

**Die Rolle zweier $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ binukleärer
Clusterproteine in der sexuellen Entwicklung von
*Aspergillus nidulans***

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



dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kay Vienken
aus Düsseldorf

Marburg/Lahn, Mai 2005

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Mai 2002 bis März 2005 im Laboratorium für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg, am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg und in der Abteilung Angewandte Mikrobiologie der Universität Karlsruhe unter der Betreuung von Prof. Dr. R. Fischer durchgeführt.

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

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Fischer
Zweitgutachter: Prof. Dr. M. Bölker

Tag der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Marburg, Mai 2005

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Originalpublikationen:

Vienken, K., Scherer, M. & Fischer, R. (2005) The Zn(II)₂Cys₆ transcription factor RosA (*repressor of sexual development*) triggers early developmental decisions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.
Genetics, 169(2):619-630

**Toews, M.W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, E.P., Veith, D., Vinuesa, C.,
Vienken, K., Wei, H. & Fischer, R. (2004)** Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination *in vitro* (GATEWAY).
Curr. Genet., 45:883-889

Wei, H., Vienken K., Bunting, S., Weber, R. & Fischer, R. (2004) A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation.
Fungal Genet. & Biol., 41, 148-156

James E. Galagan, Sarah E. Calvo, Christina Cuomo, Li-Jun Ma, Jennifer Wortman, Serafim Batzoglou, Michael Brudno, Su-In Lee, Meray Baştürkmen, Christina Spevak, John Clutterbuck, Vladimir Kapitonov, Jerzy Jurka, Mark Farman, Jonathan Butler, Seth Purcell, Steve Harris, Mark Caddick, Gerhard Braus, Christophe D'Enfert, Sam Griffiths-Jones, Kay Vienken, Arnab Pain, Eric Selker, David Archer, Motoaki Sano, Toshihiro Tanaka, Toshitaka Kumagai, Masayuki Machida, Bill Nierman, David W. Denning, Michael Hynes, Reinhard Fischer, Bruce Miller, Paul Dyer, Matthew S. Sachs, N. Ronald Morris, Stephan A. Osmani, & Bruce Birren. Sequencing and comparative Analysis of *Aspergillus nidulans*.
Nature, *in revision*

Blumenstein, A.⁺, Vienken, K.⁺, Tasler, R.², Purschwitz J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. & Fischer, R. A phytochrome controls development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.
Submitted.

⁺ these authors contributed equally to the paper

Mander, G., Bodie, E, Huaming, W., Wagner, J., Vienken, K., Vinuesa, C., Foster, C., Leeder, A.C., Allen, G., Hamill, V., Jansen, G.G., Dunn-Coleman, N., Turner, G., Nüsslein, B. & Fischer, R. Laccase as a novel, versatile reporter gene for filamentous fungi.
Submitted.

Vienken, K. & Fischer, R. NosA, a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster protein essential for completing the sexual cycle in *Aspergillus nidulans*.
In preparation.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	1
I. Zusammenfassung	2
II. Einleitung	4
1. <i>Aspergillus nidulans</i>	4
2. Die asexuelle Entwicklung	5
2.1 Die „fluffy“-Mutanten	6
2.2 Die Regulationskaskade der asexuellen Entwicklung	7
3. Die sexuelle Entwicklung	9
3.1 Regulation der sexuellen Entwicklung	10
3.2 Der Entwicklungsregulator Pro1, ein Zn(II) ₂ Cys ₆ binukleäres Clusterprotein	13
4. Ziele dieser Arbeit	15
III. Material und Methoden	17
1. Chemikalien und Materialien	17
2. Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden	18
2.1 Organismen	18
2.2 Kultivierung der Organismen	19
3. Genetische Methoden in <i>A. nidulans</i>	21
3.1 Kreuzungen von <i>A. nidulans</i> und Genotypen-Test	22
4. Molekularbiologische Methoden	22
4.1 Plasmide und Cosmide	22
4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	24
4.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i>	24
4.4 DNA Restriktion, Gelelektrophorese und Isolierung aus Agarosegelen	25
4.5 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten und Sequenzierung	25
4.6 Gateway-LR-Rekombinationsreaktion	26
4.7 PCR (und verwendete Oligonukleotide)	26
4.8 Transfektion von <i>E. coli</i>	28
4.9 Transformation von <i>A. nidulans</i>	28
4.10 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot)	30
4.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. nidulans</i>	30
4.12 DNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot-Analyse)	30
4.13 cDNA-Synthese	31
4.14 Konstruktion von DNA-Plasmiden	31

