowie dem Aufbau des Promotors beeinflusst. Wechselwirkungen mit anderen Signaltransduktionswegen sind ebenfalls möglich (Glass & Rosenfeld, 2000; Privalsky, 2001). Aktivierung und Reprimierung von Genen geschehen durch Bindung von Regulatorproteinen (McKenna & O'Malley, 2002). Bei Fehlen eines Liganden werden Repressoren wie zum Beispiel SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) oder N-CoR (nuclear receptor corepressor) gebunden (Glass & Rosenfeld, 2000; Privalsky, 2001). Der Repressorkomplex enthält neben den Repressoren SMRT oder N-CoR weitere Proteine wie zum Beispiel Histon-Deacetylasen, die zur Repression der Transkription führen (Ayer, D.E., 1999). Solche Histon-Deacetylasen wurden in *Saccharomyces cerevisiae* (Brachmann, *et al.*, 1995), *Schizosaccharomyces pombe* (Freeman-Cook, *et al.*, 1999), *Candida albicans* (Perez-Martin, *et al.*, 1999), *Kluyveromyces lactis* (Astrom, *et al.*, 2000) und *Aspergillus nidulans* nachgewiesen (Graessle, *et al.*, 2001). Die Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung, die Bindung der Corepressoren wird aufgehoben und die Anlagerung der Aktivatoren ermöglicht (Hauksdottir, *et al.*, 2003). Die Genexpression wird außerdem durch Modifikation des Chromatins oder durch direkte Interaktionen mit Proteinen des Transkriptionsprozesses beeinflusst (Berger, 2001; Muscat, 1998).

Retinsäure-Rezeptoren (RARs) werden in drei Gruppen unterschieden: RAR-alpha, RAR-beta und RAR-gamma. Diese Gruppen sind sowohl strukturell als auch auf Sequenzebene unterschiedlich und werden in Entwicklungsprozessen der Organismen zu unterschiedlichen Zeitpunkten produziert (Chambon, 1996; Sucov, 1995). RAR-alpha wirkt am stärksten reprimierend auf die Genexpression seiner Zielgene. Dies ist auf die effektive Bindung des Corepressors SMRT zurückzuführen. Diese Repression erfolgt ausschließlich in Abwesenheit des Liganden (Hauksdottir, *et al.*, 2003).

2.7. Zielsetzung

Parasitella parasitica ist ein biotropher Fusionsparasit, der mit zahlreichen anderen Gattungen der Mucoraceae in parasitische Wechselwirkung treten kann. Die meisten der von *Parasitella* infizierten Gattungen, wie *Absidia*, *Thamnidium* oder *Blakeslea* sind biotechnologisch relevant. Das Interesse der Industrie an Möglichkeiten zur Stammverbesserung ist hoch. Eine Transformation der Stämme auf herkömmlichem Wege ist schwierig. *P. parasitica* dagegen transportiert mit hoher Effizienz genetisches Material in ihre Wirte. Die Nutzung des Pilzes zur Stammverbesserung ist also denkbar. Die Voraussetzung hierfür ist allerdings ein vertieftes Verständnis des Interaktionsprozesses. Da der Parasitismus durch Interaktion ausschließlich komplementärer Kreuzungspartner gekennzeichnet ist, liegt die Vermutung nahe, dass das sexuelle Kommunikationssystem der Zygomyceten in den Prozess der Wirtserkennung involviert ist.

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Regulation der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase, eines Enzyms des sexuellen Hormonsystems, während der sexuellen und parasitischen Interaktion untersucht werden. Dafür soll die Expression des Gens, seine Translation und die Aktivität des Enzyms in den beiden Einzelkulturen des Parasiten und während der sexuellen und der parasitischen Reaktionen untersucht werden.

Aus den Ergebnissen sollen Modelle für die Regulation der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase in Einzel- und der Kreuzkulturen von *P. parasitica* abgeleitet werden und so zu einem besseren Verständnis des sexuellen und des parasitischen Interaktionsprozesses beitragen.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

3.1.1. Organismen

Gegenstand der Untersuchungen waren die komplementären Kreuzungstypen des Mycoparasiten *Parasitella parasitica* und seines Wirts *Absidia glauca*. Alle Stämme sind im Pilzreferenzzentrum der Friedrich Schiller Universität Jena unter den angegebenen Stammnummern (Tab.1) hinterlegt. Die verwendeten Arten gehören zur Ordnung der Mucorales und zur Familie der Mucoraceae.

Tab. 1: Pilzstämme:

Stamm	Stamm-Nr.:	Kreuzungstyp	Herkunft
<i>Absidia glauca</i>	FSU 659	(+)	ATCC ^a 6776a
	FSU 660	(-)	ATCC ^a 6776b
<i>Parasitella parasitica</i>	FSU 387	(+)	CBS ^b 412.66
	FSU 388	(-)	ATCC ^b 11077

^aATCC American Type Culture Collection; ^bCBS Centraalbureau for Schimmelcultures, Baarn

3.1.2. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie (Deisendorf), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg), Bio-Rad (München), Biomol (Hamburg), Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Zaventem), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Fermentas (St. Leon-Rot) und Serva Electrophoresis (Heidelberg) bezogen und waren von angemessener Reinheit. Für die Hybridisierungen wurden Nitrocellulosemembranen des Herstellers Schleicher & Schüll (Dassel) verwendet.

3.1.3. Biochemikalien

Die Restriktionsenzyme, die DNaseI, die reverse Transkriptase, der Ribonuklease-Inhibitor und der 1kb- sowie der 100bp-Marker wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Das NADP⁺ wurde von Biomol (Hamburg) verwendet, das

Maltosebindeprotein, der Protein-Marker und der 1kb DNA Marker von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) bezogen und von Böhlinger (Mannheim) das X-Phosphat sowie das Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) erhalten. 4-Dihydromethyltrispurat wurde von Christine Schimek synthetisiert und zur Verfügung gestellt (Schimek, *et al.*, 2003; Werkman, 1976). Die Hexanukleotid-Zufallsprimer, das Puffersystem sowie die Desoxyribonukleosidtriphosphat-Lösungen für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

3.2. Kultivierung

3.2.1. Medien

P. parasitica wurde auf Malzextrakt-Agar und *A. glauca* auf SUP-Medium kultiviert. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln bei 24°C bzw. 20°C. Für alle Experimente wurden aus Einzelsporen hervorgegangene Isolate verwendet. Der Malzextrakt-Agar enthält 3% (v/v) Malzextrakt und 1.2% Agar und das SUP-Medium 50mM Glukose-Monohydrat, 20 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl), 30 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), 5 mM di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄), 1 mM Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO₄ x 7H₂O), 0.5% (v/v) Hefeextrakt und 1.2% (v/v) Agar (Wöstemeyer, 1985).

3.2.2. Vorkulturen

Die Vorstufen der Trisporsäure sind lichtempfindliche, einige davon auch flüchtige Substanzen. Um eine wechselseitige Beeinflussung der Stämme auszuschließen, wurden diese getrennt in Exsikkatoren gehalten, deren Belüftungsöffnung mit einem Aktivkohlefilter versehen war. Die Vorkulturen wurden im Dunklen aus Sporen auf Petrischalen (Durchmesser 9 cm, mit Nocken) angezogen. Es wurden 200 Sporen pro Platte beimpft. *P. parasitica* wurde auf Malzextrakt-Medium bei 24°C und *A. glauca* auf SUP-Medium bei 20°C für 4 Tage kultiviert.

3.2.3. Induktionskulturen

Die Kulturen wurden in Petrischalen auf Malzextraktmedium kultiviert, das mit einem plattengroßen Filterpapier belegt war, um das Ernten der Mycelien zu erleichtern. Die Mycelstücken der Vorkulturen wurden in verschiedenen Kombinationen auf die so vorbereiteten Platten geimpft. Der Abstand zwischen den Impfstücken betrug 3 cm. Die

Kulturen wurden wie in Abschnitt 2.2. beschrieben 4 Tage lang bei der entsprechenden Temperatur kultiviert.

3.3. Isolation von DNA, RNA und Proteinen

3.3.1. Isolation von genomischer DNA

Ausgangsmaterial für die Gewinnung von genomischer DNA war Mycel aus Flüssigkulturen. Dafür wurden von den Vorkulturen die Sporen mit sterilem deionisiertem Wasser abgeschwemmt. Mit jeweils 1×10^6 Sporen wurden 200 ml flüssiges SUP-Medium beimpft. Die Flüssigkulturen wurden für 4 Tage bei 20°C auf einem Rotationsschüttler bei 130 Upm kultiviert (New Brunswick Sincetific, USA). Das Mycel wurde durch Filtration abgetrennt, mit einem gekühlten Puffer aus 10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8,0) gewaschen und anschließend angetrocknet. Das Mycel wurde in flüssigem Stickstoff zerrieben und anschließend in 0,15 M EDTA (pH 8,0), 50 mM Tris-Cl (pH8,0), 20 mM NaCl, 1 % (w/v) SDS aufgenommen. Dem Puffer wurde vor Gebrauch Proteinase K (Endkonzentration 100µg/ml) zugegeben. Das Mycel wurde im Puffer eine Stunde bei 55°C inkubiert. Um eine Trennung der Nukleinsäuren von den Proteinen zu erreichen, wurden diese denaturiert. Dafür wurde das Lysat auf eine Endkonzentration von 1M NaCl eingestellt und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 10 Minuten bei 5.855 x g zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall® RC-5C Plus, Rotortyp: GSA). Aus dem erhaltenen Überstand wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe von 10% Polyethylenglykol eine Stunde bei 4°C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 20 Minuten, bei 11.952 x g (Zentrifuge: Sorvall® RC-5C Plus, Rotortyp: SS34) und 4°C wurde die Nukleinsäuren in einem Puffer aus 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X 100 aufgenommen. Die Reinigung der genomischen DNA erfolgte durch Zentrifugation in einem CsCl-Gradienten. Dafür wurden die zuvor gelösten Nukleinsäuren mit 1mg/ml CsCl sowie mit 20µg/ml Ethidiumbromid versetzt und anschließend für 24 Stunden, bei 183.165 x g und bei 20°C zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall® Ultra Pro™ 80, Rotortyp:TV865B). Durch das Ethidiumbromid konnte die gereinigte genomische DNA sichtbar gemacht werden. Die genomische DNA wurde in 10 mM Tris-Cl (pH8,0) und 0,1 mM EDTA (pH 8,0) dialysiert und bei 4°C gelagert.

3.3.2. Isolation der RNA

Das Mycel der Induktionskulturen wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und in 4 M Guanidiniumthiocyanat, 2 % (w/v) Sarkosin, 50 mM EDTA (pH 7,0) und 5 % (v/v) Mercaptoethanol aufgenommen (Glišin, *et al.*, 1974; Ullrich, *et al.*, 1977). Anschließend wurde die Suspension für 20 Minuten bei 56 °C inkubiert. Die Zellrückstände wurden durch eine Zentrifugation bei 26.892 x g, für 20 Minuten und bei 4 °C entfernt (Geiser, *et al.*, 1980) (Zentrifuge: Sorvall® RC-5C Plus, Rotortyp: SS34). Ein 1,5 ml Kissen aus 5,7 M CsCl in 50 mM EDTA (pH 7,0) wurde vollständig mit dem Überstand überschichtet. Durch die anschließende Zentrifugation für 20 Stunden, bei 154.012 x g und 15°C, sedimentierte die RNA durch das CsCl-Kissen hindurch (Zentrifuge: Sorvall® Ultra Pro™ 80, Rotortyp:TH-641). Es wurde ein 11 ml Zentrifugationsröhrchen verwendet. Die pelletierte RNA wurde an der Luft getrocknet und anschließend in mit DEPC versetztem deionisiertem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

3.3.3. Isolation von Proteinen

Um den proteolytischen Abbau von Proteinen zu verhindern, wurden alle Lösungen mit 0,5 mM des Serinprotease-Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt. Für die Protein-Isolation wurde das Mycel der Induktionskulturen in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und in 0,1 M Tris-Cl (pH 7,2) aufgenommen. Das Lysat wurde unter ständiger Bewegung 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellwandbestandteile abzentrifugiert, für 15 Minuten, bei 26.892 x g und 4°C (Zentrifuge: Sorvall® RC-5C Plus, Rotortyp: SS34). Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden durch die Zugaben von Ammoniumsulfat bis zu 90% (w/v) der Sättigungskonzentration im Eisbad gefällt. Dabei wurde die Proteinlösung ständig gerührt. Nach Zugabe des letzten Ammoniumsulfats wurde die Lösung noch 15 Minuten im Eisbad gerührt. Anschließend wurde die Proteinlösung bei 26.892 x g, 4°C, 15 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall® RC-5C Plus, Rotortyp: SS34) und die pelletierten Proteine in 20 mM Tris-Cl (pH 7,2) gelöst. Die Proteinlösung wurde über Nacht, bei einmaligem Pufferwechsel, gegen 20 mM Tris-Cl (pH 7,2) dialysiert. Die Proteine wurden bei -20°C gelagert.

3.4. Konzentrationsbestimmungen

3.4.1. Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA und RNA

Die Absorption verdünnter Suspensionen von DNA oder RNA wurde bei 260 und 280 nm bestimmt (Shimadzu, UV-1202). Die Konzentration an DNA oder RNA wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{DNA in } \mu\text{g / ml} = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g / ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{RNA in } \mu\text{g / ml} = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \times 40 \mu\text{g / ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Dafür gilt, dass eine Absorption von 1,0 etwa einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA (Doppelstrang DNA) oder 40 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA (Einzelstrang DNA) bzw. RNA entspricht. Der Messwert bei 280 nm dient zur Abschätzung des Anteils von mitgereinigtem Protein. Bei Werten von 1,8 bis 2,0 wurde von einer zufriedenstellenden Reinheit ausgegangen (alle Angaben nach Sambrook, *et al.*, 1989).

3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bicinchoninsäure-Methode bestimmt (Smith, *et al.*, 1985). Diese Methode beruht auf der Bildung eines Cu^{2+} -Proteinkomplexes. Unter alkalischen Reaktionsbedingungen kann eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} Ionen stattfinden. Die Reduktion wird durch Aminosäuren wie Cystein und Tryptophan katalysiert. Somit besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Reduktion der Cu^{2+} Ionen und der Menge an Proteinen. Bicinchoninsäure bildet mit Cu^{2+} Ionen einen grünen und mit Cu^{1+} Ionen einen blauen Farbkomplex aus. Die Reduktionsreaktion wurde bei 37°C für 30 Minuten durchgeführt, anschließend wurde die Absorption 562 nm gemessen. Bei jeder Messreihe wurden mehrere Konzentrationen an Rinderserumalbumin als Standard mit gemessen. Anhand dieser Messwerte wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt.

3.5. Analytische Methoden

3.5.1. Southern-Hybridisierung

Für die Identifizierung von bestimmten Sequenzabschnitten innerhalb der genomischen DNA wurde die von Southern (1975) beschriebene analytische Methode verwendet. Dazu wurde 1 µg genomischer DNA mit 3 U/µl der Restriktionsenzyme *HindIII*, *PstI*, *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. Für die Restriktionen mit den Enzymen *HindIII*, *EcoRI* und *BamHI* wurde ein Puffer aus 50 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DITHIOTHREITOL und für das Enzym *PstI* ein Puffer aus 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DITHIOTHREITOL verwendet. Die geschnittene genomische DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der 10fach konzentrierte Laufpuffer (10xTAE) bestand aus 0,4 M Tris, 0,2 M Natriumacetat und 10 mM EDTA (pH 7,8). Das Gel enthielt 0,8% (w/v) Agarose in 1xTAE. Die Elektrophorese wurde im gleichen Puffer bei 2,3 V/cm für 2,5 Stunden durchgeführt. Zur Denaturierung der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel für 20 Minuten in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 2x20 Minuten in einer Lösung aus 0,5 M Tris-Cl (pH 7,0) und 3 M NaCl neutralisiert. Danach wurde die DNA durch Kapillartransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit dieser irreversibel verbunden (Burmester & Czempinski, 1994) (Abschnitt 5.3.).

3.5.2. Northern-Hybridisierung

Die Northern-Hybridisierung wurde nach Alwine, *et al.*, (1977, 1979) durchgeführt. Dazu wurde die gesamt-RNA (Abschnitt 3.2.) denaturiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Die im Gel aufgetrennte RNA wurde denaturiert, um die Bindung an die Nitrocellulose stabilisiert und eine effizientere Hybridisierung zu gewährleisten. Dazu wurden 7 µg gesamt-RNA in einer Lösung aus 54% (v/v) Dimethylsulfoxid, 1M (v/v) Glyoxal und 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) für 60 Minuten bei 50°C inkubiert (McMaster & Carmichael, 1977). Das Glyoxal wurde vor Gebrauch mit dem Ionenaustauscher AG 501-X8 bis zum Erreichen eines pH-Wert >5 entionisiert. Die Proben wurden mit dem Glyoxal / Dimethylsulfoxid Gelladepuffer versetzt. Dieser enthielt 50 % (v/v) Glycerol, 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0), 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 0,25 % (w/v) Xylene Cyanol FF. Die denaturierte RNA wurde für 3,5 Stunden in einem 1%igem (w/v) Agarosegel bei 2,3V/cm im 10 mM Natriumphosphat-Puffer getrennt.

Durch Kapillartransfer wurden die RNA auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit dieser irreversibel verbunden (Vetter, *et al.*, 1994) (Abschnitt 5.3.).

3.5.3. Transfer der denaturierten DNA und RNA auf Nitrocellulosefilter

Die denaturierte DNA und RNA wurde mittels Kapillartransfer auf den Nitrocellulosefilter übertragen. Zur Steigerung der Übertragung wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für 20 Minuten bei 70°C in deionisiertem Wasser inkubiert. Der Transfer in 3.0 M Natriumchlorid und 0.3 m Natriumcitrat dauerte 12 Stunden (Thomas, 1980). Danach wurde der Nitrocellulosefilter mit deionisiertem Wasser gespült und anschließend an der Luft getrocknet. Um eine irreversible Bindung der Nukleinsäuren an den Filter zu erreichen, wurde dieser 3 Stunden bei 80 °C im Vakuumofen inkubiert. Die Spur des DNA-Markers wurde vor dem Transfer der RNA auf den Nitrocellulosefilter abgeschnitten, denaturiert und getrennt auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

3.5.4. Hybridisierung von DNA und RNA mit radioaktiv markierten komplementären PCR-Fragmenten

3.5.4.1. Lösungen:

Vorhybridisierungspuffer:	50 %	(v/v) Formamid (entionisiert mit AG 501-X8 [5 g/l])
	5 x	SSC
	500 µg/ml	denaturierte DNA (Heringssperma)
	1 x	Denhardt-Lösung
	0,1 %	(w/v) SDS
	50 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)
Hybridisierungspuffer:	50 %	(v/v) Formamid (entionisiert)
	5 x	SSC
	100 µg/ml	denaturierte DNA (Heringssperma)
	1 x	Denhardt-Lösung
	20 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)
	0,1 %	(w/v) SDS

Für den Vorhybridisierungs- und Hybridisierungspuffer benötigte Stammlösungen:

50 x Denhardt-Lösung: 1 % (w/v) Rinderserumalbumin
1 % (w/v) Ficoll
1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon

denaturierte DNA : Die Heringssperma-DNA wurde in deionisiertem Wasser aufgenommen (10 mg/ml) und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile 5 Minuten bei 24°C und 3345 x g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R, Rotortyp: BS4402/A). Der DNA-haltige Überstand wurde anschließend für 15 Minuten bei 100°C denaturiert und in Eiswasser wieder abgekühlt.

3.5.4.2. Vorhybridisierung

Um eine Absättigung des Hintergrunds der Nitrocellulosemembranen denaturierter RNA und DNA zu erreichen, wurden diese 6 Stunden bei 42°C und 50% (v/v) Formamid vorhybridisiert. Zuvor wurden die Nitrocellulosefilter denaturierter RNA 2 Minuten bei 65°C in 20 mM Tris · Cl (pH 8,0) inkubiert, um das Glyoxal zu entfernen.

3.5.4.3. Hybridisierung

Für die eigentliche Hybridisierung wurde der Vorhybridisierungspuffer gegen ein halbes Volumen des Hybridisierungspuffers ausgetauscht. Die zuvor radioaktiv markierte DNA-Probe wurde 5 Minuten bei 96°C denaturiert und sofort in den Hybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C und 50% (v/v) Formamid.

3.5.4.4. Herstellen der radioaktiv markierten PCR-Fragmente

3.5.4.4.1. Radioaktive Markierung beider Stränge eines DNA-Fragments

Für diese Markierung wurden Hexanukleotid-Zufallsprimer verwendet, die sich unspezifisch an verschiedene Positionen der zuvor denaturierten DNA-Proben lagern können und so als Ausgangspunkt für die DNA-Synthese dienen (Goulian, 1969). Eines der für die Synthese benötigten Desoxyribonukleosidtriphosphate ist an der α -Position

mit ^{32}P -Phosphat markiert. Ausgehend von den Zufallsprimern wird neue DNA vom Klenow-Enzym synthetisiert (Feinberg & Vogelstein, 1983, 1984). Für die radioaktive Doppelstrangmarkierung wurden 200 ng DNA eingesetzt. Die DNA wurde zunächst in 250mM Tris-Cl (pH 8.0), 25 mM MgCl_2 0,375 mM Hexanukleotid-Primer und deionisierten Wasser für 3 Minuten bei 96°C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz in Eiswasser gestellt, damit sich die Zufallsprimer anlagern konnten. Danach wurden je 0,33 mM der Desoxyribonukleotidtriphosphate dGTP, dATP und dTTP sowie $0.4 \mu\text{M}$ $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (111 TBq/ mmol) hinzugegeben und der Ansatz mit (1U/ μl) Klenow-Fragment versetzt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe des Glyoxal-Gel-Ladepuffers wurde die Doppelstrangmarkierung beendet.

3.5.4.4.2. Radioaktive Markierung eines Stranges eines DNA-Fragments

Die radioaktive Einzelstrangmarkierung der DNA-Fragmente wurde mittels PCR durchgeführt. Es wurde nur ein spezifischer, entgegengesetzt orientierter Primer für die Markierung verwendet. Die Synthese wurde durch die Taq-Polymerase katalysiert. Auch bei diesem Vorgang war eines der für die Synthese benötigten Desoxyribonukleosidtriphosphate an der α -Position mit ^{32}P -Phosphat markiert. Für die radioaktive Einzelstrangmarkierung wurden je 200 ng DNA verwendet. Der PCR-Mix enthielt: 50 mM Tris HCl pH 8.8, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01 % Tween 20, $26.4 \mu\text{M}$ dATP, dGTP, dTTP, $0.4 \mu\text{M}$ des $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten dCTPs (111 TBq/ mmol), 1.7 mM MgCl_2 , $0.4 \mu\text{M}$ Primer und 1 U/ μl Taq-Polymerase. Die PCR-Bedingungen waren: 5 Minuten bei 94°C , 0.3 Minuten bei 55°C und 1 Minute bei 72°C für den ersten Zyklus, dann 0.3 Minuten bei 94°C , 0.3 Minuten bei 55°C und 1 Minute bei 72°C für die Zyklen 2-30. Die markierten Einzelstränge wurden für die Untersuchung der sich überlappenden Gene verwendet.

3.5.4.5. Reinigung der radioaktiv markierten PCR-Fragmente

Die radioaktiv markierten DNA-Proben wurden durch Chromatographie in 10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0.1 % (w/v) SDS an Sephadex G 50 gereinigt. Dadurch wurden freie Monomere von den radioaktiv markierten DNA-Fragmenten entfernt. Das Säulenvolumen betrug 1,6 ml. Es wurde mit dem doppelten Säulenvolumen gespült und

0,4 ml Fraktionen gesammelt. Die erste Fraktion wurde verworfen. Die zweite Fraktion enthielt die markierte DNA.

3.5.4.6. Waschen der Nitrocellulosefilter nach der Hybridisierung

Am Ende der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Filter kurz mit 2 x SSC / 0,1 % SDS gespült. Diese Lösung wurde sofort verworfen. Danach wurden die Filter zweimal in 2 x SSC / 0,1 % (w/v) SDS für 20 Minuten bei 42 °C gewaschen. Anschließend wurde erneut zweimal für 20 Minuten in 2 x SSC / 0,1 % (w/v) SDS und bei 55°C gespült. Abschließend wurden die noch Filter zweimal für 20 Minuten bei 55 °C in 0,2 x SSC / 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Die Filter wurden bei 50°C 45 Minuten getrocknet.

3.5.4.7. Autoradiographie

Die radioaktiv markierten DNA/DNA- und RNA/DNA-Hybridmoleküle wurden mittels eines Röntgenfilms (Kodak, X-ray-Film), der auf die Filter aufgelegt wurde, detektiert. Die Autoradiographie fand bei -70 °C statt und dauerte je nach Stärke der radioaktiven Signale zwischen 4 – 30 Tagen.

3.5.5. RT-PCR

3.5.5.1. Synthese von cDNA

Die cDNA wurde von der reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus synthetisiert, die sowohl eine RNA- als auch eine DNA abhängige DNA-Polymerase ist. Das Enzym besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette und hat ein Molekulargewicht von 84 kDa (Gerard, 1983; Roth, *et al.*, 1985). Neben der Polymeraseaktivität verfügt das Enzym auch über eine schwache RNase Aktivität. Aus diesem Grund wurde bei jeder cDNA-Synthese-Reaktion ein Ribonuklease-Inhibitor zugegeben. 0,7 µg gesamt-RNA und 0,32 µM eines spezifische Rückwärtsprimers oder eines Oligo-dT-Primers wurden 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0,31 mM dNTP, 31 mM Tris-Cl (pH 8,3), 47 mM KCl, 1,9 mM MgCl₂, 6,3 mM Dithiothreitol, 78 µg/ml Rinderserumalbumin und 4U/µl Ribonuklease Inhibitor wurden die Ansätze 5 Minuten bei 37 °C inkubiert (Seah & Rook, 1999). Danach wurden 50 U/µl reverse Transkriptase zugegeben. Der cDNA-Synthese-Ansatz wurde

60 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch 10-minütige Inkubation bei 70 °C beendet.

3.5.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils $\frac{1}{3}$ des cDNA-Ansatzes verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem 50 mM Tris-Cl (pH 8,8), 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% (v/v) Tween 20, 0,2 mM dNTPs, 1,7 mM MgCl_2 , 0,4 μM der jeweiligen Primer und 1U/ μl Taq-Polymerase (modifiziert nach: Pernas-Alonso, *et al.*, 1999). In den Kontrollen wurde 20 ng genomische DNA der *P. parasitica* Stämme FSU387 und FSU388 amplifiziert. Für alle PCR-Reaktionen wurde ein PCR-Profil von 5 Minuten 94°C, 0.3 Minuten 55°C, 1 Minute 72°C für den ersten Zyklus und 0.3 Minuten 94°C, 0.3 Minuten 55°C, 1 Minuten 72°C für die Zyklen 2-30 eingehalten. Alle in der PCR-Reaktion verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt. Als weitere Kontrolle wurde das Actin-Gen aus *P. parasitica* amplifiziert. Dafür wurden die Primer 5'-CCCTTAAACCCCAAGTCTAATCGCG-3' und 5'-GAGATGCCAAAATGGACCACCG-3' genutzt (Voigt & Wöstemeyer, 2001). Die Actin Amplifikate hatten eine Größe von 840 bp als DNA und von 721 bp als cDNA. Als eine weitere Kontrolle wurde mit allen Primern genomische DNA sowohl von *A. glauca* als auch von *P. parasitica* amplifiziert. Dabei wurden ausschließlich *P. parasitica* DNA-Fragmente erhalten.