5. Mikroskopische Methoden	34
5.1 Präparation von <i>A. nidulans</i> für die Hellfeld-, Interferenz-, und Phasenkontrastmikroskopie	34
5.2 Epifluoreszenzmikroskopie	34
5.3 Präparation von <i>A. nidulans</i> für die Rasterelektronenmikroskopie	34
6. Proteom-Analyse	35
6.1 Kultivierung der Stämme	35
6.2 Aufschluss des Pilzgewebes	36
6.3 Proteinbestimmung nach Bradford	36
6.4 Zweidimensionale Trennung von Proteinen	37
6.5 Färbung der 2D-Gele mit Silber	38
6.6 Färbung der 2D-Gele mit colloidalen Coomassie-Blau	40
6.7 Färbung der 2D-Gele mit Fluoreszenzfarbstoffen (CyDyes)	40
6.8 Identifizierung der Proteine aus den 2D-Gelen	41
IV. Ergebnisse	42
1. Identifizierung zweier <i>pro1</i>-ähnlicher Gene	
1.1 Sequenzbestimmung und Analyse des ersten <i>pro1</i> -ähnlichen Gens, <i>rosA</i>	43
1.1.1 Proteinsequenzanalyse von RosA	45
1.2 Sequenzbestimmung und Analyse des zweiten <i>pro1</i> -ähnlichen Gens, <i>nosA</i>	45
1.2.1 Proteinsequenzanalyse NosA	46
1.3 Sequenzvergleich der putativen Proteine aus <i>S. macrospora</i> und <i>A. nidulans</i>	47
1.4 Vorkommen von Pro1-ähnlichen Proteinen in unterschiedlichen Pilzen	48
1.5 Sequenzanalyse der putativen Proteine aus verschiedenen Pilzen	49
2. Molekulare Analyse von <i>rosA</i>	51
2.1 Deletionsanalyse von <i>rosA</i>	51
2.1.1 Phänotypische Charakterisierung des $\Delta rosA$ -Stammes	52
2.1.2 Molekulare Analyse der Hüllezellbildung in Flüssigkultur	56
2.2 Überexpression von <i>rosA</i>	57
2.3 Expression eines konstitutiv aktiven <i>fadA</i> -Allels	59
2.4 Expression von <i>rosA</i> während der Entwicklung	60
2.5 Intrazelluläre Lokalisierung von RosA	62
3. Molekulare Analyse von <i>nosA</i>	65
3.1 Intrazelluläre Lokalisation von <i>nosA</i>	65
3.2 Deletion des <i>nosA</i> Gens	66
3.2.1 Untersuchung des <i>nosA</i> -Deletionsstammes	68
3.2.1.1 Komplementation von $\Delta nosA$ im Heterokaryon	68
3.2.1.2 Auswirkung der <i>nosA</i> Deletion in einem <i>veA</i> ⁺ Stamm	69
3.2.2 Einfluss von <i>nosA</i> auf die Hüllezellbildung	73
3.3 Expression von <i>nosA</i>	74
3.4 Untersuchungen zu Genen unter der Kontrolle von <i>nosA</i>	75

3.5	Regulation von <i>nosA</i>	76
3.5.1	Expression von <i>nsdD</i> in einem $\Delta nosA$ -Stamm	76
3.5.2	Regulation von <i>nosA</i> durch <i>rosA</i> in Flüssigkultur	77
4.	Proteom-Analyse	78
4.1	Optimierung der 2D-Gelelektrophorese	79
4.2	Analyse der Proteinmuster	81
V.	Diskussion	88
VI.	Literatur	101
VII.	Anhang	110
	Lebenslauf	116
	Dank	117

Abkürzungsverzeichnis:

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, Fraktion A
CM	Vollmedium (Complete Medium)
$\Delta\lambda_{xy}$	Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von xy nm
DEPC	Diethylpyrocarbonat
GPCR	„G-Protein coupled receptor“
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium
MM	Minimalmedium
OM	osmotisches Medium
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
PEG	Polyethylenglykol
Rnase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffarten („reactive oxygen species“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galaktosid

I. Zusammenfassung

Der filamentöse Ascomyzet *Aspergillus nidulans* ist ein ubiquitär vorkommender Bodenorganismus. Sein homothallischer Lebenszyklus ermöglicht ihm die Bildung von asexuellen und sexuellen Sporen auch ohne Kreuzungspartner. Die asexuelle Entwicklung vollzieht sich in einem kurzen Zeitraum und die asexuellen Sporen, Konidien genannt, können durch Wind und Wasser verbreitet werden. Die Bildung der sexuellen Sporen ist komplizierter und zeitaufwendiger. Die sexuellen Sporen können nach ihrer Reifung viele Jahre im Boden verweilen, bis sie unter günstigen Bedingungen wieder auskeimen. Die Differenzierung einfacher Hyphen zu komplexen Fruchtkörpern, in denen die Prozesse der Karyogamie und Meiose stattfinden, ist sehr energieaufwendig und bedarf großer Umstellungen in den Zellen. Deshalb ist die Fruchtkörperbildung strikt reguliert. Viele äußere Faktoren, wie z.B. das Nährstoffangebot oder Licht entscheiden über die Einleitung der sexuellen Entwicklung. Die Regulierungen und die morphogenetischen Veränderungen des Pilzes während dieses Prozesses sind bisher weitestgehend nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurden zwei putative Transkriptionsfaktoren, *rosA* („repressor of sexual development“) und *nosA* („no sex“), identifiziert und charakterisiert, die einen wichtigen Einfluss auf die sexuelle Entwicklung in *A. nidulans* haben. Beide gehören zu der Familie der Zn(II)₂Cys₆ binukleären Clusterproteine. Im Fall von *nosA* hat sich gezeigt, dass dieser Regulator für die funktionsfähige sexuelle Reproduktion essentiell ist. Die Einleitung der sexuellen Entwicklung ist nicht betroffen, doch bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt stoppt dieser Prozess. Der Effekt der geblockten sexuellen Entwicklung ist nicht 100%ig, da noch in sehr geringen Mengen Fruchtkörper gebildet werden. Diese weisen allerdings nur noch ein Bruchteil der Größe von Kleistothezien eines Wildtyps auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription zweier Gene der sexuellen Entwicklung, *cpeA* und *hxtA*, von *nosA* abhängig ist. Da die Überexpression eines bereits beschriebenen Regulators, *nsdD*, den Effekt der Deletion von *nosA* nicht ausgleichen konnte, wurde geschlossen, dass NosA in der Regulationskaskade NsdD nachgeschaltet ist oder in parallelen Wegen fungiert.

Im Fall des zweiten Transkriptionsfaktors *rosA* wurde gezeigt, dass dieser Regulator als ein Repressor der sexuellen Entwicklung fungiert. Er verhindert die Einleitung der sexuellen Entwicklung in Flüssigkulturen, sowie auf Medien mit niedrigen Glukose-

Konzentrationen. In Flüssigkultur wirkt RosA als ein Repressor der bereits bekannten Regulatoren *veA*, *nsdD*, *stuA* und auch *nosA*. RosA kann im Kern lokalisieren, jedoch wird der Kerneintritt offensichtlich durch eine Region im Mittelteil des Proteins erschwert, bzw. verhindert. Diese Region konnte auf ca. 150 Aminosäuren eingengt werden. Diese Befunde weisen auf eine postranskriptionelle Regulation des Proteins hin.