3.5.5.3. Elektrophorese der RT-PCR-Produkte

RT-PCR-Produkte im Größenbereich von 500-2000 bp wurden in Agarosegelen getrennt (Abschnitt 5.1.). Kleinere RT-PCR-Produkte konnten nur in Acrylamidgelen getrennt werden. Diese enthielten 5% Polyacrylamid in 1xTBE und wurde durch die Zugabe vom 0,03% (w/v) 10% Ammoniumpersulfat und 0,1% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyldiamin polymerisiert. Die Elektrophorese wurde bei 3V/cm für 7 Stunden durchgeführt. Die 30%ige Polyacrylamid-Stammlösung enthielt 30% (w/v) Acrylamid und 0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid und, der 10fach konzentrierte Laufpuffer 0.89 M Tris-Borat und 20 mM EDTA (pH 8.3). Die Gele wurden 30 Minuten in einer 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromidlösung gefärbt und mittels UV-Transillumination detektiert. Die Bildverarbeitungssoftware „BioPrint“ Version 6 wurde für die Dokumentation verwendet.

Material und Methoden

Tab.: 2 Primer für die RT-PCR Analyse

Nr.	Primer-Sequenz	Orientierung in der DNA	Startposition	
			FSU 388 ^a	FSU 387 ^b
1	5' GGATTAGTCAAGAGGGAAGAGC 3'	vorwärts	2199	2186
2	5' CCAAAGCCAAAATCATGGG 3'	rückwärts	3069	3056
3	5' GTGAATGCCTTGGAAGCG 3'	vorwärts	3201	3188
4	5' GCCTATGCAAATACGACG 3'	rückwärts	3536	3523
5	5' GTTACCTAGGTTGGCAGTAG 3'	rückwärts	4138	4125
6	5' CATTCTTCAAACAAAACCAGCACC 3'	rückwärts	4767	4721
7	5' CAGTTATATGGAGGAATACCTTCCC 3'	rückwärts	4475	4429
8	5' GTGGCATACTGTCAAAAATATCAG 3'	rückwärts	4885	4839
9	5' AGCCAGAGTCTAGAATTGACCTCAC 3'	vorwärts	4709	4663
10	5' CTCAATCTTCAATTTTATG 3'	vorwärts	1266	1275
11	5' CCTCATCTGGATCAGCGC 3'	rückwärts	1506	1515
12	5' TGAATAACAAGAATATGCGGG 3'	rückwärts	1969	1956
13	5' CCAAGCATCAAGAATTAATGAC 3'	vorwärts	1728	1738
14	5' GCTTACTCTTCGTTTCGGCCC 3'	vorwärts	2765	2752
15	5' CAAGTGCTTTTATTTTATCC 3'	vorwärts	3090	3077
16	5' CCAGTGTGTTTATTGTAG 3'	rückwärts	3154	3141
17	5' CCCGCATATTCTTGTTTATTC 3'	vorwärts	1948	1935
18	5' CAACCATTTTAACAATGC 3'	rückwärts	2004	1991
19	5' CAGGCGCTCTTCAGGTGTAGG	vorwärts	3759	3746
20	5' GGATGTTGCTCTGAACAAAGATTTCG 3'	vorwärts	8844	8833
21	5' TTTTCGCCCGCAGTGGCAGACG 3'	rückwärts	9237	9221
22	5' GCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	rückwärts		

^aEMBL Accession Nummer: AJ509873; ^bEMBL Accession Nummer: AJ604529

3.5.5.4. Restriktion der RT-PCR Produkte

Um den Anteil der mRNA des jeweiligen Kreuzungspartners während der sexuellen Interaktion bestimmen zu können, wurde die erhaltene cDNAs mit den Restriktionsenzymen *Sau3A* und *NdeI* geschnitten. *Sau3A* scheidet ausschließlich die cDNA des *ORF1* Gens des (+)-Kreuzungstyps und *NdeI* die cDNA des *TDH* Gens des (-)-Kreuzungstyps. Um die cDNA in das für die entsprechenden Restriktionsenzyme benötigte Puffersystem zu überführen, musste sie zunächst gefällt werden. Dazu wurde der RT-PCR Ansatz bis zu einer Endkonzentration von 0,2M mit NaCl versetzt. Die cDNA wurde durch Zugabe von 2 Volumen 100% Ethanol 2h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 14.825 x g (Heraeus Biofuge 13) für 5 Minuten wurde die pelletierte cDNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und dann in Wasser aufgenommen. Die cDNAs wurden mit 3U/µl des jeweiligen Enzyms (*Sau3A*, *NdeI*) für 3 Stunden bei 37°C geschnitten. Für *Sau3A* enthielt der Restriktionspuffer 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 10 mM Mg-Acetat und 1mM Dithiothreitol und für *NdeI* 20 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 10 mM Mg-Acetat und 1 mM Dithiothreitol.

3.5.6. Western-Analyse

Für den Nachweis der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase wurde das von Burnette (1981) beschriebene Verfahren zur immunologischen Detektion verwendet. Hierfür werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der anschließende Nachweis findet in zwei immunologischen Reaktionen statt. In der ersten immunologischen Reaktion bindet ein spezifischer Antikörper an antigene Epitope des Zielproteins. In einer zweiten immunologischen Reaktion bindet ein sekundärer Antikörper, ein Anti-Immunglobulin, an den primären Antikörper. An diesen ist eine alkalische Phosphatase kovalent gebunden. Nach Zugabe des Substrats (X-Phosphat, Firma: Boehringer) spaltet das Enzym die Phosphatgruppe, in einer Nebenreaktion wird das ebenfalls zugesetzte Nitroblau-Tetrazoliumchlorid oxidiert und präzipitiert anschließend als blauer Niederschlag.

3.5.6.1. SDS-Gelelektrophorese

400 µg Proteine wurden in 125 mM Tris·Cl (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS und 0,1 mg Bromphenol-Blau aufgenommen und 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Das im Probenpuffer enthaltene anionische Detergenz SDS (Laemmli, 1970) lagert sich um die denaturierten Proteine und ermöglicht so die Proteinauftrennung nach der Größe. Das Sammelgel enthielt 8 % (w/v) Polyacrylamid, 125 mM Tris·Cl (pH 6,8), 7 % (w/v) Saccharose und 0,1 % (w/v) SDS. Das Trenngel bestand aus 15 % (w/v) Polyacrylamid, 375 mM Tris·Cl (pH 8,8), 7 % (w/v) Saccharose und 0,1 % (w/v) SDS. Die 30%ige Polyacrylamid-Stammlösung enthielt 30% (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid. Sowohl Sammel- als auch Trenngel wurden mit 0,03% (w/v) 10% Ammoniumpersulfat und 0,1% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin polymerisiert. Die Proben bei 13mA im Sammel-Gel und bei 20 mA im Trenn-Gel in 400 mM Glycin, 50 mM Tris und 0,1% (w/v) SDS (pH 8,6) über Nacht separiert.

3.5.6.2. Färben des SDS-Gels

Vor der Färbung in 25% (v/v) 2-Propanol, 10% (v/v) Essigsäure und 0,1% (w/v) Coomassie Blau R wurde das Gel 30 Minuten in 20% (w/v) Trichloressigsäure fixiert. Die Gele wurden anschließend über Nacht gefärbt, kurz mit Wasser gespült und wieder entfärbt. Der Entfärber enthielt 30% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure. Die Entfärbung war beendet, wenn der Gel-Hintergrund keine Färbung mehr zeigte.

3.5.6.3. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen

Der elektrophoretische Transfer (BioRAD, Trans-Blot-Cell) von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll) wurde wie bei Burnette (1981) beschrieben durchgeführt. Davor wurde das SDS-Gel 30 Minuten in 200 mM Glycin, 25 mM Tris und 20% (v/v) Methanol (pH 8,6) equilibriert. Der Proteintransfer fand bei 60V für 5 Stunden statt.

3.5.6.4. Ponceau-Färbung von Proteinen / Kontrolle des Elektrotransfers

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Transfer 3 x 5 Minuten in deionisiertem Wasser gespült und anschließend für eine Minute in 0,5% (w/v) Ponceau S und 1% (v/v) Essigsäure gefärbt. Danach wurde die Membran in Wasser solange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Mit dem Bleistift wurden die Banden des Proteinmarkers markiert. Anschließend wurde die Membran wieder vollständig in 200 µM NaOH und 20 % (v/v) Acetonitril entfärbt und danach 10 Minuten in deionisiertem Wasser inkubiert.

3.5.6.5. Antikörper-Reaktionen

Für die Antikörperreaktion wurde die Nitrocellulosemembran 10 Minuten in 0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,002 M KH₂PO₄ und 0,2 % (v/v) Tween 20 equilibriert und anschließend für 1 Stunde in 0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,002 M KH₂PO₄, 0,2% (v/v) Tween 20 und 5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Durch das Magermilchpulver werden unspezifische Bindungen des Antikörpers mit der Nitrocellulosemembran minimiert und damit die Sensitivität der Antigen-Antikörper-Reaktion erhöht (Johnson, *et al.*, 1984).

Der primäre Antikörper wurde im Kaninchen (H391) von der Firma Genaxxon Bioscience (Biebrach) hergestellt. Für Antikörperherstellung wurde ein Fusionsprotein aus 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase und Maltosebindeprotein in *Escherichia coli* überexprimiert. Das Maltosebindeprotein wurde für die chromatographische Reinigung verwendet. Der Maltoseanteil wurde nach der Reinigung nicht abgespalten, so dass der Antikörper auch gegen den Maltoseanteil des Fusionsproteins gebildet wurde.

Um die Bindungsspezifität des polyklonalen primären Antikörpers zu erhöhen, wurde dieser vor dem Verwenden mit 50µg/ml reinem Maltosebindeprotein abgesättigt. Anschließend wurde der Filter 2 Stunden in 0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,002 M KH₂PO₄, 0,2% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) Magermilchpulver sowie 1:6000 verdünntem Anti-TDH-IgG inkubiert. Nach zweimaligen Spülen für 5 Minuten in 0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,002 M KH₂PO₄ und 0,2 % (v/v) Tween 20 wurde die Nitrocellulosemembran für eine Stunde in die sekundäre Antikörperlösung gegeben. Diese enthielt 0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,002 M KH₂PO₄, 0,2% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) Magermilchpulver sowie 1:3000 verdünntem Anti-Rabbit-

Material und Methoden

IgG aus Ziege. Anschließend wurde der Filter 4x10 Minuten in 0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,002 M KH₂PO₄ und 0,2 % (v/v) Tween 20 gespült.

Für die Detektion des Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexes wurde der Filter 10 Minuten in 100 mM Tris·Cl (pH 9,5), 100 mM NaCl und 50 mM MgCl₂ equilibriert. Anschließend wurde die Membran für eine Minute in 100 mM Tris·Cl (pH 9,5), 100 mM NaCl und 50 mM MgCl₂ sowie 1% (v/v) NBT (Boehringer) und 1% (v/v) X-Phosphat (Boehringer) gegeben. Durch die Aktivität der am sekundären Antikörper gebundenen alkalischen Phosphatase wurde das Substrates (X-Phosphat) dephosphoryliert, in einer Nebenreaktion wird das ebenfalls zugesetzte Nitroblau-Tetrazoliumchlorid oxidiert und präzipitiert anschließend als blauer Niederschlag. Durch 10 minütige Inkubation des Filters in 10 mM Tris·Cl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0) wurde die Detektionsreaktion beendet.

4. Ergebnisse

4.1. Sequenzanalyse des *TDH*-Gens und der angrenzenden Regionen

Aus einer partiellen Genbank wurden mehrere Klone isoliert werden, die das *TDH*-Gen von *Parasitella parasitica*(-) FSU 388 auf einem 10 kb EcoRI-PstI Fragment enthielten. Dieses Fragment wurde subkloniert. Ein 6175 bp Fragment wurde vollständig sequenziert (EMBL. Acc.No.: AJ509873). Das daran angrenzende Fragment von 3186 bp wurde inzwischen ebenfalls vollständig sequenziert (Abb.: 9b.). Das *TDH*-Gen mit seinen angrenzenden Bereichen aus *P. parasitica*(+) FSU 387 wurde durch Amplifikation mit Gen-spezifischen Primern aus *P. parasitica*(-) FSU 388 erhalten, kloniert und sequenziert (Abb.: 9a) (EMBL. AccNo.: AJ604529).

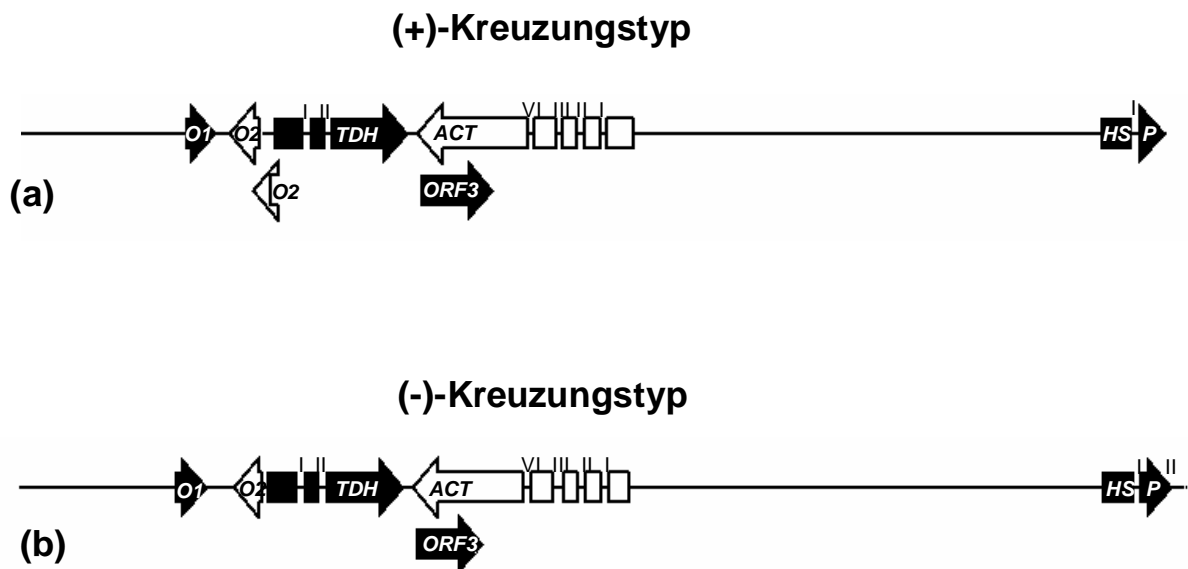


Abb.9: Genomische Lokalisation der Gene *TDH*, *ACT* und *HSP* sowie der drei nicht identifizierten *ORFs* in (a) *Parasitella parasitica* (FSU 387) (EMBL. Acc.No.: AJ604529) und (b) *Parasitella parasitica* (FSU 388) (EMBL. Acc.No.: AJ509873). Die Balken kennzeichnen die kodierenden Bereiche der Gene. Die kodierenden Bereiche von *ORF1*(*O1*) *TDH*, *ORF3* sowie *HSP* sind schwarz und die von *ORF2*(*O2*), und *ACT* sind weiß dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der Gene an. Die Intron Positionen sind durch römische Zahlen gekennzeichnet.

Die Nukleinsäurepositionen der *TDH*-Gencluster beider Kreuzungstypen stimmen in 93% überein.

Die *TDH*-Nukleinsäuresequenz stimmt in 98% und die abgeleitete *TDH*-Aminosäuresequenz in 98,8% in beiden Kreuzungstypen überein. Das *TDH*-Gen von *Parasitella parasitica*(-) zeigt eine 80%ige Übereinstimmung der Aminosäurepositionen

und eine 73%ige Übereinstimmung der Nukleinsäurepositionen mit dem *TDH*-Gen aus *Mucor mucedo*. Der kodierende Bereich der *TDH*-Gene beider Kreuzungstypen wird von zwei Introns unterbrochen. Intron (I) hat eine Größe von 68 und Intron (II) von 57 bp. *M. mucedo* besitzt ein Intron von 74 bp Länge, das sich an der gleichen Position befindet wie Intron (II) von *P. parasitica*. Die Aminosäuresequenz der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase weist eine konservierte Domäne (pfam00248) auf, die sich über fast die gesamte Länge der Sequenz erstreckt (10-281) (Marchler-Bauer *et al.*, 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Diese Domäne ist charakteristisch für Mitglieder der Aldo/Keto-Reduktase-Familie (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>; Schultz, *et al.*, 1998; Letunic, *et al.*, 2004). Hinweise auf eine Lokalisation in Membran oder Zellorganellen gibt es nicht (Nakai & Horton, 1999; <http://psort.nibb.ac.jp/>).

In beiden Kreuzungstypen grenzt ein Gen, das für eine mögliche Acyl-CoA-Thioesterhydrolase (*ACT*) kodiert, in entgegengesetzter Orientierung an das 3'-Ende des *TDH*-Gens (Abb.: 9). Die Stopp-Signale der beiden Gene sind durch eine intergenische Region von nur 70 bp getrennt. Durch Sequenzvergleiche konnte eine 87%ige Übereinstimmung der Aminosäurepositionen und eine 75%ige Übereinstimmung der Nukleinsäurepositionen mit einem möglichen *ACT*-Gen von *M. mucedo* festgestellt werden. Homologien bestehen weiterhin zu einem *ACT*-Gen des Menschen (Lai *et al.*, 2000). Der kodierende Bereich des *ACT*-Gens wird von vier Introns unterbrochen. Die *ACT*-Proteinsequenzen beider Kreuzungstypen stimmen zu 99,4% der Aminosäurepositionen überein. Die Aminosäuresequenz weist zwei hochkonservierte Domänen (COG1607) in den Positionen 321-468 und 119-275 auf (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; Marchler-Bauer, *et al.*, 2003). Diese COG 1607 Domänen sind charakteristisch für Acyl-CoA-Hydrolasen (Tatusov, *et al.*, 1997; Tatusov, *et al.*, 2001; Tatusov, *et al.*, 2003). Die Acyl-CoA-Thioesterhydrolase-Sequenz aus *P. parasitica* enthält ein N-terminales Signalpeptid, das mit einer 70%igen Wahrscheinlichkeit zum Import des Proteins in Mitochondrien genutzt wird (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson, *et al.*, 2000; Nielsen, *et al.*, 1997;). Die putativen Polyadenylierungsstellen beider Gene überlagern sich innerhalb der kurzen intergenischen Region. Dabei ist die Polyadenylierungsstelle des *TDH*-Gens 12 bp vom Stopp-Signal des *ACT*-Gens und die Polyadenylierungsstelle des *ACT*-Gens ist 9 bp vom Stopp-Signal des *TDH*-Gens entfernt.

Ergebnisse

In der Umgebung der beiden Gene liegen weitere drei *ORFs* unbekannter Funktion (Abb.: 9). *ORF1* kodiert in beiden Kreuzungstypen für ein mögliches Protein von 83 Aminosäuren. Die putativen *ORF1*-Aminosäuresequenz der beiden Kreuzungstypen stimmen zu 94% überein. *ORF2* kodiert im (-)-Kreuzungstyps für ein mögliches Protein von 82 Aminosäuren. Im (+)-Kreuzungstyp ergeben sich für das *ORF2*-Gen aufgrund einer 21 bp sowie einer 2 bp Deletion zwei mögliche Leserahmen. Der erste Leserahmen würde einem Produkt von 46 Aminosäuren entsprechen. Der zweite Leseramen würde für ein Protein von 79 Aminosäuren kodieren (Abb.:9; Abb.:21). Analysen der Aminosäuresequenzen sagten bei allen möglichen *ORF1*- und *ORF2*-Polypeptiden transmembranale Domänen voraus, demnach könnten beide Genprodukte Membranbindeproteine sein (Abb.:10) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED /](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED/); Krogh, *et al.*, 2001; Hofmann & Stoffel, 1993).

Das *ORF1*-Peptid enthielt mit einer Wahrscheinlichkeit von 80% in beiden Kreuzungstypen eine transmembranale Domäne im N-terminalen Sequenzbereich (Abb.:10a), die das Produkt mit einer Wahrscheinlichkeit von 82% an der Membranaußenseite lokalisieren würde (<http://psort.nibb.ac.jp/>; Nakai & Horton, 1999). Für das mögliche *ORF2*-Protein des (-)-Kreuzungstyps wurden 2 transmembranale Domänen vorhergesagt (Abb.:10b). Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Domäne des N-terminalen Sequenzbereichs liegt bei 60% und für die Domäne des C-terminalen Sequenzbereichs bei 70%. *ORF2* würde mit einer Wahrscheinlichkeit von 92% in der Plasmamembran lokalisiert sein (<http://psort.nibb.ac.jp/>; Nakai & Horton, 1999). Für die beiden möglichen *ORF2*-Leserahmen des (+)-Kreuzungstyps wurde jeweils nur eine der beiden möglichen transmembranalen Domänen errechnet.

Die kodierende Region von *ORF3* umfasst im (-)-Kreuzungstyp 176 Aminosäuren und im (+)-Kreuzungstyp 201 Aminosäuren. In beiden Kreuzungstypen überlagert die kodierende Region von *ORF3* die 3'-Region des *ACT*-Gens vollständig und in entgegengesetzter Orientierung (Abb.:9). Die *ORF3*-Proteine der beiden Kreuzungstypen stimmen in 97,7% der Aminosäurepositionen überein. Für die Lokalisation des putativen *ORF3*-Proteins des (-)-Kreuzungstyps gibt es keine ausreichende Hinweise, dagegen würde das *ORF3*-Protein des (+)-Kreuzungstyps mit einer Wahrscheinlichkeit von 85% in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums anzutreffen sein (<http://psort.nibb.ac.jp/>; Nakai & Horton, 1999).

Ergebnisse

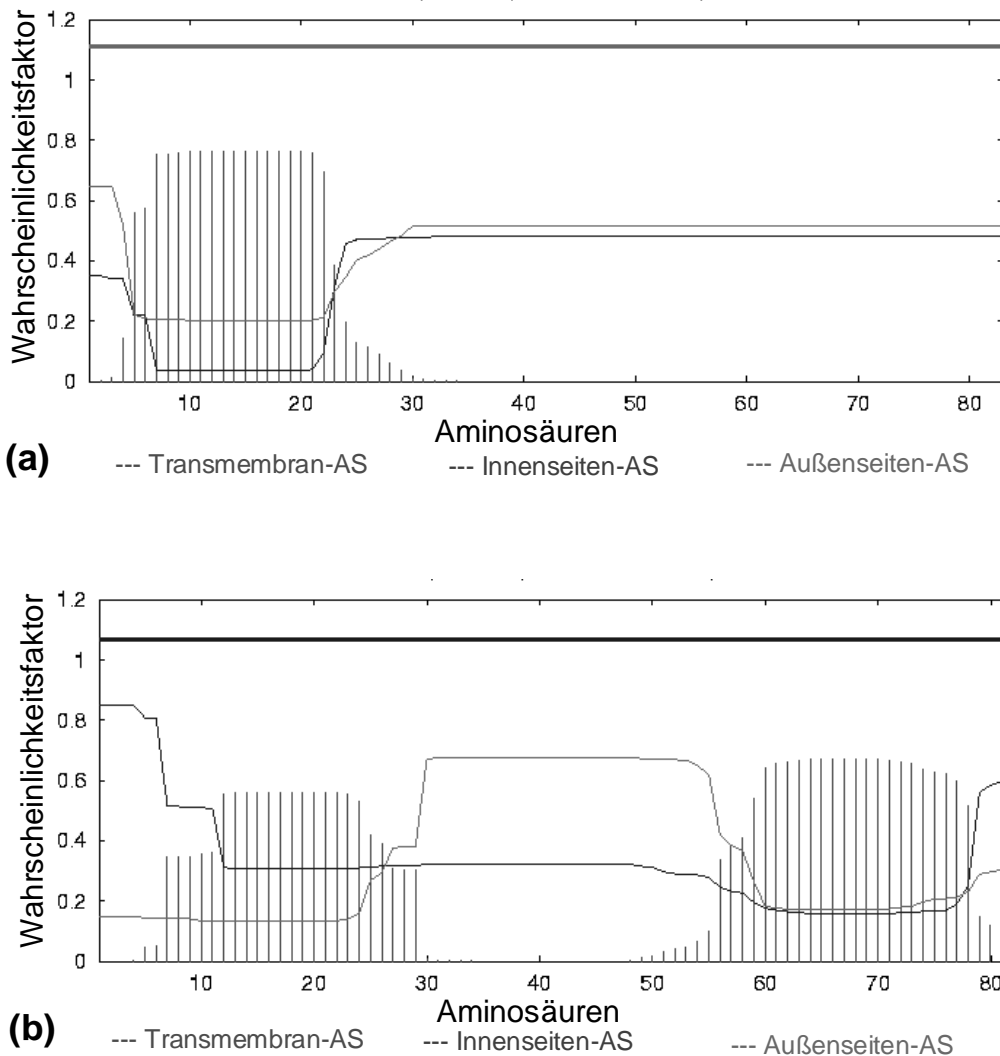


Abb.10: Berechnete Lokalisation transmembranaler Domänen anhand abgeleiteter Proteinsequenzen für (a) ORF1 und (b) ORF2 von *Parasitella parasitica* (FSU388) (nach Krogh, 2001; Hofmann, 1993). (a) ORF1 verfügt mit einer 80%igen Wahrscheinlichkeit über eine transmembranale Domäne im N-terminalen Sequenzbereich. (b) ORF2 weist 2 transmembranale Domänen auf. Mit einer 60%igen Wahrscheinlichkeit tritt eine transmembranale Domäne im N-Terminus des ORF2 Proteins auf. Es besteht eine 70%ige Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer transmembranalen Domäne des C-Terminus.

Der kodierende Bereich des *ACT*-Gens ist in *P. parasitica*(-) FSU 388 durch eine intergenische Zone von 3805 bp von einem möglichen Hitzeschock Protein (*HSP*) getrennt. In *P. parasitica*(+) FSU 387 beträgt der Abstand 3788 bp. Sequenzvergleiche ergaben eine 60%ige Übereinstimmung der Aminosäurepositionen mit einem HSP70 Protein aus *Schizosaccharomyces pombe* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>; Altschul *et al.*, 1997). Der kodierende Bereich des *HSP*-Gens ist nicht vollständig auf dem sequenzierten Fragment enthalten. Der vorhandene kodierende Bereich wird durch zwei

Ergebnisse

Introns unterbrochen. Die Aminosäurepositionen 27–165 entsprechen einer HSP70-spezifischen Domäne (Pfam00012) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi/>; Marchler-Bauer, *et al.*, 2003). Analysen der Aminosäuresequenz sagten im N-terminalen Bereich des HSP-Proteins beider Kreuzungspartnern eine transmembranale Domäne mit einer 100%igen Wahrscheinlichkeit voraus (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; Krogh, *et al.*, 2001, Hofmann & Stoffel, 1993, <http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED/>) (Abb.:11). Das putative HSP-Protein würde mit einer Wahrscheinlichkeit von 82% an der Membranaußenseite anzutreffen sein (<http://psort.nibb.ac.jp/>; Nakai & Horton, 1999).