Neben der Charakterisierung von *rosA* und *nosA* erfolgte ein ungerichteter Ansatz zur Identifizierung von Proteinen, die während der Fruchtkörperbildung differenziell exprimiert werden. Dies geschah mit einem Vergleich von Proteinmustern zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung, jeweils im Wildtyp und zwei Entwicklungsmutanten. Eine der untersuchten Mutanten, die $\Delta nsdD$ -Mutante, bildet nur asexuelle Sporen und es findet keine sexuelle Entwicklung statt. Die zweite Mutante war die in dieser Arbeit charakterisierte $\Delta nosA$ -Mutante, in der die sexuelle Differenzierung zu einem frühen Zeitpunkt stoppt. So war ein Vergleich zwischen früher und später sexueller und asexueller Entwicklung möglich. Zusätzlich konnten potentielle Zielproteine des Regulators NosA gefunden werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese. Es wurden starke Unterschiede in den Proteinmustern der verschiedenen Entwicklungsstadien gefunden. Einige der differenziell exprimierten Proteine konnten mittels Massenspektroskopie identifiziert werden. Darunter befanden sich unbeschriebene Proteine mit einer möglichen Funktion in der Fruchtkörperbildung (z.B. zwei 14-3-3 Proteine). Außerdem fanden sich Proteine, deren Funktion in der sexuellen Entwicklung bereits bekannt ist (CpeA); sowie bereits beschriebene Proteine, deren mögliche Rolle in der sexuellen Entwicklung neu ist (CatB).

II. Einleitung

Die Gattung *Aspergillus* wurde erstmalig im Jahr 1729 durch den italienischen Priester und Mykologen P. A. Micheli beschrieben. Dieser Geistliche gab dem Pilz aufgrund seiner an einen Weihwasserwedel (*Aspergill*) erinnernden Konidiophore den Namen *Aspergillus* (Bennet & Kilch, 1992). Die *Aspergilli* gehören systematisch zu den Ascomykota. Bis heute sind in der Gattung *Aspergillus* über 180 Arten bekannt (Samson, 1992), deren Vertreter ubiquitär vorkommen. Diese treten in vielen Bereichen unseres Lebens auf. So gibt es z.B. pathogene *Aspergillen*, wie *A. fumigatus*, der häufig in klinischen Isolaten als Erreger von Mykosen, besonders bei immunsupprimierten Patienten, identifiziert wird (Richardson & Kokki, 1999). Schädlinge wie *A. flavus* und *A. parasiticus* als Erzeuger des hochkanzerogenen Aflatoxin, sind für die Kontamination von großen Mengen an Getreide, Nüssen und Mais verantwortlich (Creppy, 2002). Einige Arten werden auch vom Menschen genutzt, wie *A. oryzae* bei der Fermentation von Soja, und *A. niger* als Produzent von organischen Säuren wie Glukon- und Zitronensäure, und α -Amylasen für die Backindustrie. Die meisten Arten nutzen den Boden als Lebensraum, und sind gut an die dort typischen Schwankungen der Bedingungen angepasst. Ihre hervorragende Anpassung an verschiedene Lebensbedingungen findet Ausdruck in ihrem unerwünschten Vorkommen in Zellkulturen, Getreidelagern und (fast) jedem Kühlschrank. Sogar auf der Raumstation MIR waren sie vor ihrer Außerbetriebnahme zu finden (Makimura et al., 2001).

1. *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans ist einer der im Boden vorkommenden Vertreter dieser Gattung. Er ist ein weit verbreiteter und ubiquitär vorkommender, saprophytisch lebender Schimmelpilz. Durch seine Fähigkeit sowohl niedermolekulare Substanzen wie Aminosäuren, Zucker oder Alkohole, als auch eine Vielzahl von Polymeren wie Stärke, Chitin, Cellulose oder Keratin zu verwerten, ist *A. nidulans* gut an die verschiedenen Ansprüche und an seine sehr variable Umwelt angepasst. Aber nicht nur der Metabolismus zeichnet sich durch Variabilität aus, auch die Vermehrungsstrategien dieses Ascomyzeten sind flexibel. *A. nidulans* hat einen vollständigen, holomorphen Lebenszyklus (sexueller und asexueller Zyklus), und ist zudem homothallisch, d.h. er kann den sexuellen Zyklus sowohl mit, als auch ohne Kreuzungspartner durchlaufen. Der systematisch korrekte Name *Emericella nidulans*, der den Pilz von den rein asexuell beschriebenen *Aspergillus*-Arten unterscheidet, ist in der Molekularbiologie nicht

geläufig, und wird deshalb in dieser Arbeit nicht benutzt. Seinen Artnamen erhielt *A. nidulans* aufgrund seiner in einem Netzwerk aus Hülle-Zellen sitzenden („*nidulans*“ = der Nistende) sexuellen Fruchtkörper.

A. nidulans breitet sich durch polares Hyphenwachstum aus und kann so neue Substrate besiedeln. Sind die auf diesem Wege erschließbaren Nährstoffressourcen jedoch erschöpft, so können aus den einfach aufgebauten vegetativen Hyphen in kurzer Zeit komplexe Sporenträger, die Konidiophore, gebildet werden. An diesen Konidiophoren entstehen in großer Zahl die asexuellen Sporen, die Konidien. Bis zu 10000 Konidien können an einem Konidiophor hängen. Alternativ dazu können auch große (150 – 300 µm), runde Fruchtkörper, die Kleistothezien, produziert werden, die jeweils bis zu 100000 Ascosporen beinhalten können (Braus et al., 2002).

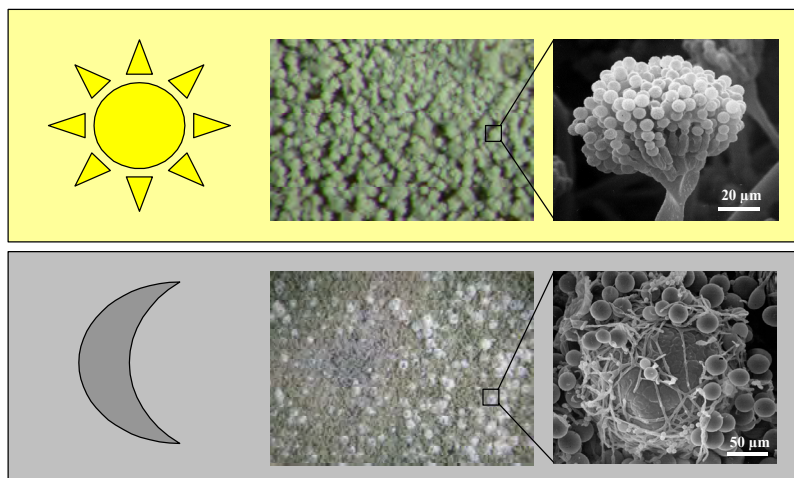


Abb. 1: Die verschiedenen Reproduktionswege von *A. nidulans*. Bei Bestrahlung mit Licht entwickeln sich hauptsächlich asexuelle Sporenträger, die Konidiophore (oben). In Abwesenheit von Licht ist die sexuelle Entwicklung der vorrangige Reproduktionsweg. Die Fruchtkörper, Kleistothezien, sind von einer Schicht Hüllezellen umgeben (unten).

2. Die asexuelle Entwicklung

Um den Differenzierungsprozess der asexuellen Entwicklung durchlaufen zu können, muss die vegetative Zelle eine Entwicklungskompetenz erworben haben. Dies setzt ein Alter von mindestens 20 Stunden voraus (Axelrod et al., 1973). Ausgehend von einer solchen Zelle wird das sogenannte Stielchen gebildet, eine lange vielkernige Hyphe. Dieses Stielchen ist im Gegensatz zu den 2-3 µm großen vegetativen Hyphen 4-5 µm im Durchmesser und erhebt sich bis zu 100 µm über das Substrat. Es schwillt an seinem Ende zu einem Vesikel an. Durch Knospung entstehen die einkernigen primären Sterigmata, die Metulae. Von den Metulae ausgehend, bilden sich wiederum durch Knospung die sekundären Sterigmata, die Phialiden. Durch fortlaufende asymmetrische Zellteilungen bilden die Phialiden lange Ketten von

asexuellen Sporen, die Konidien. Diese grün pigmentierten Sporen besitzen eine hydrophobe Zellwand und können durch Wind und Wasser verbreitet werden, was durch ihre exponierte Lage auf den das Myzel überragenden Konidiophoren, begünstigt wird. Die Konidien ermöglichen es *A. nidulans*, neue Lebensräume zu besiedeln (Adams et al., 1998). In humanpathogenen Pilzen wie *A. fumigatus* dienen diese Sporen als Vehikel, um die Lunge von Patienten zu kolonisieren (Latge, 2001).