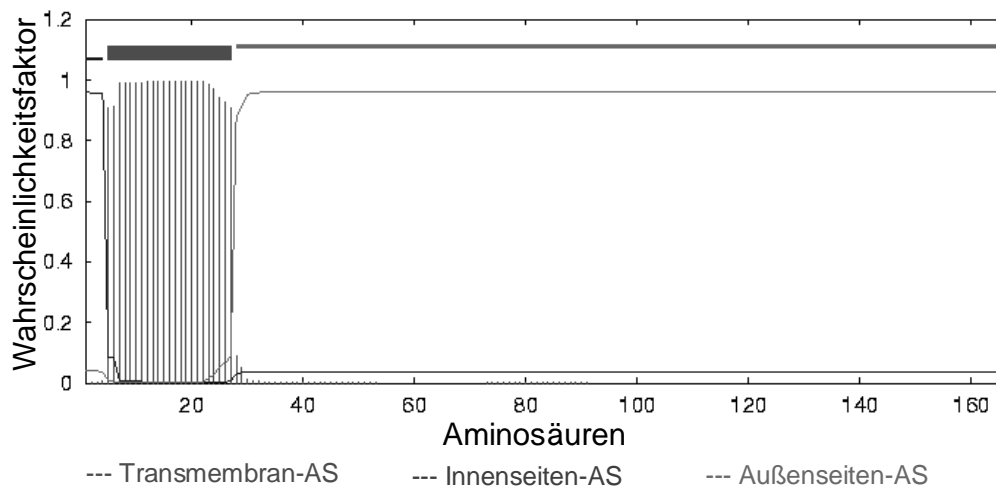


Abb.11: Berechnete Lokalisation der transmembranalen Domäne anhand der abgeleiteten Proteinsequenz des putativen HSP-Proteins von *P. parasitica*(-) (FSU388). Der Nachweis der N-terminalen Domäne erfolgte mit einer 100%igen Wahrscheinlichkeit.

Um die Regulation des 4-Dihromethyltrisporat-Dehydrogenase-Gens in diesem komplexen und kompakten Gen-Cluster verstehen zu können, war auch die Analyse der Regulation der angrenzenden Gene erforderlich.

4.2. Promotoranalyse der Gene des *TDH*-Genclusters

Der mögliche Promotorbereich des Gens der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase wurde in beiden Kreuzungstypen von *P. parasitica* mit einer 90%igen Wahrscheinlichkeit identifiziert (Reese, 2001; http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools7promoter.pl). Der Anfang des *TDH*-Promotors befindet sich 35 Nukleotide aufwärts vom Transkriptionsstart des *TDH*-Gens. In beiden Kreuzungstypen befindet sich ein mögliches TATA-Boxmotiv 61 Nukleotide aufwärts vom Transkriptionsstart des *TDH*-Gens (Abb.:12b, 13b) (<http://www.alibaba2.com>; Grabe, 2002). Das TATA-Boxmotiv beider Kreuzungstypen ist identisch (–ACATATATAA–) und weist im Vergleich mit der Konsensussequenz einen einzigen Basenaustausch auf (–TATAAAA–). Ein mögliches MCM1-Bindemotiv liegt in beiden Kreuzungstypen 213 Nukleotide aufwärts vom *TDH*-Translationsstart (–ATCAAGGACA–). Es zeigt eine 70%ige Homologie zu einer MCM1-Bindestelle (Minichromosome maintenance protein1) aus *Saccharomyces cerevisiae* (–TTTCCTATTTTCGGAAA–) (Kuo & Grayhack, 1994).

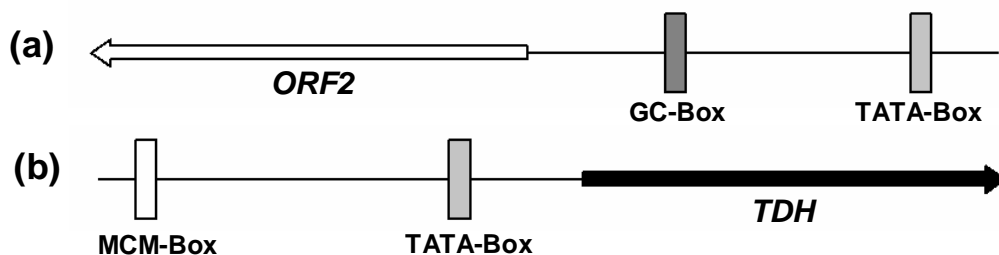


Abb. 12: Promotoraufbau der Gene (a) *ORF2* und (b) *TDH* in *P. parasitica* FSU 388. (a) Der Promotor des *ORF2*-Gens enthält eine GC-Sequenzbereich und eine TATA-Box auf. Der Promotorbereich des *ORF2*-Gens überlappt mit dem kodierenden Bereich des *TDH*-Gens (schwarzer Pfeil, die Pfeilrichtung kennzeichnet die Richtung der Transkription des Gens). (b) Der Promotor des *TDH*-Gens besitzt ebenfalls eine TATA-Box. Ein MCM1-Bindemotiv befindet sich 213 Nukleotide vom *TDH*-Transkriptionsstart entfernt. Der Promotorbereich des *TDH*-Gens überlappt mit dem kodierenden Bereich des *ORF2*-Gens (weißer Pfeil, Pfeilrichtung zeigt die Richtung der Transkription des Gens).

Der mögliche Promotorbereich des *ORF2*-Gens wurde in beiden Kreuzungstypen mit einer 73%igen Wahrscheinlichkeit bestimmt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>; Knudsen, 1999). Die *ORF2*-Promotoren beider Kreuzungstypen enthalten mögliche GC- und TATA-Boxmotive (Abb.: 12a, 13a). Die Anordnung und die Position der Promotorelemente sind in beiden Kreuzungstypen identisch. Die TATA-Box liegt in beiden Kreuzungstypen 204 Nukleotide aufwärts vom Translationsstart des Gens

(<http://www.alibaba2.com>; Grabe, 2002). Das TATA-Boxmotiv beider Kreuzungstypen (-TATTTATGCC-) stimmt in 4 von 10 Positionen mit der Konsensussequenz überein (-TATAAAA-). Die mögliche Bindestelle eines Sp1-Transkriptionsfaktors wurde im (-)-Kreuzungstyp 74 Nukleotide aufwärts vom Translationsstart des *ORF2*-Gens identifiziert (Grabe, 2002; <http://www.alibaba2.com>). Die GC-Box-Sequenzen beider Kreuzungstypen (-CCC**GC**GGAGA-) stimmen ebenfalls in 4 von 10 Nukleotidpositionen mit der Konsensus-Sequenz einer GC-Box eines eukaryotischen Klasse II Promotors (-**GGGCGG**-) überein.

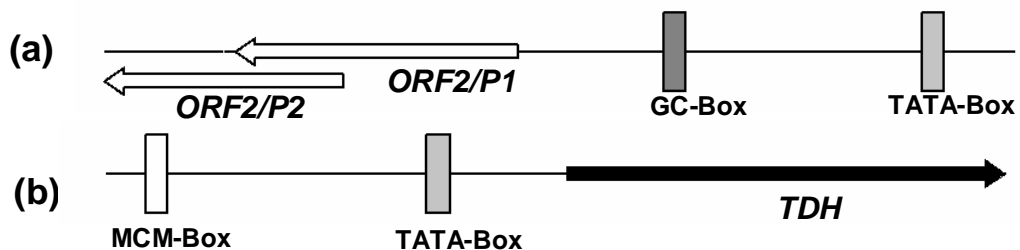


Abb. 13: Promotoraufbau der Gene (a) *ORF2* und (b) *TDH* in *P. parasitica*(+) FSU 387. Der Promotor des *ORF2* Gens des (+)-Kreuzungstyps weist einen GC-Sequenzbereich und eine TATA-Box auf. Der Promotorbereich des *ORF2*-Gens überlappt mit dem kodierenden Bereich des *TDH*-Gens (schwarzer Pfeil, die Pfeilrichtung kennzeichnet die Richtung der Transkription des Gens). (b) Der Promotor des *TDH*-Gens enthält ebenfalls eine TATA-Box. 213 Nukleotide aufwärts vom Transkriptionsstart des Gens befindet sich ein MCM1-Bindemotiv. Der Promotorbereich des *TDH*-Gens sowie das MCM-Bindemotiv überlagern den kodierenden Bereich des *ORF2*-Gens (weißer Pfeil, die Pfeilrichtung gibt die Richtung der Transkription des Gens an).

Im *ORF2*-Gen des (+)-Kreuzungstyps haben zwei Deletionsereignisse stattgefunden, durch die einmal 21 bp und einmal 2 bp der Sequenz fehlen (Abb.:21). Für das Gen ergeben sich daraus zwei mögliche Leserahmen (Abb.: 13a *ORF2/P1* und *ORF2/P2*; Abb.:21). Die möglichen Promotoren des (+)- und des (-)-Kreuzungstyps sind gleich aufgebaut. Von dort bis zu dem modifizierten Sequenzbereich im (+)-Kreuzungstyp müssten die erhaltenen Transkripte folglich identisch sein. Demnach wären auch die 5'-Bereiche der *ORF2*-Transkripte beider Kreuzungstypen ähnlich aufgebaut. Für das *ORF2*-Gen des (-)-Kreuzungstyps ergibt sich aus der Sequenz nur ein möglicher Leserahmen. Aufgrund der Übereinstimmungen im 5'-Bereich der *ORF2*-Transkripte beider Kreuzungstypen lässt sich eine gleichartige Nutzung der Leserahmen im (+)- und im (-)-Kreuzungstyps vermuten. Im (+)-Kreuzungstyp wäre damit *ORF2/P1* der wahrscheinlichere Leserahmen.

Ergebnisse

Der Promotor des *ACT*-Gens enthält in beiden Kreuzungstypen mit einer Wahrscheinlichkeit von 87% ein mögliches TATA-Boxmotiv (Knudsen, 1999; <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) (Abb.:14a, 14b). Im (-)-Kreuzungstyp befindet sich das mögliche TATA-Motiv (-CCTATAATA-) 85 Nukleotide aufwärts vom Transkriptionsstart des *ACT*-Gens und weist nur einen Basenaustausch im Vergleich zur TATA-Box-Konsensussequenz eines eukaryotischen Klasse II Promotors auf (-TATAAAA-). Das TATA-Boxmotiv des (+)-Kreuzungstyps (-CCTATAAAA-) ist 95 Nukleotide vom Translationsstart des *ACT*-Gens entfernt und stimmt mit der TATA-Box-Konsensussequenz eines eukaryotischen Klasse II Promotors vollständig überein (-TATAAAA-). Nur im (-)-Kreuzungstyp befindet sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 67% eine mögliche Bindestelle eines all-trans Retinoidsäurerezeptors (RAR-alpha) (-TCAAAGCA-), 213 Nukleotide aufwärts vom *ACT*-Translationsstart (Abb.:14b) (<http://www.alibaba2.com>; Grabe, 2002, Perlmann, 1996).

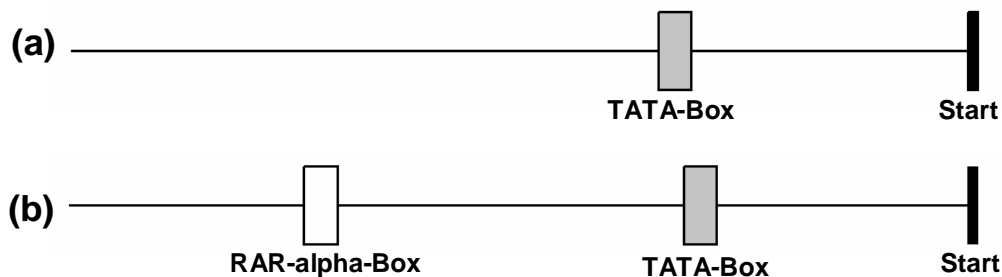


Abb. 14: Aufbau des *ACT* Promotors für (a) *P. parasitica* FSU 387 und (b) für *P. parasitica* FSU 388. (a) Der *ACT*-Promotor von *P. parasitica* FSU 387 weist eine TATA-Boxen auf. (b) Der *ACT*-Promotor des (-)-Kreuzungstyps verfügt neben einer TATA-Box auch über ein Bindemotiv für einen Retinoidsäure-Rezeptor (RAR-alpha).

Aufbau und Position des möglichen *ORF1*-Promotors sind in beiden Kreuzungstypen identisch (Abb.:15a). Der *ORF1*-Promotor enthält eine TATA- und eine CAAT –Box sowie eine mögliche Bindestelle für einen 9-cis Retinoidsäure-Rezeptor (RXR-alpha) (Abb.:15a) (Grabe, 2002; <http://www.alibaba2.com>). Die putative *ORF1*-TATA-Box (-GATATACAAG-) befindet sich in beiden Kreuzungstypen 227 Nukleotide aufwärts vom Translationsstart des Gens und stimmt in 5 von 10 Nukleotidpositionen mit der TATA-Box-Konsensussequenz eines eukaryotischen Klasse II Promotors überein (-TATAAAA-). Das CAAT-Boxmotiv ist 265 Nukleotide aufwärts vom *ORF1*-Translationsstart entfernt und stimmt 5 von 10 Positionen mit der CAAT-Box-Konsensus-Sequenz überein. In beiden Kreuzungstypen konnte 289 Nukleotide

aufwärts vom Translationsstart ein mögliches RXR-alpha Bindemotiv (-CAGGTCAGGT-) lokalisiert werden (Grabe, 2002; <http://www.alibaba2.com>). Dieses Sequenzmotiv stimmt vollständig mit einem Bindemotiv (-AGGTCA-) der Retinoidsäure-Rezeptoren überein (Perlmann, 1996).

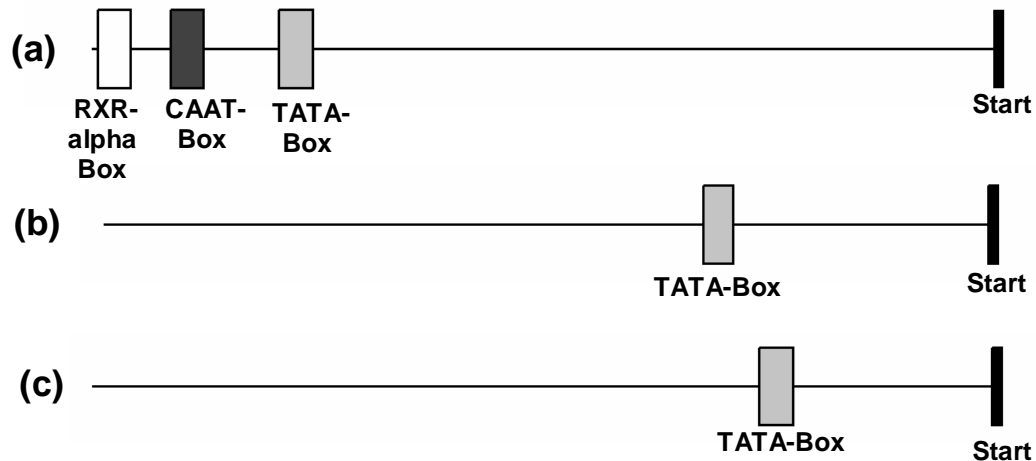


Abb. 15: Aufbau der putativen Promotorbereiche für die Gene (a) *ORF1*, (b) *ORF3* und (c) *HSP* in *P. parasitica* FSU 387 und FSU 388. (a) Der *ORF1*-Promotor verfügt neben einem TATA- und CAAT-Box-Sequenzmotiv auch über eine mögliche Bindestelle für einen 9-cis-Retinoidsäure-Rezeptor (RXR-alpha). (b) Der putative *ORF3*-Promotor enthält ebenso wie der *HSP*-Promotor (c) ein TATA-Box-Sequenzmotiv.

Der mögliche *ORF3*-Promotor enthält nur ein TATA-Boxmotiv (Grabe, 2002; <http://www.alibaba2.com>) (Abb.: 15b). Sie beginnt in beiden Kreuzungstypen 63 Nukleotide aufwärts vom Translationsstart des Gens. Die TATA-Box des (+)-Kreuzungstyps (-GTATAAAGA-) weist 1 Basenaustausch und die des (-)-Kreuzungstyps (-GTATTAAGA-) 2 Basenaustausche zur Konsensussequenz auf (-TATAAAA-).

Die in beiden Kreuzungstypen identifizierte mögliche TATA-Box des *HSP*-Promotorbereiches (-TATAAAAGAT-) (<http://www.alibaba2.com>; Grabe, 2002) stimmt vollständig mit der TATA-Box-Konsensussequenz eines eukaryotischen Klasse II Promotors überein (-TATAAAA-). Das Motiv wurde 70 Nukleotide aufwärts vom Translationsstart des *HSP*-Gens lokalisiert (Abb.:15c).

Ergebnisse

Die Promotoren der Gene des *TDH*-Genclusters besitzen alle eine mögliche Bindestelle für das TATA-Box-Bindeprotein (Tab.:3). Die aus den Promotoranalysen erhaltenen putativen Bindungsstellen können Hinweise auf eine mögliche transkriptionale Regulation einzelner Gene geben.

Tab.: 3 Übersicht über die möglichen Bindemotive in den Promotoren der Gene des *TDH*-Genclusters

Name des Gens	Bindemotive				
	TATA-Motiv	GC-Motiv	CAAT-Motiv	MCM1-Motiv	RAR/RXR-Motiv
<i>TDH</i>	+	-	-	+	-
<i>ACT (+)</i>	+	-	-	-	-
<i>ACT (-)</i>	+	-	-	-	+
<i>ORF1</i>	+	-	+	-	+
<i>ORF2</i>	+	+	-	-	-
<i>ORF3</i>	+	-	-	-	-
<i>HSP</i>	+	-	-	-	-

(+) - kennzeichnet vorhergesagte mögliche Bindemotive (-) - kein Nachweis
ACT(+) - *ACT*-Gen des (+)-Kreuzungstyps **ACT(-)** - *ACT*-Gen des (-)-Kreuzungstyps

Interessant ist dabei der Aufbau des *ACT*-Promotors des (-)-Kreuzungstyps, da nur in diesem eine mögliche Retinsäure-Rezeptor-Bindungsstelle vorzuliegen scheint. Das Vorhandensein einer möglichen Bindestelle für einen Mcm1-Transkriptionsfaktor ausgerechnet im Promotor des *TDH*-Gens könnte ebenfalls ein Hinweis auf eine mögliche transkriptionale Regulation des Gens sein.

4.3. Charakterisierung der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase

4.3.1. Das Gen für die 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase kommt in beiden Kreuzungstypen nur einmal vor

Um die Anzahl der Gene für die 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase im Genom von *Parasitella parasitica* zu bestimmen, wurden Southern-Analysen durchgeführt. Dafür wurde ein 4.2 kb *Bgl*II-Fragment, welches das vollständige *TDH*-Gen sowie die an den 5' Bereich angrenzenden Gene *ORF1* und *ORF2* enthielt, radioaktiv markiert. Das 4.2 kb *Bgl*II-Fragment besitzt eine interne *Hind*III-Schnittstelle. Die genomische DNA beider Kreuzungstypen (FSU 387/ FSU 388) wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III, *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und stringent hybridisiert (Abb.8). Unter diesen Bedingungen hybridisiert die Sonde mit nur je einem genomischen *Bam*HI- bzw. *Eco*RI-geschnittenen DNA-Fragment in jedem Kreuzungstyp (Abb.: 16; Spuren 2,3,5,6). Wegen der internen *Hind*III-Schnittstelle wurden zwei Hybridisierungssignale bei der Hybridisierung von *Hind*III-geschnittener genomischer DNA erhalten (Abb.16; Spuren 4,7). Aufgrund der Hybridisierungssignale konnten die Gene *TDH*, *ORF1* und *ORF2* als eine Kopie im Genom beider Kreuzungstypen nachgewiesen werden.

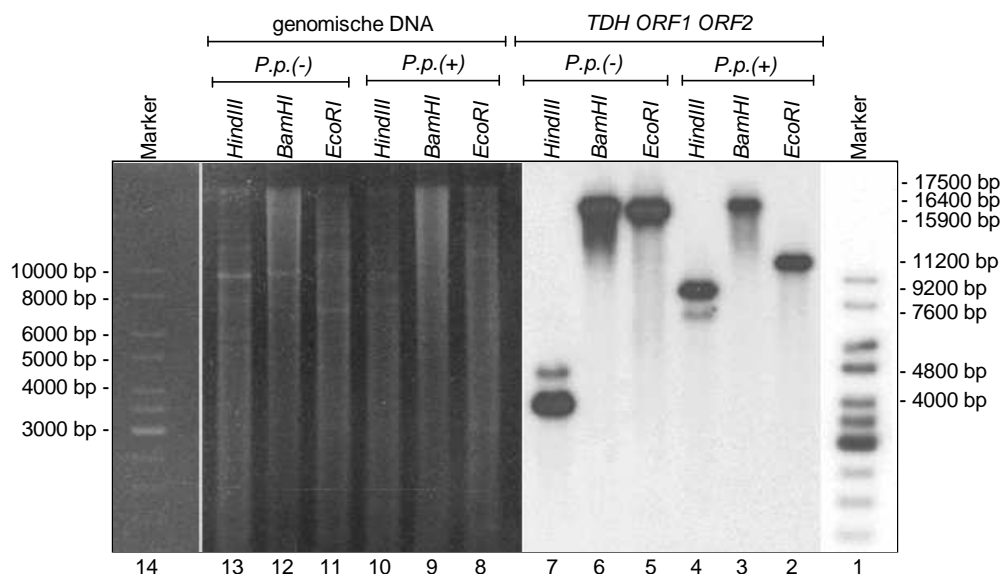


Abb. 16: Southern-Hybridisierung von genomischen DNA-Fragmenten beider Kreuzungstypen von *P. parasitica* (FSU387/ FSU388) mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, welche die Gene *TDH*, *ORF1* und *ORF2* enthielt. Die Hybridisierungsbedingungen waren stringent (42°C, 50% (v/v) Formamid). Aufgrund der erhaltenen Hybridisierungsmuster existieren die Gene *TDH*, *ORF1* und *ORF2* jeweils nur als eine Kopie im Genom beider Kreuzungspartner. (Hybridisierung: PD. Dr. Anke Burmester)

4.3.2. Die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase wird in beiden Kreuzungstypen transkribiert

Für die Kontrolle der Transkription der in der Southern-Analyse bestimmten *TDH*-Kopien, wurde Northern-Analysen durchgeführt. Dafür wurde ein 871bp PCR-Fragment, welches den kodierenden Bereich des *TDH* Gens trug, radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen und ergab, dass die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase sowohl in den Einzelkulturen als auch in der Kreuzkultur transkribiert wird (Abb.17; Spuren 4,5,6). Aufgrund von Salzeffekten, die das Laufverhalten der RNA im Gel beeinflussten, konnte diese Ergebnisse nicht für die Größenbestimmung des *TDH*-Transkripts verwendet werden.

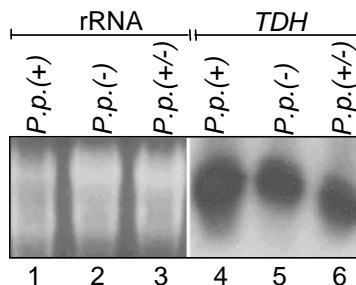


Abb.17: Nachweis eines *TDH*-Transkripts in den Einzelkulturen und in der Kreuzkultur von *P. parasitica*. Je 7µg gesamt-RNA wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit einem 871 bp PCR-Fragment hybridisiert, das den kodierenden Bereich des *TDH*-Gens enthielt.

Durch die RT-PCR konnte der Nachweis eines *TDH*-Fragments im jeweiligen Kreuzungstyp bestätigt werden (Abb.:19, Spuren 9,15). Um die in Abbildung 19 dargestellten RT-PCR-Fragmente der Gene für die Einzel- und Kreuzkulturen von *P. parasitica* vergleichen zu können, wurden für alle Primer die gleichen reversen Transkriptionsbedingungen gewählt. Als Referenz wurde das konstitutiv exprimierte Actin-Gen in gleicher Weise behandelt. Die für die RT-PCR verwendeten Primerstrategien sind in Abbildung 18 dargestellt.

Sowohl im unstimulierten (+)-Kreuzungstyp als auch in der Kreuzkultur wurden *TDH*-, *ORF3*- und *ACT*-cDNA-Fragmente erhalten (Abb.:19; Spuren 9, 10, 11 und 21, 22, 23). Im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp von *Parasitella parasitica* wurde kein *ACT*-cDNA-Amplifikat erhalten (Abb.:19, Spur 17). Die Unterschiede im Auftreten der *ACT*-Fragmente mit den Primern 3 und 5 bzw. 3 und 6 sich durch Probleme bei der Effizienz der reversen Transkription zu erklären (Abb.:19; Spuren 11 und 12; bzw. Spuren 23 und 24).