2.1 Die „fluffy“-Mutanten

Die asexuelle Entwicklung von *A. nidulans* wird seit über 30 Jahren intensiv untersucht (Clutterbuck, 1969). Voraussetzung für die Induktion der asexuellen Entwicklung ist die Luftexposition der Hyphen. In Flüssigkulturen wird die Induktion weitgehend unterdrückt und Konidiophore werden nur unter extremen Hungerbedingungen gebildet (Skromne et al., 1995). Weiterhin muss das Myzel über einen bestimmten Zeitraum rotem Licht ausgesetzt sein, um zu sporulieren (Mooney & Yager, 1990). Diese Induktion ist allerdings reversibel, der Effekt kann durch Bestrahlung mit langwelligem roten Licht aufgehoben werden. Es wurde vermutet, dass das Lichtsignal ähnlich wie in Pflanzen über ein Phytochrom wahrgenommen wird (Timberlake, 1991). Tatsächlich wurde kürzlich im Genom ein Phytochrom entdeckt und seine Funktion auf die sexuelle und asexuelle Entwicklung untersucht (Blumenstein, 2004). Die Erforschung der genetischen Grundlagen der Konidiophorbildung erfolgte durch die Herstellung von Mutanten, die keine Sporen mehr bildeten oder morphologisch veränderte Entwicklungsstrukturen hervorbrachten (Clutterbuck, 1969; Martinelli & Clutterbuck, 1971). In weiteren Mutationsexperimenten zeigte sich, dass ein Großteil der isolierten Mutanten große Mengen Luftmyzel produzierten und in der Sporenbildung blockiert waren, noch bevor entwicklungspezifische Zelltypen gebildet wurden. Wegen des baumwollartigen Wachstums dieser Mutanten-Kolonien wurden diese Mutanten „fluffy“ genannt. Die molekularbiologische Analyse dieser Mutanten begann erst 20 Jahre später (Adams et al., 1992; Lee & Adams, 1994; Yu et al., 1996). In diesen Arbeiten konnten einige Gene identifiziert werden (*flbA-E*, *fluG*, *fadA*), deren Genprodukte aufgrund des Phänotyps der entsprechenden Mutanten eine Rolle an der Regulation früher Entwicklungsvorgänge zugeschrieben wurde (Adams et al., 1998). Drei von diesen Genen haben bei der Einleitung der Sporulation eine besonders wichtige Rolle. Bei Überexpression von jeweils einem dieser drei Gene (*fluG*, *flbB*, *flbC*) konnte eine artifizielle Sporulation in Flüssigmedium induziert werden (Adams et al., 1998; Lee & Adams, 1994; Wieser et al.,

1994). Dies belegt, dass FluG, FlbB und FlbC zumindest für eine artifizielle Einleitung der asexuellen Entwicklung ausreichen.