Ergebnisse

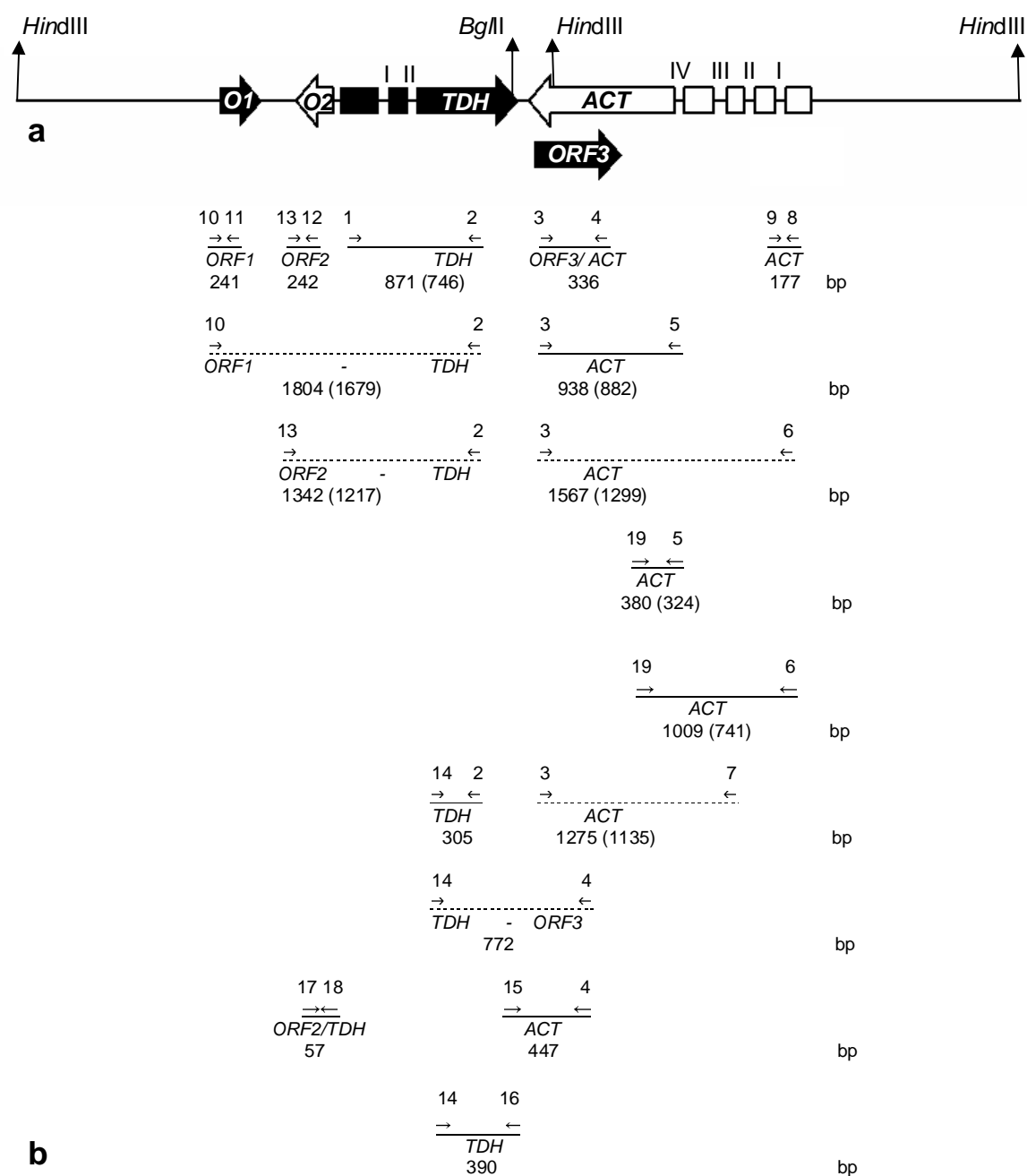


Abb.18: Primerstrategien für die Expressionsanalysen der Gene des TDH-Genclusters in *Parasitella parasitica* (FSU 388). (a) Darstellung der Anordnung der Gene Die Balken stellen die kodierenden Bereiche der Gene dar. Die kodierenden Sequenzabschnitt von ORF1(O1,) TDH und ORF3 sind schwarz, die von ORF2(O2) und ACT weiß dargestellt. Die Orientierung der Gene im Genom wird durch die Richtung Pfeile wiedergegeben. Die römischen Zahlen kennzeichnen die Intron Positionen der einzelnen Gene. (b) Primerstrategie Die Richtung und die Position der Primer ist durch kurze Pfeile angegeben. Die darüber stehenden arabischen Ziffern entsprechen der Kennnummer der Primer in Tab.:2; 5.5.2). Die durchgehenden Linien repräsentieren Fragmente, die in der RT-PCR tatsächlich auftraten. Fragmente, die ausschließlich in den Kontrollreaktionen mit genomischer DNA auftraten, sind durch eine unterbrochene Linie dargestellt. Die Größe der erhaltenen Fragmente wurde unterhalb der Linien angegeben. Die Zahlenwerte in den Klammern repräsentieren die Länge der Fragmente nach dem Entfernen der Introns.

Ergebnisse

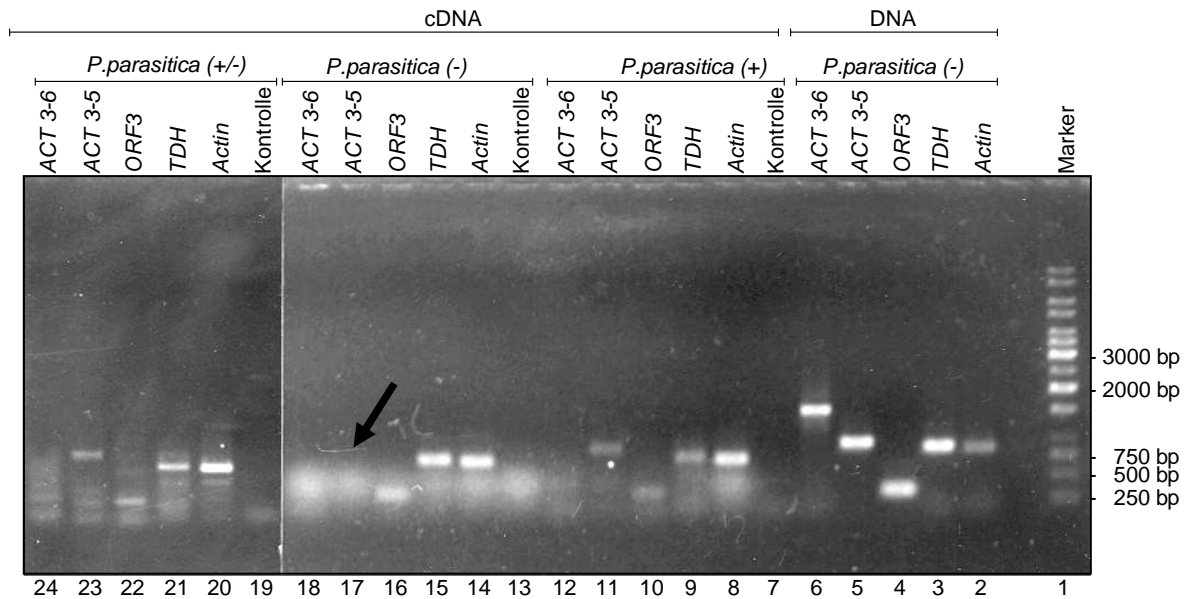


Abb.19: Expressions-Analyse der Gene *TDH*, *ACT* und *ORF3* mit Hilfe von RT-PCR. Für die reverse Transkription wurden folgende Primer verwendet: Primer 2 für die 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase (*TDH*), Primer 3 für die Acyl-CoA-Thioesterhydrolase (*ACT*) und Primer 4 für *ORF3*. Für die PCR-Reaktion wurden Primer 1 und 2 für das *TDH*-Fragment, Primer 3 und 4 für das *ORF3*-Fragment und Primer 3 und 5 bzw. 3 und 6 für das *ACT*-Fragment eingesetzt. Genomische DNA des (-)-Kreuzungstyps wurde als DNA-Kontrolle verwendet. Die entsprechenden Ansätze und Stammkombinationen sind oberhalb des Gels eingetragen. Es wurde kein *ACT*-cDNA-Fragment im (-)-Kreuzungstyp nachgewiesen (Pfeil; Spur 17).

Die *TDH*-Expression wurde an sexuellen Stammkombinationen und an Kokulturen von Parasit und Wirt untersucht. In den RT-PCR-Analysen dieser Ansätze fanden sich die gleichen Expressionsmuster wie die Einzel- bzw. Kreuzkulturen. Parasitiert eine *P. parasitica* des (+)-Kreuzungstyps auf einer *A. glauca* des (-)-Kreuzungstyps, so gleicht das Transkriptionsmuster der Gene *TDH*, *ACT* und *ORF3* dem der Einzelkultur des (+)-Kreuzungstyps (Abb.:20b; Spur 7-12).

Bei der Interaktion zwischen dem Parasiten des (-)-Kreuzungstyps und *Absidia glauca* des (+)-Kreuzungstyps waren die Transkriptionsmuster der Gene *TDH*, *ACT* und *ORF3* identisch mit denen des (-)-Kreuzungstyps (Abb.:20a; Spur 4-6).

ACT- und *ORF3*-RT-PCR-Fragmente traten im Gegensatz dazu auch in der Interaktion zwischen Parasiten und Wirt des (-)-Kreuzungstyps auf (Abb.:20b; Spur 16 und 17). Da in der Einzelkultur des (-)-Kreuzungstyps von *P. parasitica* *ACT* nicht transkribiert wird, muss von einem Einfluss der Kokultivierung auf die Expression ausgegangen werden. Um die gebildeten Mengen an *ORF3*-cDNA-Fragmenten während der parasitischen

Ergebnisse

Interaktion zwischen *P. parasitica*(-) und *A. glauca* des (+)-Kreuzungstyps mit einem konstitutiv exprimierten Gen wie dem Actin-Gen vergleichen zu können, wurden in dieser RT-PCR-Reaktion so wohl die Primer des *ORF3*- als auch des Actin-Gens verwendet (Abb.: 20a; Spur 5).

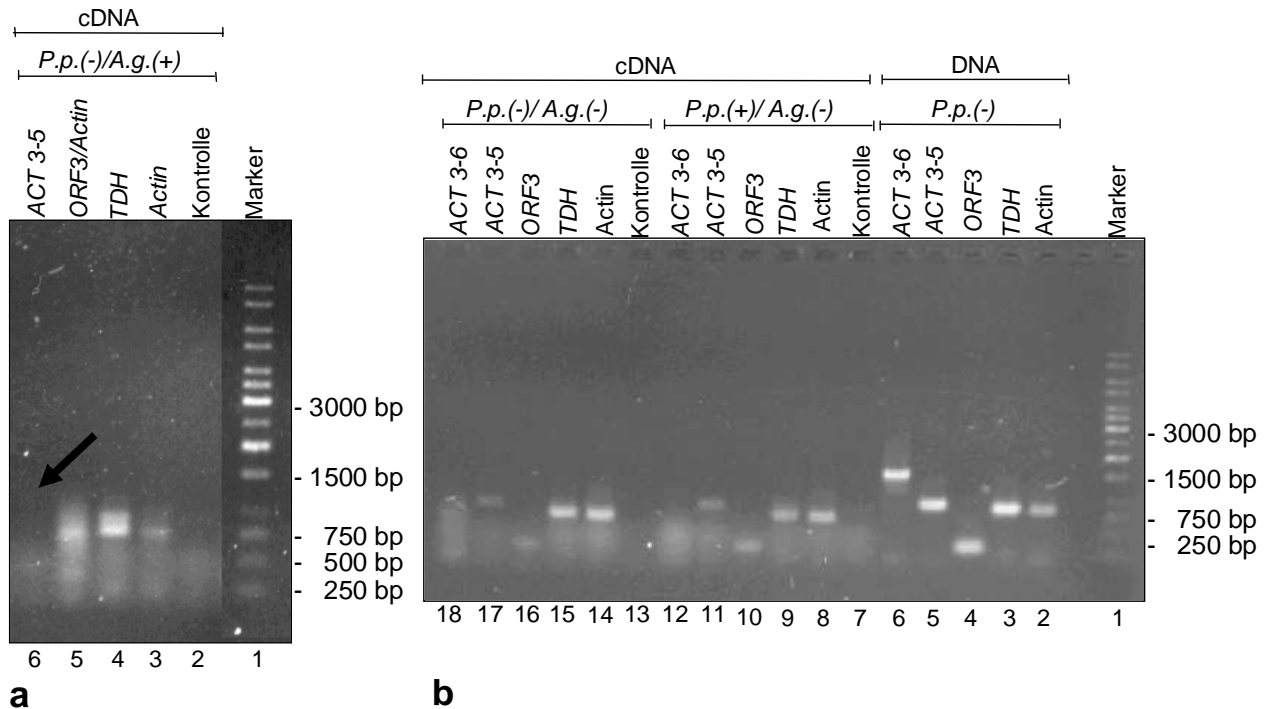


Abb.20: Expressionsanalyse von *TDH*, *ACT* und *ORF3* in Kokulturen von Parasit und Wirt des (-)-Kreuzungstyps sowie während der parasitischen Interaktion von *P. parasitica*(-) und *A. glauca*(+) und *P. parasitica*(+) und *A. glauca*(-). Für die reverse Transkription wurde verwendet: Primer 2 für das *TDH*-Gen, Primer 3 für das *ACT*-Gen und Primer 4 für das *ORF3*-Gen. In der PCR-Reaktion wurden die Primer 1 und 2 für die *TDH*- und Primer 3 und 4 für die *ORF3*-Amplifikation eingesetzt. Für die Amplifikation des *ACT*-Gens wurden der Primer 3 und 5 bzw. Primer 3 und 6 verwendet. Genomische DNA des (-)-Kreuzungstyps wurde als DNA-Kontrolle eingesetzt. **(a)** Expressionsmuster der Gene *TDH*, *ACT* und *ORF3* in einer Parasit(-)/Wirt(+) Interaktion. In der RT-PCR von *ORF3* sind auch Actin-Primer enthalten (Spur 5). Es wurde kein *ACT*-Amplifikat erhalten (Abb.:20a; Pfeil, Spur 6) **(b)** Expressionsmuster der Gene *TDH*, *ACT* und *ORF3* in einer Parasit(+)/Wirt(-) (Spur 7-12) und einer Parasit(-)/Wirt(-) (Spur 13-18) Interaktionen. In beiden Kombinationen wurden *TDH*-, *ACT*- und *ORF3*-Amplifikate erhalten.

Ergebnisse

Die 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase wird in beiden Kreuzungstypen transkribiert. Eine Hemmung der transkriptionale Regulation des Gens kann aus diesem Grund ausgeschlossen werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Expression des *ACT*-Gens, welches im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp des Parasiten nicht exprimiert wird (Tab.:4). In der parasitischen Interaktion zwischen *P. parasitica*(-) und *A. glauca*(+) wurde ebenfalls kein *ACT*-cDNA-Amplifikat erhalten. Dem gegenüber wurde bei Kultivierung eines Parasit und Wirt des (-)-Kreuzungstyp ein *ACT*-cDNA-Fragment nachgewiesen. Diese Situation gleich daher der in den einzeln gewachsenen Parasiten-Stämmen.

Tab.: 4 Übersicht über die Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels RT-PCR für die Gene *TDH*, *ACT* und *ORF3*

Kombinationen	Expressionsmuster		
	<i>TDH</i> -Gen	<i>ACT</i> -Gen	<i>ORF3</i> -Gen
<i>Parasitella parasitica</i> (+)	+	+	+
<i>Parasitella parasitica</i> (-)	+	-	+
<i>Parasitella parasitica</i> (+) x <i>Parasitella parasitica</i> (-)	+	+	+
<i>Parasitella parasitica</i> (-) x <i>Absidia glauca</i> (+)	+	-	+
<i>Parasitella parasitica</i> (-) x <i>Absidia glauca</i> (-)	+	+	+
<i>Parasitella parasitica</i> (+) x <i>Absidia glauca</i> (-)	+	+	+

(+) - kennzeichnet cDNA-Amplifikat
 (-) - kein Amplifikat

4.3.3. Bestimmung der Transkriptgröße für das Gen der 4-Dihydromethyltrisporat-dehydrogenase

Um die Größe des *TDH*-Transkripts zu bestimmen, wurde eine Northern-Hybridisierung durchgeführt. Dafür wurde die auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennte gesamt-RNA ebenfalls mit einem radioaktiv markierten 871bp PCR-Fragment, das den kodierenden Bereich des *TDH* Gens trug, hybridisiert. Das Transkript der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase hat eine Größe von 1270 nt (Abb.:21).

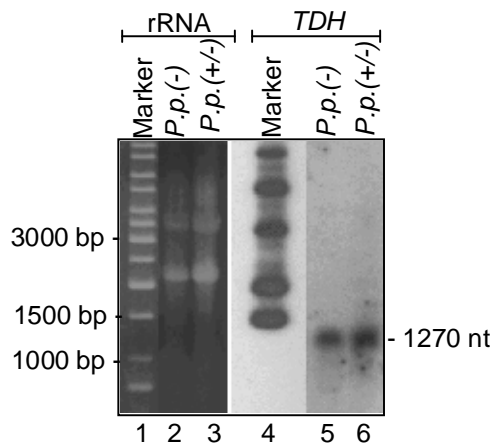


Abb.21: Größenbestimmung des *TDH*-Transkripts. Je 7µg gesamt-RNA wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (Spur 2 und 3) und mit einem 871 bp PCR-Fragment, das den kodierenden Bereich des *TDH* Gens trug, hybridisiert (Spur 5 und 6). Die Stammkombinationen sind oberhalb des Gels eingetragen. Die Größe des Transkripts wurde im (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur auf 1270 nt bestimmt.

4.3.4. (-)-Kreuzungstyp-spezifische Expression der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase in der Kreuzkultur von *P. parasitica*

Wie Abschnitt 4.1. beschrieben, stimmen die Nukleinsäurepositionen des (+)- und des (-)-Kreuzungstyps in 98% und die Aminosäurepositionen in 99% überein. Die *TDH*-Sequenz des (-)-Kreuzungstyps besitzt eine *NdeI*-Schnittstelle, die in der Sequenz des (+)-Kreuzungstyps fehlt. Durch dieses Restriktionsenzym wird die *TDH*-cDNA des (-)-Kreuzungstyps in zwei Fragmente 280 bp und 468 bp geteilt (Abb.:22; Spur 7). Bei Vergleichsreaktionen mit *NdeI* an genomischer DNA, fanden sich gleichfalls nur im (-)-Kreuzungstyp Fragmente. Ihre Länge betrug 593 bp und 280 bp (Abb.:22; Spur 5). Bei Analysen der cDNA der Kreuzkultur fanden sich ebenfalls die beiden Fragmente. Daraus folgt, dass das die *TDH*-Amplifikate der Kreuzkultur vom (-)-Kreuzungstyp stammen, unter diesen Bedingungen also im (+)-Kreuzungstyp unterdrückt sind (Abb.:22; Spur 7).

Ergebnisse

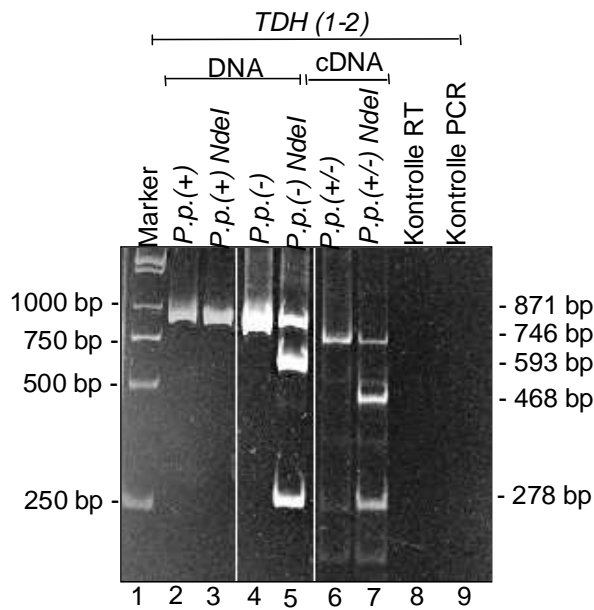


Abb.22: (-)-Kreuzungstyp spezifische Expression des *TDH*-Gens in der Kreuzkultur von *P. parasitica* Die RT-Reaktion wurde mit dem Primer 2, die PCR-Reaktion mit den Primer 1 und 2 durchgeführt. Anschließend wurden DNA und cDNA mit dem Enzym *NdeI* geschnitten. Die cDNA wurde durch das Restriktionsenzym *NdeI* in zwei Fragmente von 280bp und 468 bp geteilt, die DNA in zwei Fragmente von 280 bp und 593 bp. Da die cDNA der Kreuzkultur durch *NdeI* geschnitten wurde, folgt daraus, dass die *TDH*-Amplifikate der Kreuzkultur vom (-)-Kreuzungstyp gebildet werden. Die unterschiedlichen Ansätze und Stammkombinationen sind oberhalb des Gels eingetragen. Durch die Kontrollen (RT und PCR; Spuren 8 und 9) können Lösungskontaminationen mit DNA ausgeschlossen werden.

4.3.5. 3'RACE-PCR zum Bestimmen der Transkriptlänge von *TDH*

Die RT-PCR des *TDH*-Gens wurde unter Verwendung der Primer 14 und eines Oligo-dT-Primers (22) durchgeführt. Der Oligo-dT-Primer bindet unspezifisch an die Poly-A-Sequenzen aller mRNAs. Die Spezifität der Reaktion wird durch den Primer 14 erreicht. Ein Fragment der Länge von 490 bp (Abb.23) wurde amplifiziert. Aufgrund der erhaltenen Fragmentgröße konnte in der *TDH*-Sequenz das Sequenzmotiv (5'-AATAAA-3') in der Nukleinsäureposition 3141-3146 als mögliches Polyadenylierungssignal des *TDH*-Gens identifiziert werden.

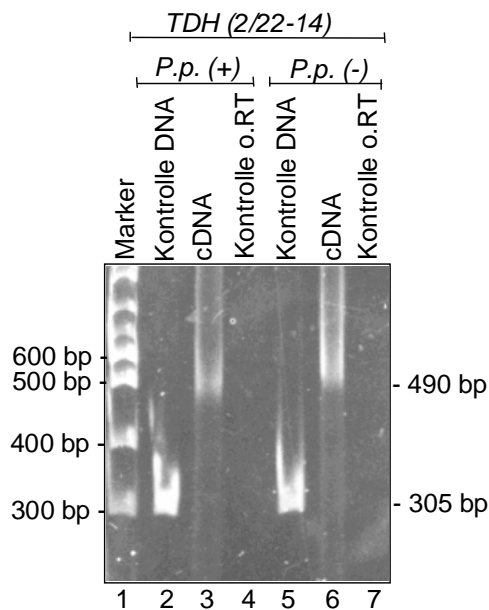


Abb.23: 3'RACE-PCR für die 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase Für die cDNA Synthese wurde ein Oligo-dT Primer (22) verwendet. In der PCR-Reaktion wurden die Primer 14 und 22 für die cDNA-Amplifikation eingesetzt. Zur Kontrolle der Effizienz PCR-Reaktion wurde genomische DNA mit den Primer 14 und 2 amplifiziert. Die Amplifikate wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die unterschiedlichen Ansätze und Stammkombinationen sind oberhalb des Gels eingetragen. Um DNA-Kontaminationen der RNA auszuschließen, wurde die RT-PCR ohne Zugabe von reverser Transkriptase durchgeführt (Kontrolle o.RT; Spur 4 und 7).

4.3.6. Die 5´- und 3´- Bereiche des *TDH*-Transkripts überlappen die Transkripten der benachbarten Gene *ORF2* und *ACT*

4.3.6.1. Der 5´-Bereich des *TDH*-Transkripts überlappt mit dem 5´-Bereich des *ORF2*-Transkripts

Aus der Nukleinsäuresequenz ist bekannt, dass die intergenische Region zwischen den Translationsinitiationssignalen von *TDH*- und dem entgegengesetzt orientierten *ORF2*-Gen 27 bp beträgt. Der Beginn des TATA-Boxmotivs befindet sich in beiden Kreuzungstypen von *P. parasitica* 61 bp vor dem Translationsstart des *TDH*-Gens. Für die RT-PCR wurden die Primer 17 und 18 verwendet. Primer 17 befindet sich im kodierenden Bereich des *ORF2*-Gens und Primer 18 in dem des *TDH*-Gens. Für die cDNA-Synthese wurde der Primer 17 verwendet. Im (-)-Kreuzungstyp von *Parasitella parasitica* wurde ein 57 bp cDNA-Fragment erhalten (Abb.:24), so dass von einer Überlagerung der *TDH*- und *ORF2*-Transkripte im 5´-Bereich ausgegangen werden kann.

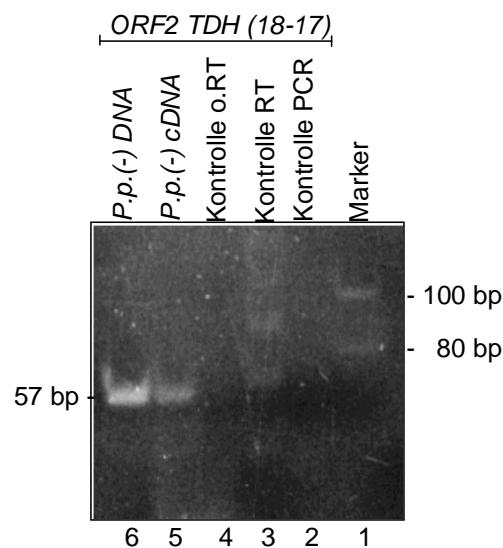


Abb.24: Der 5´-Bereich des *TDH*-Transkripts und der 5´-Bereich des *ORF2*-Transkripts überlagern sich auf einer Länge von 57bp. Für die RT-PCR wurden die Primer 17 und 18 eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde mit dem Primer 17 und die PCR-Reaktion mit den Primern 17 und 18 durchgeführt. Die Amplifikate wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die unterschiedlichen Ansätze sind oberhalb des Gels eingetragen. Durch die Kontrollen (RT und PCR; Spuren 2 und 3) können Lösungskontaminationen mit DNA ausgeschlossen werden. Um DNA-Kontaminationen der RNA auszuschließen, wurde die RT-PCR ohne Zugabe von reverser Transkriptase durchgeführt (Kontrolle o.RT; Spur 4).

Ergebnisse

4.3.6.2. Der 3'-Bereich des *TDH*-Transkripts überlappt mit dem 3'-Bereich des *ACT*-Transkripts

Wie aus den Sequenzdaten ersichtlich, überlappen sich die möglichen Polyadenylierungsstellen des 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase-Gens und des Acyl-CoA-Thioesterhydrolase-Gens. Die intergenische Region zwischen den beiden Genen ist nur 70 bp lang (Abb.: 25a). Die cDNA wurde mit dem Primer 15 bzw. 16 synthetisiert. In der RT-PCR wurden die Primer 15 und 4 für die *ACT*-Amplifikation bzw. die Primer 16 und 14 für die *TDH*-Amplifikation eingesetzt.

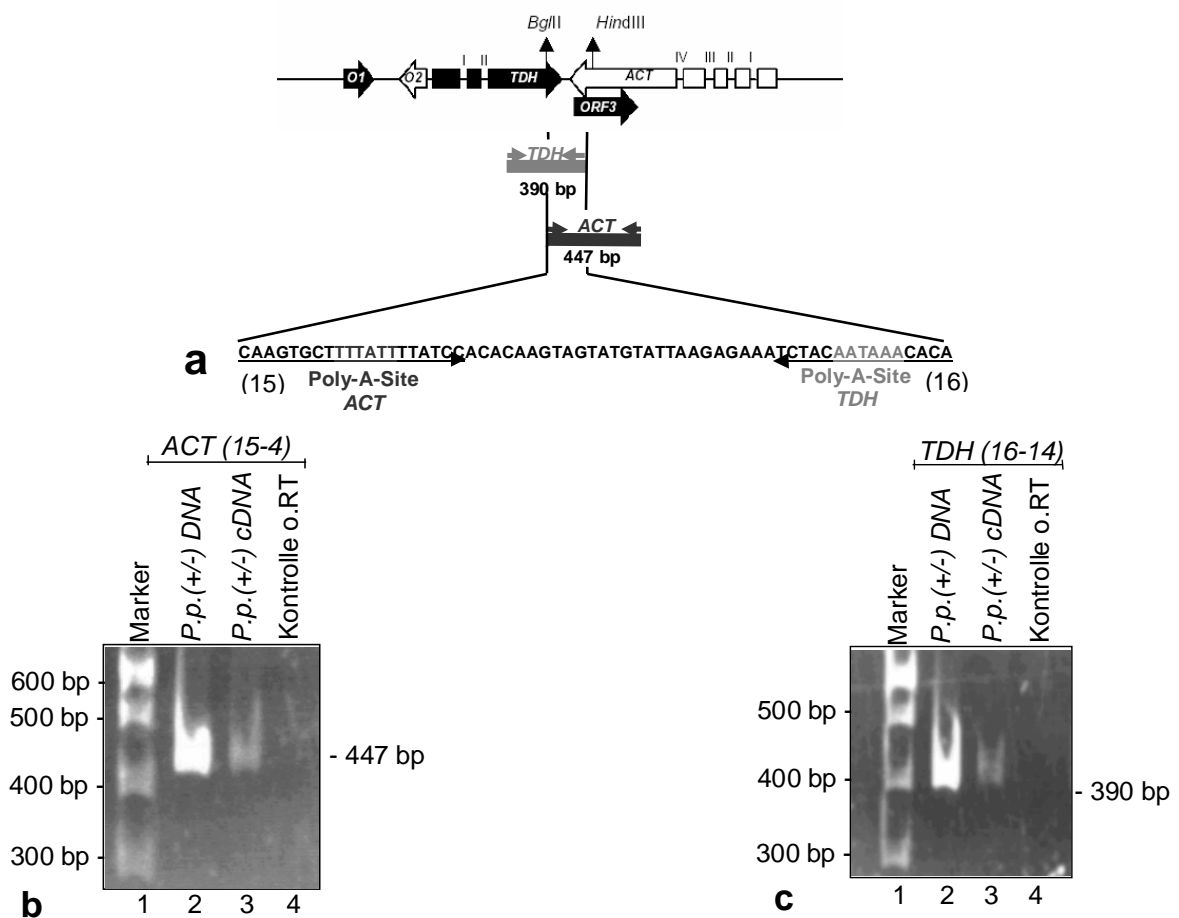


Abb.25: Die 3'-Bereiche des *TDH*- und des *ACT*-Transkripts überlappen auf einer Länge von 64 bp. (a) Schematische Darstellung der Primerstrategie für die Amplifikation der 3' Bereiche beider Gene. Der Sequenzbereich zwischen den beiden Genen wurde hervorgehoben. Darin enthalten die putativen Polyadenylierungsstellen beider Gene. Das mögliche *TDH*-Amplifikat wurde hellgrau und das *ACT*-Amplifikat dunkelgrau dargestellt. (b) RT-PCR des *ACT*-Gens Ein cDNA-Fragment der Länge von 447bp wurde erhalten. Für die cDNA Synthese wurde Primer 15 verwendet. Für die PCR-Reaktion wurden die Primer 15 und 4 eingesetzt. (c) RT-PCR des *TDH*-Gens Ein cDNA-Fragment der Länge von 390bp wurde erhalten. Für die RT-Reaktion wurde Primer 16 und für die PCR-Reaktion die Primer 16 und 14 eingesetzt. Alle Amplifikate wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

In der RT-PCR wurden sowohl das *TDH*- als auch das *ACT*-Fragment erhalten (Abb.: 25 b, c), so dass von einer Überlagerung der *TDH*- und *ACT*-Transkripte im 3'-Bereich ausgegangen werden kann.

4.3.7. Die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase ist ein (-)-Kreuzungstyp-spezifisches Enzym

Sowohl im (+)- als auch im (-)-Kreuzungstyp von *Parasitella parasitica* wird das Gen der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase transkribiert. Während der sexuellen Reaktion werden die *TDH*-Transkripte ausschließlich vom (-)-Kreuzungstyp gebildet. Um zu kontrollieren, ob die Transkripte auch translatiert werden, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dafür wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der gegen die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase aus *Mucor mucedo* gerichtet war. In *M. mucedo* hat das TDH-Protein eine Größe von 33 kDa (Czempinski, *et al.*, 1996).

Als Antigen zur Herstellung des Antikörpers diente ein Fusionsprotein aus *M. mucedo*(-) TDH und einem Maltosebindeprotein (pMalTM protein fusion and purification system, New England Biolabs). Das *TDH*-pMalc2x Konstrukt wurde in *Escherichia coli* exprimiert, durch SDS-Gelelektrophorese gereinigt und die entsprechenden Banden direkt für die Antikörperherstellung eingesetzt (Antikörperherstellung: Frank Wolschendorf). Der TDH-Antikörper war sowohl gegen die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase als auch gegen das Maltosebindeprotein gerichtet. Um die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion zu erhöhen, wurde der TDH-Antikörper vor der Hybridisierung mit Maltosebindeprotein (MBP2*, New England Biolabs) abgesättigt.

Für die Analyse wurden Proteinrohextrakte der unstimulierten Einzelkulturen sowie der Kreuzkultur verwendet. Für den (-)-Kreuzungstyp und die Kreuzkultur wurde ein schwaches TDH-Hybridisierungssignal erhalten (Abb.:26). Die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase wird ausschließlich im (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur gebildet. Die Größe des TDH-Proteins wurde durch lineare Regression auf 31.3 kDa bestimmt. Keine Antigen-Antikörper-Reaktionen fanden im unstimulierten (+)-Kreuzungstyp statt (Abb.:26). Im unstimulierten (+)-Kreuzungstyp wird kein TDH-Protein gebildet. Dies bedeutet, dass die *TDH*-Transkripte des (+)-Kreuzungstyps nicht translatiert werden.

Ergebnisse

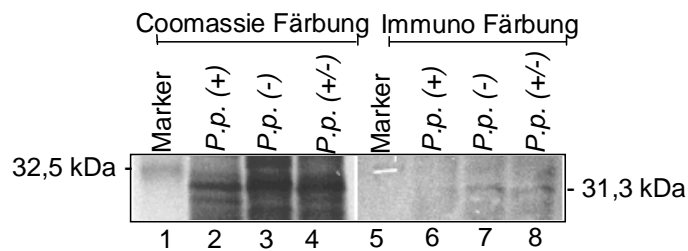
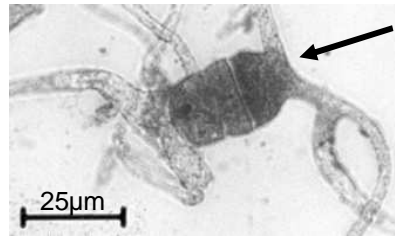


Abb.26: Western-Blot-Analyse der 4-Dihydromethyltrispurat-Dehydrogenase in unstimulierten (+)- und (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur von *P. parasitica*. Für die Hybridisierung wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet. Als Antigen bei der Antikörperherstellung diente ein Fusionsprotein aus Maltosebindenprotein und TDH aus *M. mucedo*. Es fanden ausschließlich Antigen-Antikörper-Reaktionen im (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur von *P. parasitica* statt. Die Größe des TDH-Proteins wurde auf 31,3kDa bestimmt.

Die Ergebnisse der Western-Analyse werden durch das Ergebnis des Aktivitätstests der 4-Dihydromethyltrispurat-Dehydrogenase bestätigt. Diese Testreaktion verwendet das natürliche Substrat, das 4-Dihydromethyltrispurat. Der Ort der Aktivität des Enzyms wird durch einen blauen Diformazan-Niederschlag sichtbar gemacht, der durch Oxidation von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) entsteht. Die Aktivität der 4-Dihydromethyltrispurat-Dehydrogenase konnte für die Kreuzkultur von *P. parasitica* und die Interaktionen des Parasiten mit seinem Wirt gezeigt werden. In allen Fällen war ein deutliches Aktivitätssignal nur im (-)-Kreuzungstyp erkennbar (Abb.:27).



(a) Sexuelle Interaktion



(b) Parasitische Interaktion

Abb.27: (-)-Kreuzungstyp-spezifische Aktivität der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase
Eindeutig positive Reaktionen sind durch den blaue Diformazan-Niederschlag gekennzeichnet und auf die Aktivität des Enzyms zurückzuführen. **(a) TDH-Aktivität in einer Zygosporre von *P. parasitica*** – als Ergebnis der sexuellen Interaktion zweier unterschiedlicher Kreuzungspartner. Der (-)-Kreuzungstyp ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. **(b) Parasitische Interaktion einer *P. parasitica*(-)** mit einem Wirt des (+)-Kreuzungstyps (*Blakeslea trispora*) Mit einem Pfeil ist eine blaue Sikyospore des Parasiten gekennzeichnet (Fotographien und Aktivitätstest: Dr. Christine Schimek).

4.4. Charakterisierung des putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolyase-Gens und des *ORF3*-Gens

4.4.1. Das *ACT*-Gen und das *ORF3*-Gen treten in beiden Kreuzungstypen in unterschiedlicher Anzahl auf

Um die Anzahl der *ACT*- bzw. *ORF3*-Gene im Genom der beiden Kreuzungstypen zu bestimmen, wurden Southern-Hybridisierungen durchgeführt. Dafür wurden mit einem 938 bp PCR-Fragment als Sonde hybridisiert, das aus der Amplifikation mit den Primern 3 und 5 hervorging (Abb.:18b). Das Fragment enthielt sowohl die kodierende Region des *ACT*-Gens als auch die des entgegengesetzt orientierten *ORF3*-Gens. Weiterhin weist das PCR-Fragment im (-)-Kreuzungstyp eine interne *HindIII*-Schnittstelle auf. Die genomische DNA beider Kreuzungstypen wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII*, *PstI*, *EcoRI* sowie *BamHI* geschnitten und stringent hybridisiert.

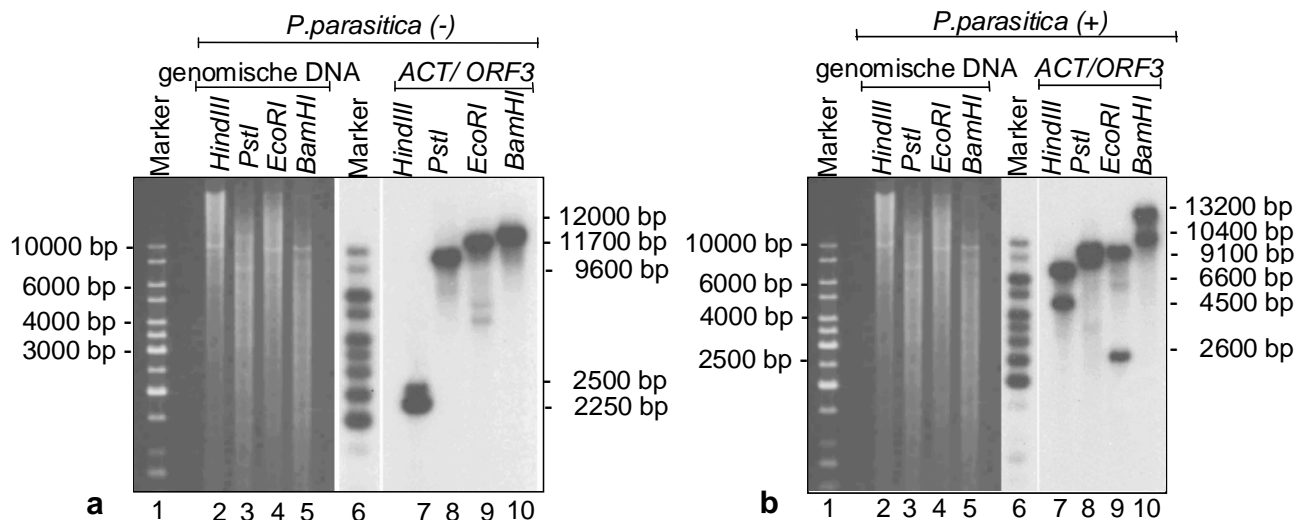


Abb.: 28 Hybridisierung geschnittener genomischer DNA von (a) *P. parasitica*(-) (FSU388) und (b) *P. parasitica*(+) (FSU387) mit einem radioaktiv markierten PCR-Fragment, welches die Gene *ACT* und *ORF3* enthielt. (a) Links: Die geschnittene genomische DNA wurde auf einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt. Rechts: Ergebnis der Southern-Hybridisierung - im (-)-Kreuzungstyp liegen beide Gene nur als je eine Kopie im Genom vor. (b) Links: Geschnittene genomische DNA aufgetrennt auf einem 0,8%igen Agarosegel. Rechts: Hybridisierungsmuster - im (+)-Kreuzungstyp konnten je zwei Kopien beider Gene im Genom nachgewiesen werden.

Unter diesen Bedingungen hybridisiert das PCR-Fragment mit nur einer Region im Genom von *P. parasitica*(-) (FSU388). Wird die Hybridisierung mit dieser Sonde nach Restriktion der genomischen DNA mit *HindIII* durchgeführt, ergeben sich im (-)-Kreuzungstyp zwei Hybridisierungssignale (Abb.21a). Im (+)-Kreuzungstyp existiert

eine solche *Hind*III-Schnittstelle nicht. Unter stringenten Bedingungen hybridisiert das *ACT-ORF3* PCR-Fragment mit zwei Regionen im Genom des (+)-Kreuzungstyps (Abb.:28b). Im (-)-Kreuzungstyp von *P. parasitica* existiert jeweils nur eine Kopie der Gene für *ACT* und *ORF3*, wohingegen im (+)-Kreuzungstyp je zwei Kopien beider Gene zu finden sind.

4.4.2. Das Transkript der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase und das Transkript des entgegengesetzt orientierten *ORF3*-Gens haben die gleiche Größe

Um die Ergebnisse der RT-PCR zu bestätigen und um die Größen der *ACT*- bzw. *ORF3*-Transkripte zu bestimmen, wurden Northern-Hybridisierungen durchgeführt. Für die Analyse des *ACT*-Transkripts wurde ein PCR-Fragment von 380 bp als Sonde (Abb.:18b; Primer 19/5) verwendet. Es enthielt die kodierende Region des *ACT*-Gens und wurde so gewählt, dass es sich mit dem kodierenden Bereich des *ORF3*-Gens nicht überlappte. Um Signale von *ORF3*-Transkripten bei der *ACT*-Hybridisierung zu vermeiden, wurde nur der zum *ACT*-Gen komplementäre Strang radioaktiv markiert (siehe Abschnitt 3.5.4.4.2). Für die Northern-Analyse des *ORF3*-Transkripts wurde ein 336bp PCR-Fragment eingesetzt (Abb.:18b; Primer 3/4). Dieses PCR-Fragment enthielt die kodierenden Regionen des *ORF3*- und des *ACT*-Gens. Für die Hybridisierung wurden dieses Mal beide DNA-Stränge radioaktiv markiert. Die Hybridisierung wurde wie in Abschnitt 3.5.4. beschrieben durchgeführt.

Die Northern-Hybridisierungen für das *ACT*-Transkript bestätigen die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente (Abb.:19; Spur 17; Abb.:20a; Spur 6): auch hier ergab sich kein Hinweis auf Expression im (-)-Kreuzungstyp (Abb.:29a). Nur in der Kreuzkultur wurde ein Transkript detektiert. Das Transkript hat eine Größe von 1700 nt (Abb.:29a).

Die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente für *ORF3* werden ebenfalls durch die Northern-Hybridisierungen bestätigt (Abb.:19; Spuren 10, 16, 22; Abb.:20a; Spur 5; Abb.:20b; Spur 10, 16), da sowohl in den Einzel- als auch in der Kreuzkultur ein Transkript nachgewiesen werden konnte (Abb.:29c). Die größte Zunahme an *ORF3*-Transkript trat im (-)-Kreuzungstyp auf. Die Größe des Transkripts betrug 1750 nt (Abb.:29c). Auffällig ist, dass offenbar gerade dann verstärkt *ORF3*-Transkripte gebildet werden, wenn kein *ACT*-Transkript vorhanden ist.

Um die Hybridisierungsmuster der Northern-Analysen für die Gene *TDH* (Abb.:21), *ACT* (Abb.: 29a) und *HSP* (Abb.: 37b) einordnen und vergleichen zu können, wurde die für

Ergebnisse

die Hybridisierung verwendete RNA der Einzel- und der Kreuzkulturen mit einem 839 bp radioaktiv markierten Actin-PCR Fragment aus *P. parasitica* stringent hybridisiert (Abb.:29b). In der Northern-Hybridisierung wurde die Größe des Actin-Gens mit 1400 nt bestimmt (Abb.:29b), was in etwa den Erwartungen der Sequenzanalyse entspricht. Der Beginn der Polyadenylierungsstelle des Actin-Gens von *Absidia glauca* wird für die Nukleinsäure-Position 1309 nt angeben (EMBL. Acc.No.:M64729).

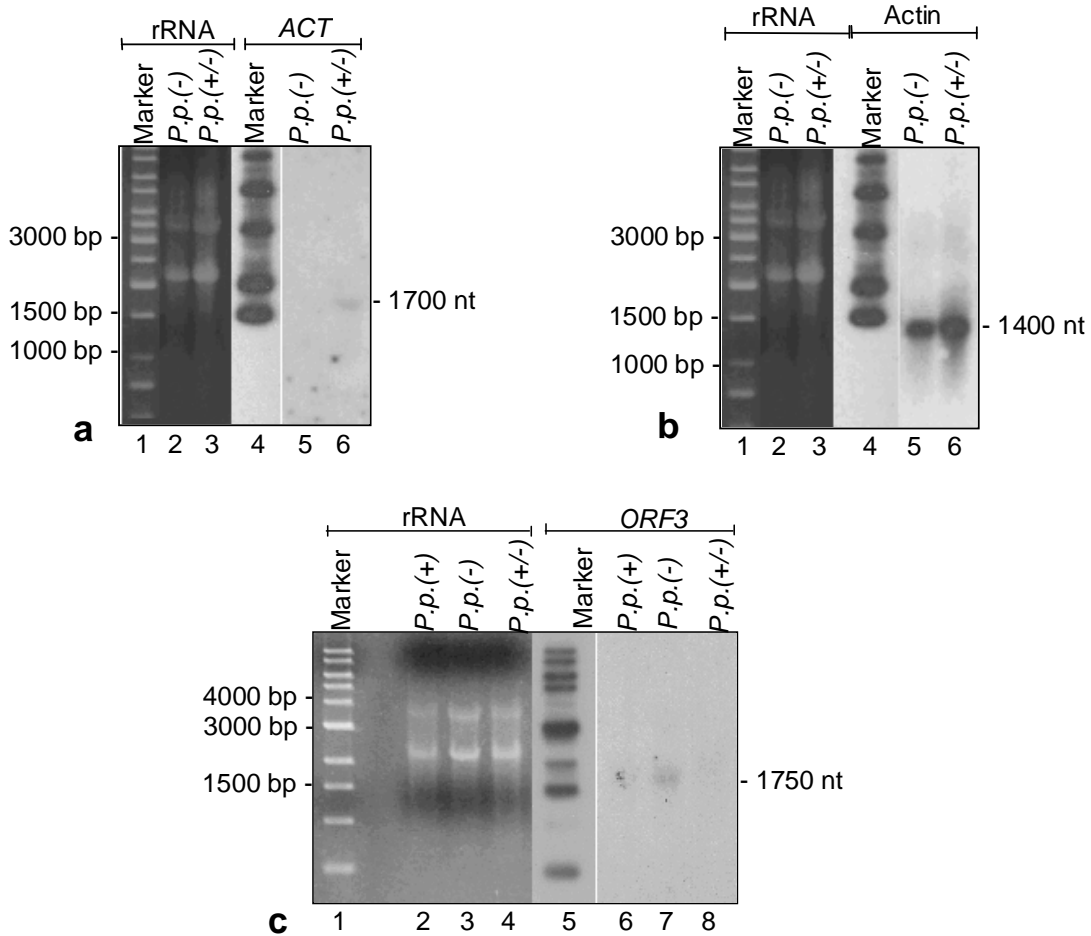


Abb.29: Expressionsanalyse des (a) *ACT*-, (b) *Actin*- und (c) *ORF3*-Gens. 7µg gesamt-RNA wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit einem (a) einzelstrang-markierten 380 bp langen und (c) mit einem doppelstrang-markierten 336 bp PCR-Fragment hybridisiert. (a) Das *ACT*-Transkript hat eine Größe von 1700 nt und das (c) *ORF3*-Transkript eine Größe von 1750 nt. (b) Kontroll-Hybridisierung der RNA mit dem Actin-Gen. 7µg gesamt-RNA wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit einem 839 bp PCR-Fragment, das die kodierende Region des Actin-Gens aus *P. parasitica* enthält, hybridisiert. Für das Actin-Transkript wurde eine Länge von 1400 nt bestimmt (EMBL. Acc.No.:M64729).

4.4.3. Die Introns der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase werden in *P. parasitica* korrekt entfernt

Da der Start des ersten Introns sowohl im *ACT*-Gen des (-)-Kreuzungstyps (5'-GT**GAGA**-3') als auch in der sequenzierten Kopie des *ACT*-Gens des (+)-Kreuzungstyps (5'-AT**GAGA**-3') von der konservierten 5'-Sequenz (5'-**AAGAGT**-3') abweicht, bestand die Möglichkeit, dass das Intron (I) in *P. parasitica* nicht korrekt entfernt werden könnte. Mit Hilfe unterschiedlicher Primerkombinationen in RT-PCR-Ansätzen wurden versucht, diese Frage zu beantworten. Mit dem Primerpaar 3 und 5 wurde in den RT-PCR-Experimenten ein *ACT*-Fragment gebildet (Abb.:19, Spuren 11, 23; Abb.:20a, Spur 6; Abb.:20b, Spuren 11, 17). Mit der Kombination Primer 3 und 6 wurde dagegen kein *ACT*-Fragment erhalten (Abb.:19, Spuren 12, 24; Abb.:20b, Spuren 12, 18). Der Primer 6 ist vor dem ersten Intron lokalisiert (Abb.:18b). Auch die Primerkombination 8 und 9 (Abb.:18b) führt zu einem Amplifikationsprodukt, seine Länge betrug 177bp (Abb.:32). Die Bindungsstelle des Primers 9 befindet sich innerhalb von Intron(I) des *ACT*-Gens. Mit den Primer 19 und 5 bzw. 19 und 6 (Abb.18b) ließ sich hingegen in beiden Fällen ein *ACT*-Fragment erzeugen (Abb.:30). Die Unterschiede im Auftreten der *ACT*-Fragmente mit den Primern 19 und 6 bzw. 3 und 6 sich durch Probleme bei der Effizienz der reversen Transkription zu erklären.

Die Primerkombination 19 und 6 ergab ein *ACT*-Fragment von 741bp (Abb.:30, Spur 6). Anhand der Sequenz wurde für das betreffende Fragment eine Länge von 1009 bp berechnet. Die Gesamtlänge der vier Introns des *ACT*-Gens beträgt 268 bp. Nach Abzug der Introns verbleibt somit für das Fragment eine Länge von 741 bp. Dies stimmt mit der Länge des RT-PCR-Amplifikats überein. Bei der Prozessierung der *ACT*-mRNA wurden alle Introns korrekt entfernt.

Die RT-PCR mit den Primern 19 und 5 ergab ein Fragment von 324 bp (Abb.:30, Spur 5). Aus der Sequenz wurde für das betreffende Fragment eine Länge von 380 bp berechnet. Das Intron (IV) des *ACT*-Gens hat eine Länge von 56 bp. Nach Abzug des Introns (IV) verbleibt für das Fragment eine Länge von 324 bp. Dies stimmt gut mit der Länge des RT-PCR-Fragments überein. Bei der Prozessierung der mRNA wurde Intron (IV) demnach korrekt entfernt.

Ergebnisse

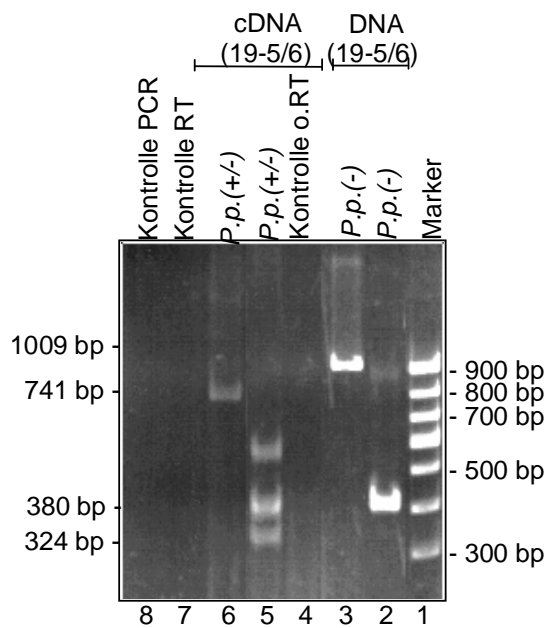


Abb.30: RT-PCR der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase in der Kreuzkultur von *P. parasitica*.

Die RT-Reaktion wurde mit dem Primer 19 durchgeführt (Abb.:18b). In der PCR wurden die Primer 5, der sich vor Intron (IV) befindet (Abb.:18b) und der Primer 6, der sich vor dem Intron (I) befindet (Abb.:18b) eingesetzt. Die Amplifikate wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die unterschiedlichen Ansätze sind oberhalb des Gels eingetragen. Durch die Kontrollen (RT und PCR; Spuren 7 und 8) können Lösungskontaminationen mit DNA ausgeschlossen werden. Um DNA-Kontaminationen der RNA auszuschließen, wurde die RT-PCR ohne Zugabe von reverser Transkriptase durchgeführt (Kontrolle o.RT; Spur 4).

Weiterhin wurden bei der RT-PCR mit den Primern 19 und 5 ein Fragment von 380 bp erhalten (Abb.:30, Spur 5). Die Länge entspricht einem Fragment, aus dem das Intron(IV) nicht entfernt wurde. Eine DNA-Kontaminationen der RNA oder der Lösungen kann aufgrund der Kontrollen ausgeschlossen werden (Abb.:30, Spur 4, 7, 8). Eine Erklärungsmöglichkeit könnte jedoch sein, dass degradierte *ACT*- und *ORF3*-mRNAs als Primer mit der mRNA des *ORF3*-Gens hybridisieren und durch die reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Die gebildeten partiellen *ORF3*-cDNA-Fragmente enthielten die korrespondierenden *ACT*-Intron-Sequenzen, die nicht korrekt entfernt werden könnten.

4.4.4. 3'RACE-PCR zum Bestimmen der Transkriptlänge der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase

Die RT-PCR wurde mit den Primern 4 und 22 durchgeführt. Für die reverse Transkription wurde ein Oligo-dT-Primer verwendet. Dieser hybridisiert mit den Poly-A-Sequenzen aller mRNAs in den Ansätzen. Die Spezifität der Reaktion wird durch den ACT-Primer 4 erreicht. Die 3'RACE-PCR ergab ein Fragment der Länge von 510 bp (Abb.31). Aufgrund der ermittelten Fragmentlänge konnte in der ACT-Sequenz ein mögliches Polyadenylierungssignal (5'-TTTATT-3') identifiziert werden. Dieses befindet sich in den Nukleinsäure-Positionen 3103-3098.

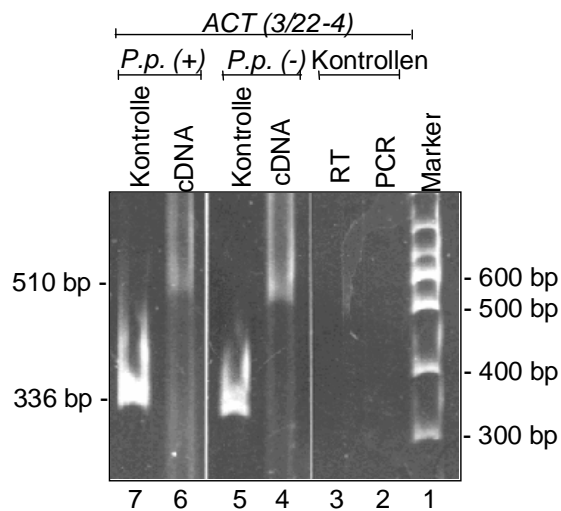


Abb.31: 3'RACE-PCR mit ACT-spezifischen Primern. Für die cDNA-Synthese wurde ein Oligo-dT-Primer (22) verwendet. In der PCR wurden die Primer 4 und 22 für die cDNA-Amplifikation (Spuren 4 und 6) und die Primer 4 und 3 bei der Kontroll-Amplifikation der genomischen DNA (Spuren 5 und 7) eingesetzt. Die Ansätze und Stammkombinationen sind oberhalb des Gels aufgeführt. DNA-Kontaminationen der Lösungen können ausgeschlossen werden (Spuren 2 und 3). Das 3'RACE-PCR-Fragment hat eine Größe von 510 bp. Alle Amplifikate wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

4.5. Charakterisierung von *ORF1* und *ORF2*

4.5.1. *ORF1* und *ORF2* werden in den Einzel- und in den Kreuzkulturen von *P. parasitica* exprimiert

Sowohl im (+)- als auch im (-)-Kreuzungstyp kommen die Gene *ORF1* und *ORF2* vor. Um zu überprüfen, ob bzw. unter welchen Bedingungen diese Gene transkribiert werden, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Für die reverse Transkription der *ORF1*-mRNA wurde der Primer 11 und der *ORF2*-mRNA der Primer 13 eingesetzt. In der PCR wurde das *ORF1*-Fragment mit Primer 10 und 11 (Abb.:18b) und das *ORF2*-Fragment mit Primer 12 und 13 (Abb.:18b) erhalten. Beide *ORFs* werden in den Einzel- und in den Kreuzkulturen von *P. parasitica* exprimiert (Abb.:32; Spur 7,8,12,13,17,18). Das *ORF1*-Fragment hat eine Länge von 241 bp. Auffällig sind die Größenunterschiede der *ORF2*-Amplifikate: die Produkte des (+)-Kreuzungstyps sind deutlich kleiner als die des (-)-Kreuzungstyps (Abb.:32; Spur 8,13). Im (-)-Kreuzungstyp hat das *ORF2*-Fragment eine Länge von 242 bp und im (+)-Kreuzungstyp von 221 bp. Diese Abweichung ist auf zwei Deletionen von 2 und 21 bp zurückzuführen, wie der Sequenzvergleich ergab (Abb.:33). Durch die Deletionen in der *ORF2*-Sequenz des (+)-Kreuzungstyps kommt es zur Verschiebung des Leserahmens. So könnte zum einen ein Leserahmen genutzt werden, der dem 5'-Bereich des *ORF2*-Gens des (-)-Kreuzungstyps entspräche (Abb.33; *P.p.(+)P1*). Der zweite mögliche Leserahmen wäre homolog dem 3'-Bereich des *ORF2*-Gens des (-)-Kreuzungstyps. Eine 1 bp Insertion in der *ORF2*-Sequenz des (+)-Kreuzungstyps (Abb33; *P.p.(+)P2*) kurz vor einem Sequenzabschnitt, der im (-)-Kreuzungstyp für das Stopp-Signal kodiert, führt auch hier zu einer weiteren Verschiebung des Leserahmens. Aufgrund der Längenunterschiede der *ORF2*-Fragmenten im (+)- und im (-)-Kreuzungstyp ist der Anteil von *ORF2*-Transkripten in der Kreuzkultur erkennbar. In der Kreuzkultur sind sowohl Transkripte des (+)- als auch des (-)-Kreuzungstyps zu finden (Abb.32, Spur 18).

Ergebnisse

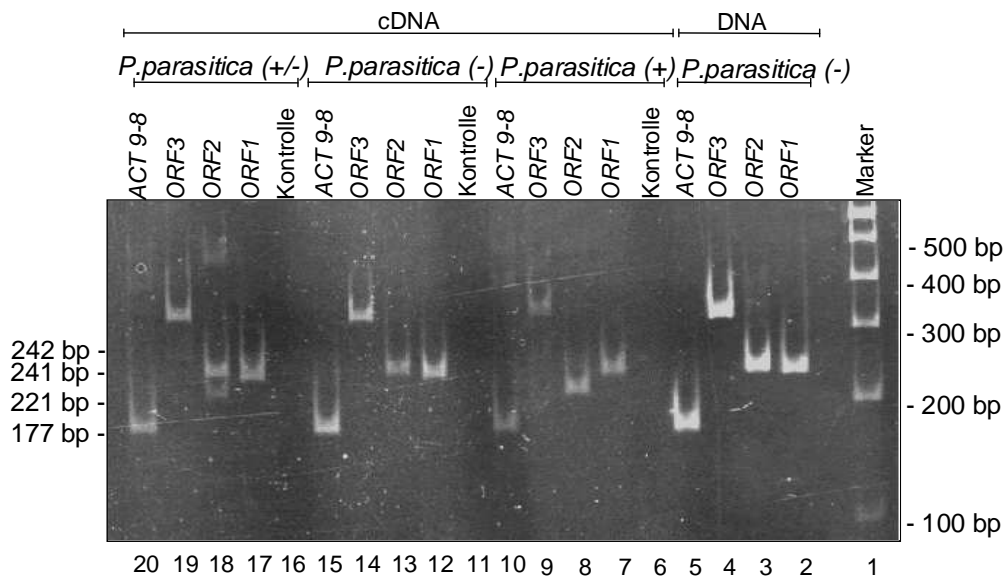


Abb.32: RT-PCR von *ORF1* und *ORF2* im (+)- und (-)-Kreuzungstyp sowie der Kreuzkultur von *P. parasitica* Die Ansätze und die Stammkombinationen sind oberhalb des Gels dargestellt. Der Primer 11 wurde für die *ORF1*-cDNA-Synthese und Primer 13 für die *ORF2*-cDNA-Synthese eingesetzt. In der PCR wurden mit Primer 10 und 11 *ORF1* und mit Primer 12 und 13 *ORF2* amplifiziert. Das *ORF1*-Amplifikat von 241 bp wurde in allen Kombinationen erhalten (Spuren 7, 12, 17). Die Größenvariationen von *ORF2* im (+)- und (-)-Kreuzungstyp (Spur 8, 13) sind auf Deletionen in der Sequenz des (+)-Kreuzungstyps zurückzuführen. Die *ORF2*-Fragmentlänge betragen im (+)-Kreuzungstyp 221 bp und im (-)-Kreuzungstyp 242 bp. Der Primer 9 wurde für die cDNA-Synthese des *ACT*-Amplifikats (Spuren 10, 15, 20) eingesetzt (Abschnitt 4.4.3.). Der Primer 9 befindet sich im Intron (I) des *ACT*-Gens. Für die PCR-Reaktion wurden die Primer 8 und 9 verwendet. Für die Kontrolle der PCR-Effizienz wurde genomische DNA des (-)-Kreuzungstyps mit den *ORF1*, *ORF2* und *ACT*-Primern amplifiziert. Kontrolle: Die RNA der Kombinationen wurde einer RT-PCR unterzogen ohne jedoch reverse Transkriptase hinzuzugeben, um DNA-Kontaminationen der RNA auszuschließen.

Ergebnisse

```

P.p.(-) - ATGAATAAACAAGAATATGCGGGTAAAGCGTGCATTATATATGTGCACAT -
          |||
P.p.(+) - ATGAATAAACAAGAATATGCGGGTATAGCGTGCATTATACATGTGCACAT -
          |||
P.p.(-)      M N K Q E Y A G K A C I I Y V H I
P.p.(+)/P1   M N K Q E Y A G I A C I I H V H I

P.p.(-) - TTTTGTGTCCGCGTTGATTTGTCAAATGAAACCGTTGGATGAATCACCAA -
          |||
P.p.(+) - TTTTGTGTCCGCGTTGATTTGTCAAATGAAACCGTCCGGATGAATCACCAA -
          |||
P.p.(-)      F V S A L I C Q M K P L D E S P
P.p.(+)/P1   F V S A L I C Q M K P S D E S P
P.p.(+)/P2                                     M N H Q

P.p.(-) - CGCGCTGTACAGTATATACCGAAATTTCCGCTGAAACAAAGCGGCTGCCA -
          |||
P.p.(+) - CGCG--GCACAG-----AAAAAAAAAGCGGCTGCCA -
          |||
P.p.(-)      T R C T V Y T E I S A E T K R L P
P.p.(+)/P1   T R      H R                               K K A A A
P.p.(+)/P2   R   G T                               E K K R L P

P.p.(-) - TTTGGAGGCTTTAGCACTGCACAGAATGTTAGTATTACGGTTTGTATTAA -
          |||
P.p.(+) - TTTGGAGGCTTTAGCACTGCACAGAATGTGAGTATTACGGTTTGTATTAA -
          |||
P.p.(-)      F G G F S T A Q N V S I T V C I N
P.p.(+)/P1   I W R L -
P.p.(+)/P2   F G G F S T A Q N V S I T V C I N

P.p.(-) - TGTCTTGATGTAGCCTTTATGTCATTAATTCTTGATG-CCTGGTATTGA -
          |||
P.p.(+) - TGTCTTGATGTAGCCTTTATGTCATTAATTCTTGATGTCTGGTATTGA -
          |||
P.p.(-)      V L D V A F M S L I L D A W Y -
P.p.(+)/P2   V L D V A F M S L I L D V L V L

P.p.(-) - CTGAAAATTGAGTTTATTTGTTGCATGCATTCATCCAGAATAGGATCAAA -
          |||
P.p.(+) - CTGAAGATTTAATTTATTTGTTGCATGCATTCATCCAGAATAGGATCAAA -
          |||
P.p.(+)/P2   T E D L I Y L L H A F I Q N R I K

P.p.(-) - ATCACTTTTGAGTATAATCAAATGAAAACGTGGAGCGTTTATCGGTGTAG -
          |||
P.p.(+) - ATCACTTTTGCGTACAATCAAATGAAAACGTGAAGCGTTTATCGGTGTAG -
          |||
P.p.(+)/P2   I T F A Y N Q M K T V K R L S V -

```

Abb.33: Vergleich der ORF2-Sequenzen des (+)-und des (-)-Kreuzungstyps von *P. parasitica*. Durch Deletionen von 2 und 21 bp in der Sequenz des (+)-Kreuzungstyps kommt es zur Verschiebung des möglichen Leserahmens. Der erste Leserahmen ergäbe ein Protein von 46 Aminosäuren (*P.p.*(+)/P1), der zweite Leserahmen (*P.p.*(+)/P2) ein 79 Aminosäuren langes Protein. Die Aminosäure-Sequenzen wurden im Einbuchstabenkode dargestellt. Die dick hervorgehobenen Buchstaben kennzeichnen die Abweichungen in den Aminosäure-Sequenzen beider Kreuzungstypen.

4.5.2. (-)-Kreuzungstyp-spezifische Expression von *ORF1* in der Kreuzkultur von *P. parasitica*

Sequenzvergleiche des *ORF1*-Gens im (+)- und im (-)-Kreuzungstyp ergaben eine 78%ige Übereinstimmung in den Nukleinsäure- und eine 82%ige Übereinstimmung in den Aminosäure-Positionen. Die Sequenz des (+)-Kreuzungstyps enthält eine Schnittstelle für das Enzym *Sau3A*. Durch das Restriktionsenzym wird sowohl die cDNA als auch die genomische DNA in jeweils ein 165 bp und ein 63 bp Fragment geteilt (Abb.:34). Im (-)-Kreuzungstyp ist die Restriktionsschnittstelle nicht vorhanden. Eine *Sau3A*-Restriktion von *ORF1* war, wie erwartet, nur im (+)-Kreuzungstyp erfolgreich (Abb.:34, Spuren 3,4). Die *ORF1*-cDNA der Kreuzkultur wurde nicht geschnitten. Daraus folgt, dass die *ORF1*-RT-PCR-Produkte der Kreuzkultur überwiegend vom (-)-Kreuzungstyp gebildet werden (Abb.:34, Spuren 9, 10).

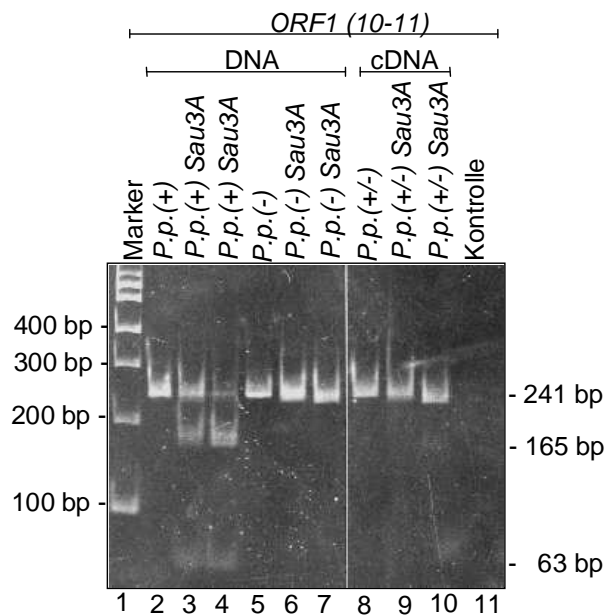


Abb.34: Restriktionsanalyse des *ORF1*-Fragments in der Kreuzkultur von *P. parasitica*. Das *ORF1*-PCR-Fragment des (+)-Kreuzungstyps wird durch das Restriktionsenzym *Sau3A* geschnitten. Die Restriktionsprodukte haben eine Größe von 165bp und 63bp. Ansätze und Stammkombinationen sind oberhalb des Gels aufgeführt. In der Kontrolle wurde die RNA der Kreuzkultur einer PCR unterzogen, um mögliche DNA-Kontaminationen der RNA auszuschließen.

4.5.3. 3'RACE-PCR zum Bestimmen der Transkriptlänge des *ORF1*-Transkripts

Um die Länge des *ORF1*-Transkripts zu bestimmen, wurde eine 3'RACE-PCR durchgeführt. Auch hier wurde mit dem Oligo-dT-Primer (22) (vergl. Abschnitt 4.3.5. und 4.4.4.) die cDNA synthetisiert und mit dem Oligo-dT-Primer einem spezifischen Primer 10 (Abb.:18b) amplifiziert. Aus der *ORF1*-Sequenz ergaben sich drei mögliche Motive für Polyadenylierungsstellen in den Nukleinsäurepositionen 1507-1512, 1564-1569 und 1704-1709. Das mögliche Stopp-Signal des *ORF1*-Gens befindet sich an der Position 1509-1511 und überlagert somit mit der Polyadenylierungsstelle in der Positionen 1507-1512. Die 3'RACE-PCR ergab ein 380 bp *ORF1*-Fragment (Abb.:35). Aufgrund dieser Fragmentlänge ist das Nutzen der Polyadenylierungsstelle an der Position 1704-1709 am wahrscheinlichsten.

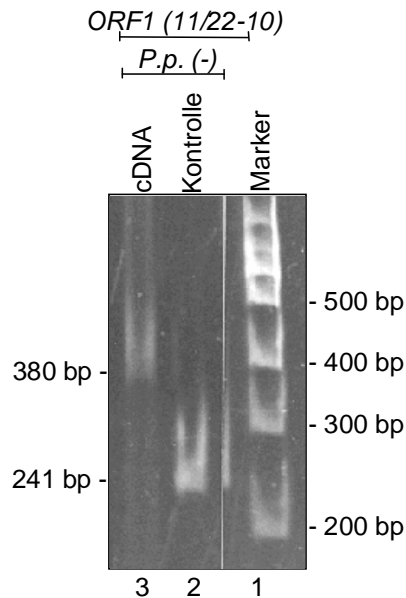


Abb.35: 3'RACE-PCR mit *ORF1* spezifischen Primern. Die Ansätze und Stammkombinationen sind oberhalb des Gels dargestellt. Für die cDNA Synthese wurde der Oligo-dT-Primer verwendet. In der PCR wurden die Primer 10 und der Oligo-dT-Primer für die cDNA (Spur 3) und die Primer 10 und 11 (Spur 2) (Abb.:18b) für die Amplifikation der genomischen DNA des (-)-Kreuzungstyps eingesetzt. Die Amplifikate wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

4.6. Charakterisierung des *HSP*-Gens

4.6.1. Das *HSP*-Gen existiert als einfache Kopie in beiden Kreuzungstypen

Um die Anzahl der *HSP*-Gene im Genom von *Parasitella parasitica* zu bestimmen, wurden Southern-Analysen durchgeführt. Dafür wurde mit einem radioaktiv markierten 389 bp PCR-Fragment hybridisiert, das durch die Amplifikation mit den Primern 20 und 21 hergestellt worden war (Tab.:2). Dieses Fragment enthielt den 5'-Bereich der kodierenden Region des putativen *HSP*-Gens. Die genomische DNA beider Kreuzungstypen (FSU 387/ FSU 388) wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III, *Pst*I, *Eco*RI und *Bam*HI geschnitten (Abb.:36a und b, Spuren 1-5) und stringent hybridisiert. In beiden Kreuzungstypen wurde ein starkes Hybridisierungssignal erhalten, das Gen liegt demnach sowohl im (+)-Kreuzungstyp (Abb.: 36a) als auch im (-)-Kreuzungstyp (Abb.: 36b) in einer Kopie im Genom vor. Im (+)-Kreuzungstyp ergaben sich weitere schwache Hybridisierungssignale, die möglicherweise auf Kreuzhybridisierungen mit anderen *HSP*-Genen zurückzuführen sind.

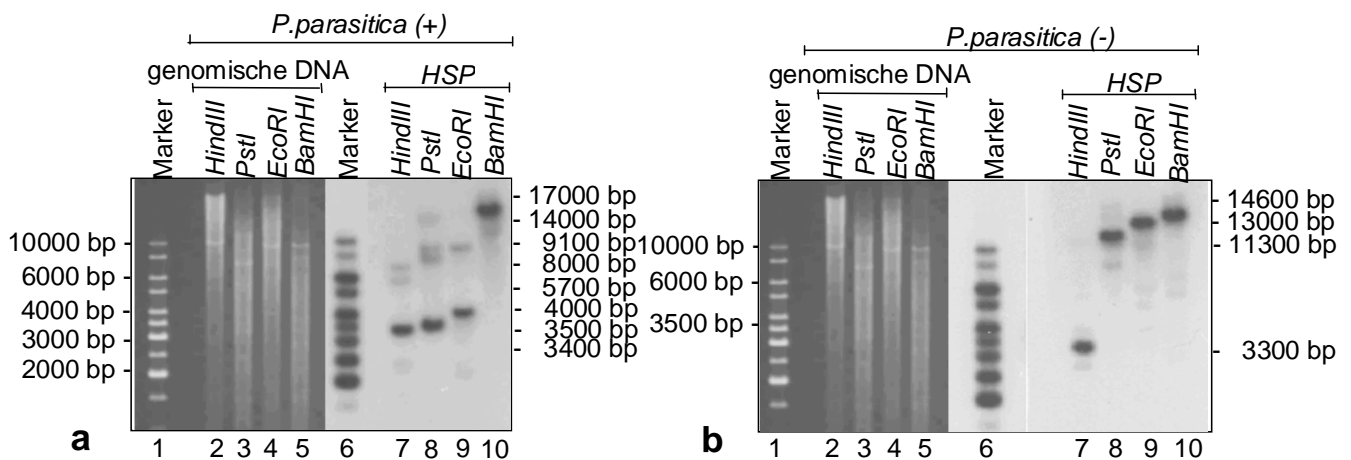


Abb.36: Southern-Hybridisierung genomischer DNA von (a) *P. parasitica*(+) (FSU387) und (b) *P. parasitica*(-) (FSU388) mit einem radioaktiv markierten *HSP*-PCR-Fragment. 1µg genomische DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *Hind*III, *Pst*I, *Eco*RI und *Bam*HI geschnitten und auf einem 0.8%igem Agarosegel aufgetrennt [(a) und (b) Spuren 2-5]. In beiden Kreuzungstypen wurde ein starkes Hybridisierungssignal erhalten[(a) und (b) Spuren 7-10]. In den Spuren 7-10 werden weitere schwache Hybridisierungssignale erhalten, die auf mögliche Kreuzhybridisierungen mit weiteren *HSP*-Genen zurückzuführen sind.

4.6.2. Northern-Analysen ergaben zwei Transkriptgrößen für das *HSP*-Gen

Um zu prüfen, ob und unter welchen Bedingungen die *HSP*-Gene der unterschiedlichen Kreuzungstypen transkribiert werden, wurden Northern-Hybridisierungen durchgeführt. Dafür wurden zwei unterschiedliche Präparationen RNA verwendet. Die RNA-Präparation wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der sexuellen Reaktion zwischen den beiden Kreuzungspartnern durchgeführt. Erstens wurde RNA in einem frühen Stadium des sexuellen Prozesses isoliert, in welchem die Hyphen der unterschiedlichen Kreuzungspartner gerade miteinander in Kontakt getreten waren (Abb.:37a). Die zweite Präparation enthielt RNA, die dann isoliert wurde, als die typischen sexuellen Strukturen bereits ausgebildet worden waren (Abb.37b). Im frühen Stadium (Abb.: 37a) konnte eine starke Expression des *HSP*-Transkripts mit einer Länge von 3200 nt für den (-)-Kreuzungstyp erhalten werden (Abb.: 37a; Spur 7), wohingegen dieses Transkript im (+)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur schwächer exprimiert wurde (Abb.: 37a; Spur 6, 8). Ein weiteres Hybridisierungssignal mit 2300 nt war in Einzelkulturen und Kreuzkulturen schwach ausgeprägt. Im Spätstadium tritt nur das kleine Transkript auf. Entsprechende Signale fanden sich im (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur.

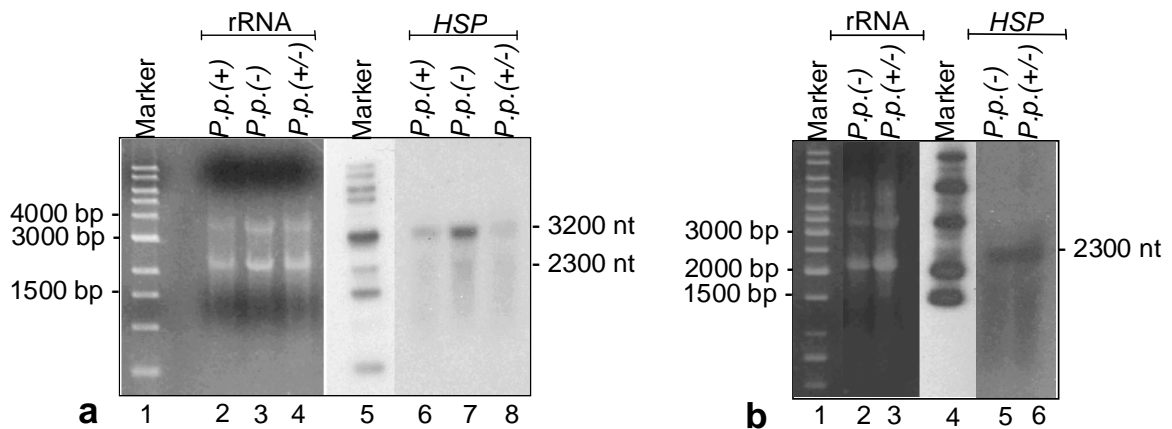


Abb.37: Expression des *HSP*-Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten im sexuellen Prozess in *P. parasitica* (+) (FSU387), *P. parasitica* (-) (FSU388) und in der Kreuzkultur. 7µg gesamt-RNA wurden mit Glyoxal-DMSO denaturiert (Abschnitt: 3.5.2.) und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt [(a) Spuren 2-4 und (b) Spuren 5-6]. Die Hybridisierung wurde mit einem 389 bp PCR-Fragment, das den kodierenden Bereich der 5'-Region des *HSP*-Gens enthielt, durchgeführt. **(a) Northern-Analyse des *HSP*-Gens in einem Frühstadium der sexuellen Entwicklung.** Die Hybridisierung ergab zwei Transkripte der Längen von 2300 und 3200 nt. **(b) Northern-Hybridisierung des *HSP*-Gens im Spätstadium der sexuellen Entwicklung.** Ausschließlich das Transkript der Länge von 2300 nt wurde im (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur erhalten.

4.6.3. (-)-Kreuzungstyp-spezifische Expression des *HSP*-Gens während der sexuellen Interaktion

Für die RT-PCR-Analysen wurde die RNA des Spätstadiums verwendet. Für die cDNA-Synthese wurde der Primer 21 eingesetzt. Die Primer 20 und 21 wurden für die Amplifikation eines 335 bp cDNA-Fragments bzw. eines 393 bp genomischen DNA-Fragments verwendet (Tab.:2). Die RT-PCR ergab während der sexuellen Interaktion beider Kreuzungstypen deutliche *HSP*-cDNA-Fragmente (Abb.: 38, Spur 8). Schwache *HSP*-Fragmente wurden im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp und (Abb.: 38, Spur 6). keine *HSP*-Fragmente im unstimulierten (+)-Kreuzungstyp erhalten (Abb.:38, Spur 4). Die Menge an cDNA-Fragmenten während der sexuellen Reaktion lässt auf eine starke Expression des *HSP*-Gens in diesem Prozess schließen. Da geringe Mengen an *HSP*-Fragmenten im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp und keine im (+)-Kreuzungstyp erhalten worden waren, kann von einer (-)-kreuzungstyp-spezifischen Expression des *HSP*-Gens ausgegangen werden.

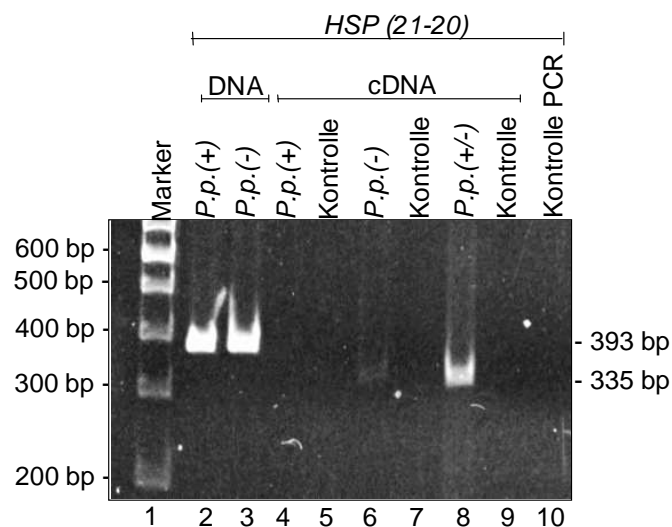


Abb.38: Expressionsanalyse des *HSP*-Gens während der sexuellen Reaktion von *P. parasitica*. Für die cDNA-Synthese wurde der Primer 21 verwendet. In der PCR wurden die Primer 20 und 21 eingesetzt. Zur Kontrolle der Effizienz der PCR wurde genomische DNA des (+)- und des (-)-Kreuzungstyps amplifiziert (Spuren 2-3). Die RT-PCR ergab *HSP*-Fragmente im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur (Spuren 6 und 8). Im unstimulierten (+)-Kreuzungstyp wurden keine *HSP*-Amplifikate erhalten. Das *HSP*-Gen wird (-)-kreuzungstyp-spezifisch exprimiert. Kontrollen: Um zu überprüfen, ob DNA-Kontaminationen der RNA vorlagen, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt, ohne Zugabe der reversen Transkriptase (Spuren 5, 7, 9). Kontrolle PCR: Die Lösungen enthielten ebenfalls keine DNA-Kontaminationen. Die Amplifikate wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

4.6.4. HSP wird ebenfalls abhängig vom Status der parasitischen Interaktion exprimiert

HSP-Fragmente wurden während des sexuellen Prozesses verstärkt gebildet. Um zu überprüfen, ob das HSP-Gen während der parasitischen Reaktionen ebenfalls exprimiert wird, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Dafür wurde RNA aus frühen Stadien kompatibler und nicht kompatibler Parasit-Wirt-Interaktionen isoliert. In Kokultivierungen von Parasit und Wirt des gleichen Kreuzungstyps waren keine bzw. nur sehr geringe Amplifikatmengen des HSP-Gens zu beobachten (Abb.:39, Spur 5, 11). Bei diesen nicht kompatiblen Parasit-Wirt-Interaktionen werden auch keine fertige Sikyosporen ausgebildet. Dem gegenüber traten in Parasit-Wirt-Kombinationen unterschiedlicher Kreuzungstypen das HSP-Fragmente auf (Abb.:39, Spur 7,9). In diesen kompatiblen Kombinationen aus *P. parasitica*- und *A. glauca*-Stämmen werden auch Sikyosporen gebildet. Die RT-PCR-Experimente belegen die Abhängigkeit der Menge an gebildeten HSP-Fragmenten vom Status der parasitischen Interaktion.

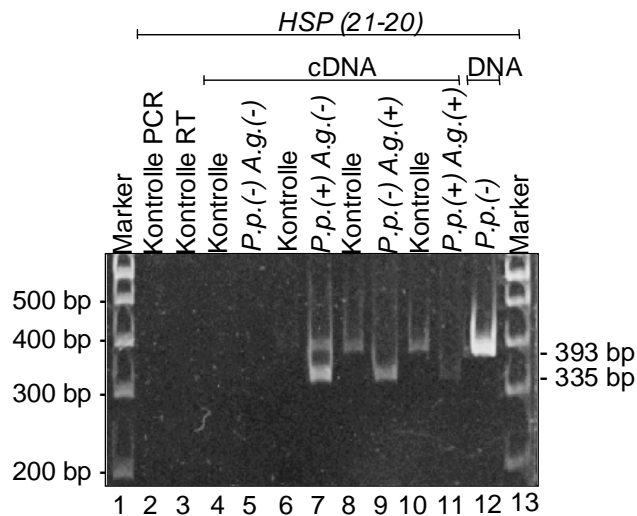


Abb.39: Expressionsanalyse des HSP-Gens während der parasitischen Interaktion von *P. parasitica* mit ihrem Wirt *A. glauca*. Die Stammkombinationen und die Ansätze sind oberhalb des Gels dargestellt. Der Primer 21 wurde für die cDNA-Synthese verwendet. Für die PCR-Reaktion wurden die Primer 20 und 21 eingesetzt. Das cDNA-Amplifikat hat eine Größe von 335 bp und trat in kompatiblen Parasit-Wirt-Kombinationen verstärkt auf. Die 393 bp Bande in den Spuren 7, 8 und 10 ist auf eine DNA-Kontamination der RNA-Präparation zurückzuführen (vergl. Spur 12). Als Kontrolle der PCR-Effizienz wurde genomische DNA des (-)-Kreuzungstyps mit den Primern für 20 und 21 amplifiziert. Keine DNA-Kontaminationen der Lösungen traten auf (Spuren 2 und 3). Alle Amplifikate wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

5. Diskussion

Die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase ist in einem ungewöhnlich kompakten Gencluster lokalisiert

Die Anordnung von Genen in einem Gencluster ist für einige Ascomyceten, wie *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum* (Brakhage, 1998; Martin, 2000), *Gibberella fujikuroi* (Tudzynski *et al.*, 2003), *Fusarium sporotrichioides* (Hohn *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 2002) und *Claviceps purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999) beschrieben worden. In diesen Genclustern stehen die Produkte der Gene häufig in einem funktionellen Zusammenhang. So sind die Gene für die Penicillin-Biosynthese von *P. chrysogenum* (Martin, 2000) oder die Gene für die Gibberellin-Biosynthese von *G. fujikuroi* (Tudzynski *et al.*, 1999) in einem Gencluster organisiert. Dabei sind die Gene in diesen Clustern so angeordnet, dass die Transkripte einander nicht überlappen.

Der Aufbau des *TDH*-Genclusters ist dagegen deutlich kompakter. Der Abstand zwischen den einzelnen Genen des Clusters ist so gering, dass sich die Transkripte zwangsläufig überlagern. Die Anordnung des Gens der 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase und ihrer Nachbargene in einem Cluster könnten regulatorisch begründet sein. Allerdings ist die Frage nach einem funktionellen Zusammenhang der Gene im Cluster noch nicht bearbeitet worden.

Die parasitische Interaktion von *P. parasitica* mit ihrem Wirt *A. glauca* ist gekennzeichnet von horizontalem Gentransfer (Kellner *et al.*, 1993). Die Anordnung von Genen in einem Gencluster könnte hilfreich bei deren Etablierung in einer neuen Umgebung sein (Lawrence & Roth, 1996). Weiterhin ist der Aufbau des *TDH*-Genclusters in Parasit und Wirt unterschiedlich. So sind beispielsweise die Gene *ORF1*, *ORF2* und *ORF3* in *M. mucedo* nicht vorhanden (Petzold, *et al.*, eingereicht zur Publikation).

Die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase ist komplex reguliert

Das *TDH*-Transkript überlagert im 3'-Bereich über mindestens 64 bp den 3'-Bereich des Transkripts für die putative Acyl-CoA-Thioesterhydrolase (*ACT*). Durch Northern- und RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass *TDH* in beiden Kreuzungstypen transkribiert wird, *ACT* aber nur im (-)-Kreuzungstyp. Das *TDH*-Protein ist dagegen ausschließlich im (-)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur nachweisbar. Das *TDH*-Transkript des (+)-Kreuzungstyps wird daher auf einer der folgenden Ebenen nicht

weiter prozessiert oder aktiv entfernt (Abb.:40). Ein denkbarer Mechanismus ist die Antisense-Regulation der *TDH*- und *ACT*-Transkripte. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die gleichzeitige Präsenz überlappungsfähiger Transkripte eine Verminderung der betreffenden mRNAs bewirkt (Prescott & Proudfoot, 2002).

(+)-Kreuzungstyp

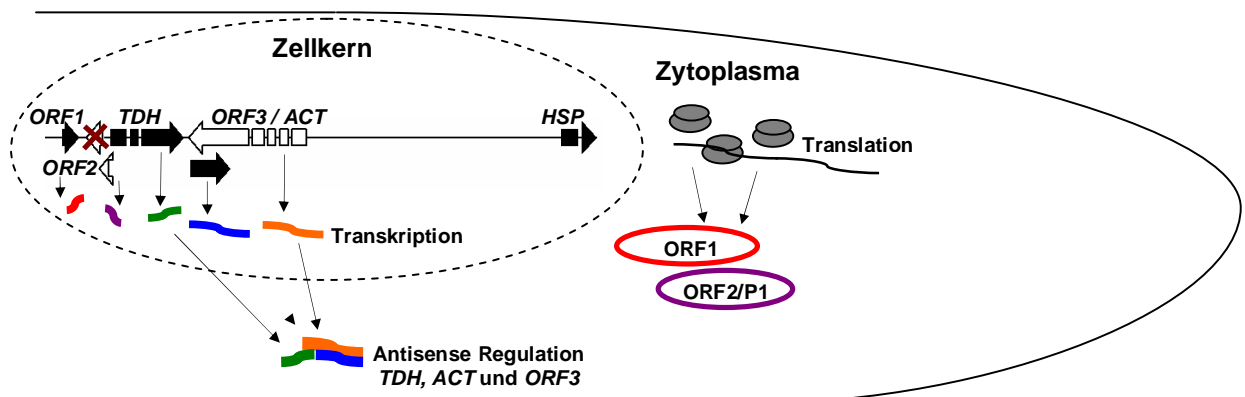


Abb.40: Modell der Genregulation des *TDH*-Genclusters in *P. parasitica*(+) FSU 387. Die Gene *ORF1*, *ORF2*, *TDH*, *ORF3* und *ACT* werden transkribiert, das *HSP*-Gen dagegen nicht. Aufgrund eines möglichen Antisense-Regulationsmechanismus, der die *TDH*-, *ORF3*- und *ACT*-Transkripte umfasst, wäre nur die Translation von *ORF1* und *ORF2* zu erwarten.

Im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp wurde die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase zwar nachgewiesen (Abb.:41), offen bleibt jedoch ob das Enzym hier auch aktiv ist. Hinweise darauf wurden bisher nicht gefunden. Allerdings ist von *M. mucedo* bekannt, dass die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase des (-)-Kreuzungstyps in Abwesenheit des komplementären Kreuzungspartners keine oder eine nur eine sehr geringe Aktivität zeigt (Petzold, *et al.* eingereicht zur Publikation).

Aus der Kreuzkultur isolierte RNA enthält sowohl *TDH*- als auch *ACT*-Transkripte. Dabei wurde das *TDH*-Transkript ausschließlich vom (-)-Kreuzungstyp gebildet. Die Anwesenheit des *ACT*-Transkripts konnte in diesem Fall die Translation von *TDH* zu einem funktionsfähigen Produkt nicht verhindern (Abb.:42). Dies lässt vermuten, dass *ACT* vom (+)-Kreuzungstyp beigetragen wurde. Dies ist allerdings nicht bewiesen. Da die RNA zu einem Zeitpunkt isoliert wurde, in welchem die Kreuzungspartner nicht fusioniert waren, müssten die kreuzungstyp-spezifischen Transkripte in den jeweiligen Kreuzungspartnern lokalisiert sein.

(-)-Kreuzungstyp

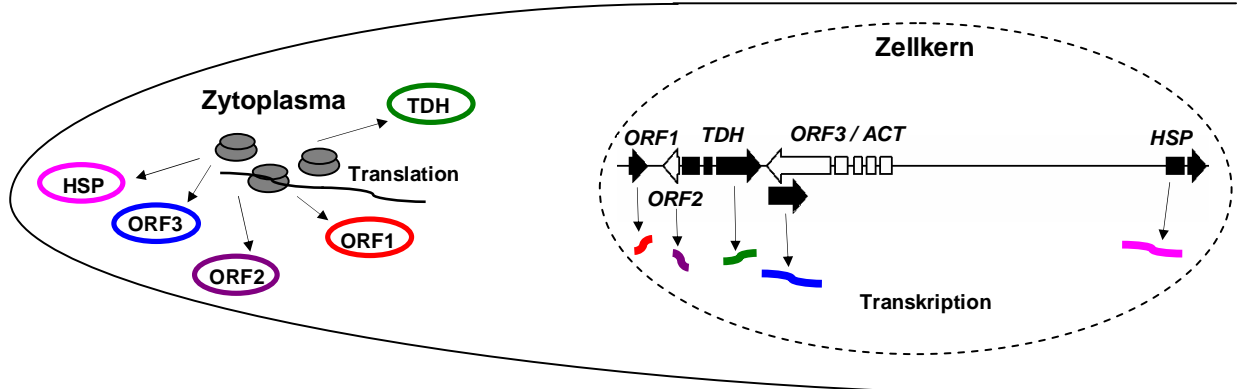


Abb.41: Modell der Genregulation des TDH-Genclusters in *P. parasitica* FSU 388. Die Gene *ORF1*, *ORF2*, *TDH*, *ORF3* und *HSP* werden im (-)-Kreuzungstyp transkribiert. Kein Transkript wurde für das *ACT*-Gen nachgewiesen. Eine Translation der erhaltenen Transkripte ist denkbar. Das TDH-Protein konnte im (-)-Kreuzungstyp von *P. parasitica* bereits nachgewiesen werden- offen bleibt dessen Aktivität.

Eine Wechselwirkung der beiden Transkripte ist aus diesem Grund nicht wahrscheinlich. Auch im (+)-Kreuzungstyp wird *TDH* transkribiert. Da in der Kreuzkultur ausschließlich (-)-spezifische RNA vorliegt, muss die Expression des *TDH*-Gens des (+)-Kreuzungstyps verhindert werden, wie die Promotoranalysen des *TDH*-Gens zeigen, befindet sich 213 Nukleotide aufwärts des *TDH*-Translationsstarts eine mögliche Bindestelle für ein Mcm1-Protein. In *Saccharomyces cerevisiae* aktiviert bzw. reprimiert der Mcm1-Transkriptionsfaktor die Transkription von α -Zelltyp-spezifischen Genen (*MATa*) durch die Interaktion mit weiteren regulatorisch wirkenden Proteinen (Acton, *et al.*, 1997).

Die Aktivität der 4-Dihydromethyltrispurat-Dehydrogenase lässt sich in Kreuzkulturen, im (-)-Partner und im Fusionsbereich zeigen. Die Aktivität des Enzyms in der Fusionszone ist ebenfalls aus *Absidia glauca* und *Mucor mucedo* (persönliche Mitteilung: Dr. Christine Schimek) sowie aus der parasitischen Interaktion bekannt (siehe Abb.: 27b). Eine weitere Synthese von Trisporsäure in der Fusionszone ist daher wahrscheinlich. Eine Funktion der Trisporsäure in diesem Entwicklungsschritt ist nicht bewiesen, erscheint aber denkbar, zum Beispiel bei der Regulation der Morphogenese.

Von *Podospora anserina* (Ascomycet) ist bekannt, dass dessen Pheromone eine wichtige Rolle während der internukleären Erkennung der Kerne und bei der Bewegung zweier Kerne der unterschiedlichen Kreuzungstypen in die ascogene Hyphe spielen (Pöggeler, 2000; Arnaise *et al.*, 1997; Zickler, *et al.*, 1995). In *Schizophyllum commune*

werden die Pheromone auch für die Kernpositionierung im Sekundärmycel verwendet, und damit für die Aufrechterhaltung des dikaryontischen Mycels (Schuurs *et al.*, 1998). Der Aktivität der 4-Dihydromethyltrispurat-Dehydrogenase in der Fusionszone beider Kreuzungspartner könnte allerdings auch durch den Transport des aktiven Enzyms mit dem Zytoplasma des (-)-Kreuzungstyps in die Fusionszone erklärt werden.

Sexuelle Interaktion

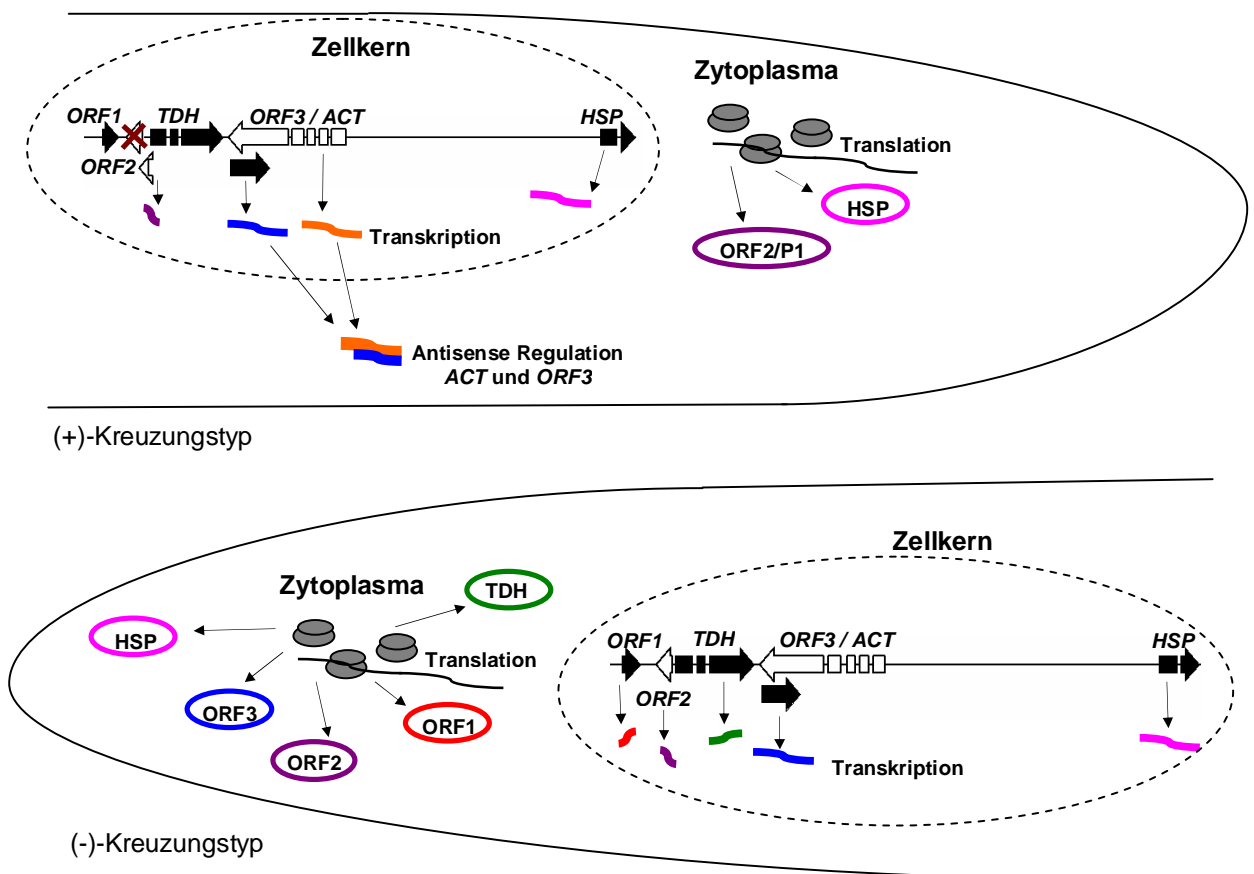


Abb.42: Modell der Genregulation der *TDH*-Gencluster der beiden Kreuzungstypen während der sexuellen Interaktion. Im (+)-Kreuzungstyp werden die Transkripte *ORF2*, *ORF3*, *ACT* und *HSP* gebildet. Die Expression von *TDH*- und *ORF1* wird während der sexuellen Reaktion im (+)-Kreuzungstyp unterdrückt. Die Gene *ORF2/P1*, *ACT*, *ORF3* und *HSP* werden im (+)-Kreuzungstyp transkribiert. *ACT*- und *ORF3*-Transkripte werden jedoch wegen des vermuteten Antisense-Mechanismus im (+)-Kreuzungstyp nicht prozessiert. Ausschließlich die *ORF2/P1*- und *HSP*-mRNAs können translatiert werden. Im (-)-Kreuzungstyp hingegen werden bis auf *ACT* alle Gene des *TDH*-Genclusters transkribiert. Faktoren, die eine Translation verhindern würden, sind nicht bekannt. Das *TDH*-Protein konnte während der sexuellen Interaktion nachgewiesen werden.

Das Transkript der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase überlappt im 5'-Bereich auf 57 bp mit dem 5'-Bereich des entgegengesetzt orientierten *ORF2*-Transkripts. In den Einzelkulturen und in der Kreuzkultur von *P. parasitica* wurden beide Transkripte nachgewiesen. In beiden Kombinationen wird jedoch *TDH*-mRNA translatiert. Obwohl die Transkripte gemeinsam vorkommen, scheinen sie sich nicht zu beeinflussen. In *Dictyostelium discoideum* wurde der Antisense-Mechanismus zur phenotypischen Charakterisierung von Gene benutzt. Dafür wurde *D. discoideum* mit verschiedenen Antisense-Konstrukten transformiert (Martens, *et al.*, 2002). Nicht mit allen Konstrukten konnte jedoch ein Antisense-Regulationsmechanismus erreicht werden.

Die Bedingungen für die RT-PCR-Experimente während der parasitischen Interaktion wurden so gewählt, dass ausschließlich cDNA-Fragmente des Parasiten erhalten wurden. Während der Interaktion eines (-)-Parasiten mit einem (+)-Wirt wird *TDH* transkribiert, *ACT* jedoch nicht. Dieses Expressionsmuster gleicht dem der unstimulierten Einzelkultur von *P. parasitica*(-). Die *TDH*-Aktivität während einer solchen Interaktion konnte ebenfalls gezeigt werden.

Allerdings ändert sich das Expressionsmuster der Gene *TDH* und *ACT* wenn Parasit und Wirt des (-)-Kreuzungstyps kokultiviert werden. In diesem Fall wurden sowohl *TDH*- als auch *ACT*-Transkripte nachgewiesen. Das Expressionsmuster gleicht somit dem des (+)-Kreuzungstyps. Bei einer solchen inkompatiblen Interaktion muss also von einer gegenseitigen Beeinflussung der *TDH*- und *ACT*-Transkripte ausgegangen werden, ähnlich der Situation des unstimulierten (+)-Kreuzungstyps.

Die Regulation der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase und von *ORF3*

Das Transkript der putativen Acyl-CoA-Thioesterhydrolase tritt stets zusammen mit den komplementären Transkripten der Gene *TDH* und *ORF3* auf. Dies wurde in allen Stamm-Kombinationen festgestellt. Das Gen der Acyl-CoA-Thioesterhydrolase überlappt im 3'-Bereich mit dem entgegengesetzt orientierten *TDH*-Gen. Im unstimulierten (+)-Kreuzungstyp werden jeweils die *TDH*- und die *ACT*-Transkripte gebildet, das *TDH*-Protein konnte nicht nachgewiesen werden. Im (-)-Kreuzungstyp und in

Kreuzkulturen wurde das Enzym dagegen gebildet. Eine Regulation in Form eines Antisense-Mechanismus ist denkbar (Abb.:40).

Das *ORF3*-Gen überlappt in entgegengesetzter Orientierung vollständig mit dem *ACT*-Gen. Im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp wurden verstärkt *ORF3*-Transkripte gebildet. Gleichzeitig wird unter diesen Bedingungen *ACT* nicht exprimiert. Sowohl in der Kreuzkultur als auch im unstimulierten (+)-Kreuzungstyp wurden nur wenige *ORF3*-Transkripte gebildet. In diesen Kombinationen lagen *ACT*-Transkripte vor.

Das *ACT*-Transkript erfüllt wahrscheinlich im *TDH*-Gencluster des (+)-Kreuzungstyps die Funktion einer regulatorischen RNA (Abb.:40).

Da im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp verstärkt *ORF3*-Transkripte gebildet werden und unter diesen Bedingungen *ACT* nicht exprimiert wird, bestehen in diesem Fall keine Hinweise auf Antisense-Regulationseffekte. Einer möglichen Translation des *ORF3*-Transkripts steht aus diesem Grunde nichts entgegen. Somit würde es sich bei dem *ORF3*-Protein um ein (-)-kreuzungstyp-spezifisches Protein handeln (Abb.:41).

Da während der parasitischen Interaktion eines (-)-Parasiten mit einem (+)-Wirt *ACT* nicht transkribiert wird, entfällt die mögliche Antisense-Regulation. Das *ORF3*-Transkript könnte daher durchaus translatiert werden. Bei einer inkompatiblen Interaktion eines Parasiten und eines Wirts des (-)-Kreuzungstyps und bei der Interaktion eines Parasiten des (+)-Kreuzungstyps mit einem Wirt des (-)-Kreuzungstyps wurden sowohl *ORF3*- als auch *ACT*-Transkripte erhalten unter diesen Umständen ist mit Antisense-Regulation zu rechnen. Die Translation der beiden Transkripte ist daher unwahrscheinlich.

Die im der RT-PCR-Experiment (Abb.: 30) nachgewiesenen *ACT*- bzw. *ORF3*-Fragmente könnten ebenfalls auf einen möglichen Antisense-Regulationsmechanismus zwischen den beiden Transkripten zurückgeführt werden. Die durch den Antisense-Prozess degradierten *ACT*-Transkripte könnten sich als Primer an die *ORF3*-mRNA anlagern und so zur Amplifikation von partiellen *ORF3*-Fragmenten in der reversen Transkription führen. Diese Amplifikate enthielten die korrespondierenden Antisense-*ACT*-Intron-Sequenzen. Somit würden in der RT-PCR entstandenen cDNA-Fragmente zu erklären sein, die die Intronsequenzen enthielten.

In der parasitischen Interaktion eines Parasiten und eines Wirts des (-)-Kreuzungstyps wird *ACT* transkribiert. Die Analyse des *ACT*-Promotors ergab ausschließlich für den

(-)-Kreuzungstyp 213 Nukleotide aufwärts vom *ACT*-Translationsstart eine mögliche Bindestelle für einen all-trans Retinoidsäure-Rezeptor (RAR-alpha). Die Klasse der Retinsäure-Rezeptoren (RARs) weist drei Isoformen auf, RAR-alpha, RAR-beta und RAR-gamma. Die α -Isoform des Retinoidsäure-Rezeptor (RAR-alpha) reprimiert die Genexpression der Zielgene am stärksten, was auf eine sehr effektive Bindung des Corepressors SMRT zurückzuführen ist (Hauksdottir, *et al.*, 2003). Diese Reprimierung erfolgt allerdings ausschließlich in Abwesenheit des Liganden (Hauksdottir, *et al.*, 2003). Zwar konnte die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp von *P. parasitica* nachgewiesen werden, offen bleibt jedoch deren Aktivität und damit die Möglichkeit die Vorstufe 4-Dihydromethyltrisorat umzuwandeln. Dies wäre jedoch eine Voraussetzung für die Bildung des Sexualhormons Trisorpsäure. Für den unstimulierten (-)-Kreuzungstyp von *Mucor mucedo* ergab sich für die 4-Dihydromethyltrisorat-Dehydrogenase keine oder nur eine geringe Aktivität des Enzyms (Petzold, *et al.*, eingereicht zur Publikation). Dieser Zustand wäre auch für das TDH-Protein von *P. parasitica* denkbar.

ORF1 wird in der Kreuzkultur transkriptional reguliert

ORF1 wird in den unstimulierten Einzelkulturen von *P. parasitica* transkribiert. Die Translation der erhaltenen Transkripte ist wahrscheinlich. Die in der Kreuzkultur erhaltenen *ORF1*-Transkripte werden ausschließlich vom (-)-Kreuzungstyp gebildet, so dass die Expression des *ORF1*-Gens des (+)-Kreuzungstyps während der sexuellen Reaktion unterdrückt wird.

Zwei Transkript unterschiedlicher Länge wurden für das HSP nachgewiesen

Im frühen Stadium der sexuellen Entwicklung von *P. parasitica* konnten zwei unterschiedlich lange *HSP*-Transkripte nachgewiesen werden. Diese Transkripte sind 2300 nt bzw. 3200 nt lang. Das Transkript der Größe von 3200 nt dominiert vor allem im (-)-Kreuzungstyp und ist im (+)-Kreuzungstyp und in der Kreuzkultur nur schwach exprimiert. Das zweite Transkript der Größe von 2300 nt wird in der frühen Phase der sexuellen Entwicklung sowohl in den Einzelkulturen als auch in der Kreuzkultur nur sehr schwach gebildet. Mit Hilfe der Southern-Hybridisierungen wurde in beiden

Kreuzungspartnern unter stringenten Bedingungen nur eine Kopie des *HSP*-Gens nachgewiesen. Folglich könnte das Auftreten der verschieden langen Transkripte in diesem Entwicklungsstadium die Folge von Variationen des Transkriptionsprozesses sein. Eine stadienspezifische Verwendung von alternativen Polyadenylierungsstellen wäre eine Möglichkeit. Ähnliche Vorgänge sind aus Vertebraten bekannt (Edwalds-Gilbert, *et al.*, 1997). Auch im Ascomycet *Saccharomyces cerevisiae* konnte das Auftreten unterschiedlich langer Transkripten von vier verschiedenen Genen während des respiratorischen Wachstums gezeigt werden (Sparks & Dieckmann, 1998). Die Längenvariationen der Transkripte wurden in *S. cerevisiae* ebenfalls auf das Verwenden alternativer Polyadenylierungsstellen zurückgeführt. Dabei konnte die Regulation der unterschiedlich langen Transkripte in Abhängigkeit von der eingesetzten Kohlenstoffquelle gezeigt werden (Sparks & Dieckmann, 1998). Für die Nutzung der alternativen Polyadenylierungsstellen in *S. cerevisiae* wurden zwei Modelle entwickelt. Erstens könnte ein spezifischer Faktor an eine konservierte Sequenz der RNA binden und so die Bindung eines Proteinkomplexes vermitteln, der die Verkürzung der mRNA bewirkt. Im zweiten Modell würde dieser Proteinkomplex direkt an die RNA binden. Dabei wäre das Vorkommen von unterschiedlich langen Transkripten abhängig von der Konzentration dieses Proteinkomplexes. Bei geringen Konzentrationen würde der Proteinkomplex so an die mRNA binden, dass überwiegend lange Transkripte entstehen. Bei hohen Proteinkomplex-Konzentrationen würden überwiegend verkürzte Transkripte gebildet werden (Sparks & Dieckmann, 1998).

***HSP* wird verstärkt während der sexuellen und der parasitischen Interaktion transkribiert**

In der Kreuzkultur liegen im Vergleich mit einzelwachsenden Stämmen verstärkt *HSP*-Fragmente vor. Während der sexuellen Reaktion wird demnach *HSP* verstärkt transkribiert. Drei möglichen Funktionen des *HSP*-Proteins während der sexuellen und parasitischen Reaktionen sowie im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp sind denkbar.

Zum einen könnte die Funktion des *HSP*-Proteins während der sexuellen Reaktion in der Wechselwirkung mit dem Sexualhormon der Zygomyceten, der Trisporsäure, liegen, die in dieser Phase verstärkt gebildet wird. Im Oomyceten *Achlya ambisexualis* sind verschiedene *HSP*-Proteine Teil eines Multiproteinkomplexes (Brunt, *et al.*, 1998 b), der das Sexualhormon der Oomyceten, das Antheridiol, bindet (Brunt, *et al.*, 1998 a). In der

nichtsexuellen Entwicklungsphase werden diese *HSP*-Gene auch nicht exprimiert. Vom Menschen sind vergleichbare Vorgänge bekannt. Die Sexualhormone werden auch hier von einem Multiproteinkomplex gebunden. HSP-Proteine sind Teile dieses Komplexes. Durch die Hormonbindung wird der Multiproteinkomplex zu einem aktiven Transkriptionsfaktor (Pratt & Toft, 1997).

Im unstimulierten (-)-Kreuzungstyp wird *HSP* nur schwach exprimiert. Zweitens könnte das HSP-Protein in diesem Kreuzungstyp die Funktion eines molekularen Chaperons übernehmen. Das HSP-Protein könnte mit dem inaktiven TDH-Protein interagieren. Durch Bindung des HSP-Proteins könnte das TDH-Protein aktiviert werden. Sobald dann das Pheromon des (+)-Kreuzungstyp aufgenommen wird, könnte schnellstmöglich Methyltrisporat und im folgenden Schritt Trisporsäure gebildet werden.

Drittens könnte das HSP-Protein eine weitere Bedeutung bei der parasitischen Reaktion haben. Auch während kompatibler parasitischer Interaktionen werden verstärkt *HSP*-Transkripte in *P. parasitica* gebildet. Von dem Oomyceten *Phytophthora infestans* ist bekannt, dass während des frühen Infektionsstadiums verstärkt *hsp70* und *hsp90* Transkripte gebildet werden (Avrova, et al., 2003). Die *hsp70* und *hsp90* Proteine aus *Phytophthora infestans* sind an der Membranaußenseite lokalisiert, man vermutet, dass sie für die Interaktion mit der Wirtszelle wichtig sind (Avrova, et al., 2003). Das putative HSP-Protein von *P. parasitica* enthält mit 100%iger Wahrscheinlichkeit eine Transmembran-Domäne, die dazu führt, dass das Protein sehr wahrscheinlich an der Membranaußenseite lokalisiert wird. Das HSP-Protein von *P. parasitica* könnte somit möglicherweise ebenfalls für die Parasit-Wirt-Interaktion von Bedeutung sein.

6. Literatur

- Acton, T.B., Zhong, H., Vershon, A.K., 1997. DNA-Binding Specificity of Mcm1: Operator Mutations That Alter DNA-Bending and Transcriptional Activities by a MADS Box Protein. *Molecular and cellular Biology*, 17 (4), 1881-1889.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., Mukherjee, S.K., 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 657-685.
- Altschul, S. F., Madden, T.L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17), 3389-3402.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Stark, G.R., 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (12), 5350-5354.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Parker, B.A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G.R., Wahl, G.M., 1979. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol.* 68, 220.
- Apriletti, J.W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Feng, W., Webb, P., Kushner, P.J., West, B.L., Nilsson, S., Scanlan, T.S., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., 1998. Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 25, S2-S11.
- Arnase, S., Debuchy, R., Picard, M., 1997. What is a bona fide mating-type gene? Internuclear complementation of *mat* mutants in *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 256, 169-178.

Literatur

- Astrom, S.U., Kegel, A., Sjostrand, J.O., Rine, J., 2000. *Kluyveromyces lactis* Sir2p regulates cation sensitivity and maintains a specialized chromatin structure at the cryptic alpha-locus. *Genetics*, 158, 81-91.
- Avrova, A.O., Venter, E., Birch, P.R.J., Whisson, S.C., 2003. Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. *Fungal Genetics and Biology*, 40, 4-14.
- Ayer, D.E., 1999. Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol.*, 9, 193-198.
- Berger, S.L., 2001. Molecular biology. The histone modification circus. *Science*, 292, 64-65.
- Bergman, K., Burke, P. W., Cerdá-Olmedo, E., David, C.N., Delbrück, M., Foster, K. W., Goodell, E.W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, D. S., Shropshire, W., 1969. *Phycomyces*. *Bacteriol. Rev.* 33, 99-157.
- Brachmann, C.B., Sherman, J.M., Devine, S.E., Cameron, E.E., Pillus, L., Boeke, J., 1995. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression and chromosome stability. *Genes Dev.*, 9, 2888-2902.
- Brakhage, A., 1998. Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62,547-585.
- Brunt, S.A., Borkar, M., Silver, J.C., 1998a. Regulation of *hsp90* and *hsp70* genes during antheridiol-induced hyphal branching in the oomycete *Achlya ambisexualis*. *Fungal Genet. Biol.* 24, 310-324.
- Brunt, S.A., Perdew, G.H., Toft, D.O., Silver, J.C., 1998b. *Hsp90*-containing multiprotein complexes in the eukaryotic microbe *Achlya*. *Cell Stress Chaperon.* 3, 44-56.

- Burgeff, H., 1924. Untersuchungen über die Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen. *Bot Abh* 4, 5-135.
- Burmester, A., Czempinski, K. (1994). Sequence comparison of a segment of the gene for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in zygomycetes. *Eur. J. Biochem.* 220, 403-408.
- Burnette, W.N., 1981. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195.
- Chambon, P., 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.
- Czempinski, K., Kruft, V., Wöstemeyer, J., Burmester, A., 1996. 4-dihydromethyl-trisporate dehydrogenase from *Mucor mucedo*, an enzyme of the sexual hormone pathway: purification, and cloning of the corresponding gene. *Microbiol. U.K.* 142, 2647-2654.
- Dorsett, Y., Tuschl, T., 2004. siRNAs: Applications in Functional Genomics and Potential as Therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 318-329.
- Edwards-Gilbert, G., Veraldi, K.L., Milcarek, C., 1997. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res.* 25, 2547-2561.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G., 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005-1016.
- Eslava, A. P., Alvarez, M. I., Burke, P. V., Delbrück, M., 1975. Genetic recombination in sexual crosses of *Phycomyces*. *Genetics* 80, 445-462.

Literatur

- Feinberg, A.P., Vogelstein, B., 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B., 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal. Biochem.* 137, 266-267.
- Freeman-Cook L.L., Sherman, J.M., Brachman, B.B., Allshire, R.C., Boeke, J.D., Pillus, L., 1999. The *Schizosaccharomyces pombe* hst4⁺ gene is a SIR2 homologue with silencing and centromeric functions. *Mol. Biol. Cell*, 10, 3171-3189.
- Geiser, M., Doring, H.P., Wöstemeyer J., Behrens, U., Tillmann, E., Starlinger, P., 1980. A cDNA clone from *Zea mays* endosperm sucrose synthetase mRNA. *Nucleic Acids Res.* 8 (24), 6175-6188.
- Gerard, G.F., 1983. Reverse transcriptase. In: Enzymes of nucleic acid synthesis and modification: DNA enzymes (S.T. Jacob, Hrsg.). *CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp1.
- Glass, C.K., 1996. Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J. Endocrinol.*, 150, 349-357.
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Gene Dev.*, 14, 121-141.
- Glišin, V., Crkvenjakov, R., Byus, C., 1974. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry.* 13, 2633.
- Gooday, G.W., 1978. Functions of trisporic acid. *Phil Trans R Soc Lond B.* 284, 509-520.

Literatur

- Gooday, G.W., 1994. Hormones in mycelial fungi. In: The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality. (Wessels/Meinhardt, Hsrg.) *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, pp 401-411.
- Goulian, M., 1969. Initiation of the replication of single-stranded DNA by *Escherichia coli* DNA polymerase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33. 11.
- Grabe,N., 2002. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol.* 2 (1), S1-1.
- Graessle, S., Loidl, P., Brosch, G., 2001. Histone acetylation : plants and fungi as model systems for the investigation of Histone deacetylases. *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.* 58, 704-720.
- Hauksdottir, H., Farboud, B., Privalsky, M.L., 2003. Retinoic Acid Receptors β and γ Do Not Repress, But Instead Activate Target Gene Transcription in Both the Absence and Presence of Hormone Ligand. *Molecular Endocrinology*, 17 (3), 373-385.
- Hofmann, K., Stoffel, W., 1993. A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 166.
- Hohn,T., McCormick,S., Desjardins,A., 1993. Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthesis genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr. Genet.* 24, 291-295.
- Johnson, D.A., J.W. Gautsch, Spottsman, J.R., Elder, J.H., 1984. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.* 1, 3-8.
- Jones, B.E., Williamson, I.P., Gooday, G.W., 1981. Sex Pheromones in *Mucor*. In Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes. (D.H. O'Day, P.A. Horgen, Hsrg) *Academic Press, New York, London*, pp. 179-197.

- Keller, M., Burmester, A., Wöstemeyer, A., Wöstemeyer, J., 1993. Transfer of genetic information from the mycoparasite *Parasitella parasitica* to its host *Absidia glauca*. *Curr. Genet.*, 23, 334-337.
- Kennedy, S., Wang, D., Ruvkun, G., 2004. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature*, 427 (6975), 645-649.
- Knudsen, S., 1999. Promoter 2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics*. 15, 356-361.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, 305, 567-580.
- Kuo, M.H., Grayhack, F., 1994. A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol. Cell Biol.*, 14 (1), 248-359.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680.
- Lai, C.H., Chou, C.Y., Chang, L.Y., Liu, C.S., Lin, W., 2000. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Cenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res.* 10 (5), 703-713.
- Lavorgna, G., Dahary, D., Lehner, B., Sorek, R., Sanderson, C.M., Casari, G., 2004. In search of antisense. *Trends in Biochemical Sciences*, 29 (2), 88- 94.
- Lawrence, J., Roth, J., 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics*, 143, 1843-1860.

Literatur

- Letunic, I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P., Bork, P., 2004. SMART 4,0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Research*, 32, D142-D144.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randell, R.J., 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265-275.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M., 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., De Weese-Scott, C., Fedorova, N.D., Gerr, L.Y., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Madej, T., Marchler, G.H., Marzumper, R., Nikolskaya, A.N., Panchenko, A.R., Rao, B.S., Shoemaker, B.A., Simonyan, V., Song J.S., Thiessen, P.A., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Bryant, S.H., 2003. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* 31, 383-387.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T., Postlethwait, P., Nellen, W., 2002. RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol. Biol. Cell*, 13, 445-453.
- Martin, J., 2000. Moleculare control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *J. Bacteriol.* 182, 2355-2362.
- Martinez, J., Tuschl, T., 2001. RISC is a 5'phosphomonoster-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18, 975-980.

Literatur

- McMaster, G.K., Carmichael, G.G., 1977. Analysis of single- and double- stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (11), 4835-4838.
- McKenna, N.J., O'Malley, B.W., 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108, 465-474.
- Meister, G., Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 43, 343-349.
- Muscat, G.E., Burke, L.J., Downes, M., 1998. The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13 Δ 1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Re.*, 26, 2899-2907.
- Nakai, K., Horton, P., 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences* 24 (1), 34-35.
- Nelson, P.T., Hatzigeorgiou, A.G., Mourelatos, Z., 2004. miRNP: mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA*, 10, 387-394.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot. Eng.* 10, 1-6.
- Olsen, P.H., Ambros, V., 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* 216, 671-680.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., Birchler, J.A., 2002. RNAi Related Mechanisms Affect Both Transcriptional and Posttranskriptional Transgene Silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell* 9 (2), 315-327.

- Perez-Martin J., Uria, J.A., Johnson, A.D., 1999. Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a SIR2 gene. *EMBO J.*, 18, 2580-2592.
- Perlmann, T., 1996. Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. *Mol. Endocrinol.*, 10 (8), 958-966.
- Pernas-Alonso, R., Morelli, F., de Porzio, U., Perrone-Capano, C., 1999. Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain Research protocols.* 4, 395-406.
- Petzold, A., Burmester, A., Schultze, K., Wolschendorf, F., Wöstemeyer, J., Schimek, C., 4-dihydromethyltrispurate dehydrogenase, an enzyme of the sex hormone pathway, its posttranscriptionally regulated in *Mucor muceddo*. Eingereicht bei *Fungal Genetics and Biology*.
- Pöggeler, S., 2000. Two pheromone precursor genes are transcriptionally expressed in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospore*. *Curr. Genet.*, 37, 403-411.
- Pratt, W.B., Toft, D.O., 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306-360.
- Prescott, E., Proudfoot, N., 2002. Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8796-8801.
- Privalsky, M.L., 2001. Regulation of SMRT and N-CoR corepressor function. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 254, 117-136.
- Reese, M.G., 2001. Application of a time – delay neutral network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.*, 26 (1), 51-56.
- Roth, M.J., Tanese, N., Goff, S.P., 1985. Purification and Characterization of Murine Retroviral Reverse Transcriptase Expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260 (16), 9326-9335.

Literatur

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Quantitation of DNA or RNA. *Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989*. E5-E7.
- Schimek, C., Kleppe, K., Saleem, A., Voigt, K., Burmester, A., Wöstemeyer, J., 2003. Sexual reactions in Mortierellales are mediated by the trisporic acid system. *Mycol. Res.* 107, 736-747.
- Schultz, J., Milptz, F., Bork, P., Ponting, C.P., 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (11), 5857-5864.
- Schuurs, T.A., Dalstra, J.P., Scheer, J.M.J., Wessels, J.G.H., 1998. Positioning of Nuclei in the Secondary Mycelium of *Schizophyllum commune* in Relation to Differential Gene Expression. *Fungal Genetics and Biology*, 23, 150-161.
- Seah, G.T., Rook, G.A.W., (1999). A sensitive, non-radioactive quantitative method for measuring IL-4 and IL-4 δ 2 mRNA in unstimulated cells from multiple clinical samples, using nested RT-PCR, *J. Immunol. Methods*, 228, 139-149.
- Smith, P.K., Krohn, R.T., Hermanson, G.T., 1985. Measurement of Protein using bicinchonic Acid. *Analytical Biochemistry* 150(1), 76-85.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (3), 503.
- Sparks, K., Dieckmann, C. L., 1998. Regulation of poly(A) site choice of several yeast mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 26 (20), 4676-4687.
- Sucov, H.M., Evans, R.M., 1995. Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Mol. Neurobiol.* 10, 169-184.
- Tatusov, R.L., Koonin, E.V., Lipman, D.J., 1997. A Genomic Perspective on Protein Families. *Science* 278, 631-637.

- Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D., Koonin, E.V., 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29 (1), 22-28.
- Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Kiryutin, B., Koonin, E.V., Kryolov, D.M., Mazumder, R., Mekhedov, S.L., Nikolskaya, A.N., Rao, B.S., Smirnov, S., Sverdlov, A.V., Vasudevan, S., Wolf, Y.I., Yin, J.J., Natale, D.A., 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, 4 (41), 1-14.
- Thomas, P.S., 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 (9), 5201-5205.
- Tsai, M.J., O'Malley, B.W., 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 451-486.
- Tudzynski, B., Mihlan, M., Rojas, M., Linnemannströms, P., Gaskin, P., Hedden, P., 2003. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*. *J. Biol. Chem.* 278, 28635-28643.
- Tudzynski, P., Holter, K., Correia, T., Amtz, C., Grammel, N., Keller, U., 1999. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* 261, 133-141.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, R., Pictet, E., Tischer, Rutter, W.J., Goodman, H.M., 1977. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science.* 196, 1313.
- Van den Ende, H., 1968. Relationship between sexuality and carotene synthesis in *Blakeslea trispora*. *J. Bacteriol.* 96, 1298-1303.

Literatur

- van den Ende, H., 1984. Sexual interactions in the lower filamentous fungi. In: Encyclopedia of Plant Physiology, (H.F. Linskes, J. Heslop-Harrison, Hrsg.) 17, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 333-349.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gysi, S., Grewal, S.I.S., Moazed, D., 2004. RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex. *Science*, 303, 672-676.
- Vetter, M., Wöstemeyer, J., Burmester, A., 1994. Characterization of specific cDNA clones of the zygomycete *Parasitella parasitica*, derived from mRNAs which are regulated by the pheromone trisporic acid. *Microbiol. Res.* 149, 17-22.
- Voigt, K., Wöstemeyer, J., 2001. Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1 α genes. *Gene*. 270, 113-120.
- Werkman, B.A., van den Ende, H., 1973. Trisporic acid synthesis in *Blakeslea trispora*. Interactions between plus and minus mating types. *Arch. Microbiol.* 90, 365-374.
- Werkmann, B.A., 1976. Localization and partial characterization of a sex-specific enzyme in homothallic and heterothallic mucorales. *Arch. Microbiol.* 109, 209-213.
- Wöstemeyer J., 1985. Strain-dependent variation in ribosomal DNA arrangement in *Absidia glauca*. *Eur. J. Biochem.* 146(2), 443-448.
- Wöstemeyer, J., Wöstemeyer, A., Burmester, A., Czempinski, K., 1997. Gen transfer from the zygomycete *Parasitella parasitica* to its host: an evolutionary link between sex and parasitism? In: Eukaryotism and Symbiosis (H.E.A. Schenk, R. Herrmann, K.W. Jeon, N.E. Müller, W. Schwemmler, Hrsg) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 145-152.

Literatur

- Wöstemeyer, J., Burmester, A., Wöstemeyer, A., Schultze, K., Voigt, K., 2002. Gene transfer in the Fungal Host-Parasite System *Absidia glauca-Parasitella parasitica* Depends on Infection. In: Horizontal Gene Transfer 2. Aufl. (M. Syvanen, C.I., Kado, Hrsg), *Academic Press, New York, London*, pp. 241-247.
- Yen, P.M., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.*, 81, 1097-1142.
- Zhang, J., Lazar, M.A., 2000. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.*, 62, 439-466.
- Zickler, D., Arnise, S., Coppin, E., Debuchy, R., Picard, M., (1995). Altered mating-type identity in the fungus *Podospora anserine* leads to selfish nuclei, uniparental progeny, and haploid meiosis. *Genetics* 140, 493-503.
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, S.E., 2003. *ARGONAUTE4* Control of Locus-Specific siRNA Accumulation and DNA and Histone Methylation. *Science*, 299, 716-719.

Selbstständigkeitserklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und dass nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Jena, den 03. November 2004

Kornelia Schultze

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kornelia Schultze, geboren am 14.07.1976, dass mir die Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist. Die vorliegende Dissertation „Die Regulation der 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase während der sexuellen und parasitischen Interaktion von *Parasitella parasitica*“ wurde von mir selbstständig angefertigt und es wurden keine anderen außer den angegebenen Hilfsmitteln, persönlichen Mitteilungen und Quellen benutzt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es wurden von mir keine geldwerten Leistungen erbracht, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Dissertation wurde bei dem Fakultätsrat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität Jena und an keiner anderen Stelle zur wissenschaftlichen Prüfung oder zur Dissertation eingereicht.

Jena, den 03. November 2004

Kornelia Schultze

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Frau PD Dr. Anke Burmester und Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer unter deren Betreuung diese Arbeit seit August 2000 am Institut für allgemeine Mikrobiologie und Mikrobengenetik der Friedrich Schiller Universität Jena durchgeführt wurde.

Bei Herrn Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer möchte ich mich für die Möglichkeit diese Dissertation anfertigen zu können, die interessante Themenstellung und seine engagiert Betreuung bedanken.

Bei Frau PD Dr. Anke Burmester möchte ich mich ganz herzlich für die vielen Hilfestellungen, Ratschläge, Anregungen und Diskussionen während der gesamten Arbeit bedanken sowie für die Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen.

Bei Frau PD. Dr. Anke Burmester und Frau Dr. Christine Schimek möchte ich mich ganz herzlich für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Frau Dr. Christine Schimek danke ich für die Durchführung der Aktivitätstests.

Frau PD Dr. Kerstin Voigt danke ich für die Sequenzierungen.

Frank Wolschendorf danke ich für das Überlassen des TDH-Antikörpers.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Allgemeine Mikrobiologie und Mikrobengenetik für das angenehme Arbeitsklima und die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Stellvertretend gilt mein Dank Annett Petzold, Esra Einax und Bärbel Groß.

Und mein ganz besonderer Dank geht an meine Familie.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen:

Kornelia Schultze, Christine Schimek, Johannes Wöstemeyer, Anke Burmester, (2005).
Sexuality and parasitism share common regulatory pathways in the fungus
Parasitella parasitica. (im Druck bei *Gene*)

Petzold, A., Burmester, A., Schultze, K., Wolschendorf, F., Wöstemeyer, J., Schimek,
C., (2005) 4-dihydromethyltrisperate dehydrogenase, an enzyme of the sex
hormone pathway, its posttranscriptionally regulated in *Mucor mucedo*.
(Eingereicht zur Publikation bei *European Fungal Genetics and Biology*)

Vorträge:

VAAM – Tagung: Molekularbiologie der Pilze in Jena (30.9.-3.10. 2001)

Schultze, K., Wöstemeyer, J., Petzold, A. & Burmester, A. Expression analysis of the
sexual hormone pathway in parasitic interactions between the mucoralean fungi
Parasitella parasitica and *Absidia glauca*. Beitrag: Abstrakt-Band Seite 91.

VAAM – Tagung: Molekularbiologie der Pilze in Göttingen (03.09.- 05.10. 2003)

Schultze, K., Wöstemeyer, J., Schimek, C. & Burmester, A. Expression analysis and
genomic organisation of a gene for the sex pheromone synthesis in the
mucoralean mycoparasite *Parasitella parasitica*.

VAAM-Workshop: Stoffwechsel der Pilze in Senftenberg (16.09.-18.09. 2004)

Schultze, K., Schimek, C., Wöstemeyer, J. & Burmester, A., Sexuality and parasitism
share common regulatory pathway in the fungus *Parasitella parasitica*: Regulation
of the 4-dihydromethyltrisperate dehydrogenase.

Buchbeiträge:

Wöstemeyer J., Burmester A., Wöstemeyer A., Schultze K., Voigt K., (2002) Gene
transfer in the fungal host-parasite system *Absidia glauca* – *Parasitella parasitica*
depends on infection. In Horizontal gene transfer, 2nd edn., M. Syvanen, C. Kado
(Hrsg.), Academic Press, San Diego pp. 241-247.

Burmester A., Schultze K., Schimek C., Petzold A., Wöstemeyer J., (2004) Molecular communication in sexual and parasitic life cycles of basal fungal groups. In Micro- and Nanostructures of Biological Systems, H.J. Hein, G. Bischoff (Hrsg.), Shaker Verlag Aachen, pp. 49-65.

Poster:

Beitrag: Botanikertagung 2000 in Jena (17.09.-22.09.2000)

Schultze, K., Wöstemeyer, J. & Burmester, A. Expression analysis of the sexual hormone pathway in parasitic interactions between the mucoralean fungi *Parasitella parasitica* and *Absidia glauca*. Beitragsnummer: P 06-10

Beiträge: VAAM-Jahrestagung in Oldenburg (25.-28.3.2001)

Schultze, K., Wöstemeyer, J. & Burmester, A. Expression analysis of the sexual hormone pathway in parasitic interactions between the mucoralean fungi *Parasitella parasitica* and *Absidia glauca*. Beitragsnummer: PSG01

Burmester, A., Wöstemeyer, J., Schultze, K. Green and blue fluorescent protein as reporter genes for monitoring horizontal gene transfer in parasitic mucoralean fungi. Beitragsnummer: PSG03

Beitrag: VAAM-Tagung Molekularbiologie der Pilze in Jena (30.9.-3.10. 2001)

Burmester, A., Schultze, K., Schimek, C., Wöstemeyer, J. Green and blue fluorescent protein as reporter genes for monitoring horizontal gene transfer in parasitic mucoralean fungi. Beitrag: Abstrakt-Band Seite 17.

Beitrag: Annual meeting of the German Genetics Society (2001 Halle)

Schultze, K., Wöstemeyer, J. & Burmester, A. Expression analysis of the sexual hormone pathway in parasitic interactions between the mucoralean fungi *Parasitella parasitica* and its host *Absidia glauca*.

Beitrag: IMC 7 (International Mycological Conference) (2002 Oslo)

Schultze, K., Wöstemeyer, J., Burmester, A. Analyse of genes involved in sex pheromone biosynthesis and its role in mating reactions and host-parasite interactions in the mucoralean fungi *Absidia glauca* and *Parasitella parasitica*.

Beitrag: ECFG 7 (European conference on fungal genetics) (2004 Kopenhagen)

Schultze, K., Schimek, C., Wöstemeyer, J., Burmester, A., Sexuality and parasitism share common regulatory pathway in the fungus *Parasitella parasitica*: Regulation of the 4-dihydromethyltrisorate dehydrogenase (TDH).

Beitrag: VAAM-Workshop: Stoffwechsel der Pilze in Senftenberg (16.09-18.09.2004)

Schultze, K., Schimek, C., Wöstemeyer, J. & Burmester, A. Sexuality and parasitism share common regulatory pathway in the fungus *Parasitella parasitica*: Regulation of the 4-dihydromethyltrisorate dehydrogenase.