fluG nimmt eine besondere Stellung unter den „fluffy“-Genen ein, da das Genprodukt Ähnlichkeit zu einer Glutamin Synthetase hat, was offensichtlich für die Bildung eines niedermolekularen Faktors (< 6000 Da) verantwortlich ist, der für die Einleitung der asexuellen Entwicklung benötigt wird. Dieser Faktor wird in das Medium abgegeben und ist in der Lage Δ *fluG*-Stämme zur Sporulation zu bringen (Lee & Adams, 1994). Die Regulation von Differenzierungsprozessen mit Hilfe von Signalstoffen ist in Pilzen ein verbreitetes Prinzip. So erfolgte kürzlich die Identifizierung eines niedermolekularen Botenstoffes, eines Diterpens namens Conidiogone, welcher die Sporulation in dem Ascomyzeten *Penicillium cyclopium* induziert (Roncal et al., 2002). Möglicherweise ist dieser dem von *fluG* kontrollierter Faktor ähnlich. Die Gene *flbA* und *fadA* kontrollieren das Gleichgewicht zwischen vegetativem Wachstum auf der einen und asexueller Sporulation auf der anderen Seite. *fadA* kodiert die α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins, *flbA* ist ein RGS-Protein („Regulator of G-protein signaling“). In seiner aktiven Form enthält FadA ein gebundenes GTP und sendet Signale für ein proliferierendes, vegetatives Wachstum von *A. nidulans*. *flbA* wirkt als Antagonist, indem es den FadA-Signalweg blockiert und somit die asexuelle Sporenbildung möglich macht (Hicks et al., 1997; Yu, et al., 1996). RGS-Proteine fungieren als negative Regulatoren von G-Protein vermittelten Signalwegen, indem sie die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit stimulieren (Berman et al., 1996; Dietzel & Kurjan, 1987; Xu et al., 1999).

2.2 Die Regulationskaskade der asexuellen Entwicklung

Während der Konidiophorbildung und Sporulation erfolgt die Steuerung der morphologischen Differenzierung durch eine lineare Kaskade von Transkriptionsfaktoren. Nur zwei Gene, *brlA* und *abaA*, sind für die Sporenbildung in *A. nidulans* essentiell, ohne das vegetative Wachstum zu beeinflussen (im Gegensatz z.B. zu einigen „fluffy“-Genen) (Clutterbuck, 1969). Zusammen mit einem dritten Gen, *wetA*, definieren diese drei Faktoren den zentralen Regulationsweg der asexuellen Sporulation um die koordinierte räumliche und zeitliche Expression von sporulationsspezifischer Gen-Expression zu steuern (Boylan et al., 1987; Mirabito et al., 1989). Die Mutation eines dieser drei Gene blockiert die asexuelle Sporulation zu einem spezifischen Zeitpunkt der Konidiophormorphogenese und verhindert die Synthese

einer Vielzahl entwicklungsspezifischer mRNAs (Boylan, et al., 1987; Marshall & Timberlake, 1991; Mirabito, et al., 1989).

brlA kodiert für ein nukleinsäurebindendes Protein mit einem TFIIIA-ähnlichen Zinkfingermotiv (Adams et al., 1990). Die Mutation des *brlA*-Gens blockiert die asexuelle Entwicklung zu einem frühen Zeitpunkt. Nach der Ausbildung des Stielchens stoppt die Entwicklung, die Mutanten sind nicht in der Lage, das Vesikel oder andere konidiophorspezifische Zelltypen auszubilden. *brlA* ist allerdings nicht nur für die Expression von frühen Entwicklungsgenen verantwortlich, sondern wird auch zu späteren Zeitpunkten in der Konidiophorbildung benötigt (Mirabito, et al., 1989). Eine Vielzahl entwicklungsspezifischer Gene, darunter auch *abaA* und *wetA*, werden in *brlA*-Mutanten nicht exprimiert (Boylan, et al., 1987). Die Überexpression von *brlA* in Flüssigkultur führt zu einer artifiziellen Sporenbildung, auch wenn keine vollständigen Konidiophore gebildet werden. *brlA* ist ein zentraler Regulator der asexuellen Entwicklung (Adams et al., 1988).

abaA kodiert für einen Entwicklungsregulator, der während der Entwicklung der Sterigmata am Konidiophorvesikel durch *brlA* aktiviert wird (Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Die Mutation dieses Gens führt zur Ausbildung undifferenzierter Sterigmata am Konidiophor, die oft verzweigt sind aber niemals Sporen hervorbringen (Clutterbuck, 1969; Sewall et al., 1990). Das AbaA-Protein enthält eine sogenannte ATTS-Domäne mit Homologien zu DNA-bindenden Proteinen (Andrianopoulos & Timberlake, 1991; Burglin, 1991). Wie *brlA* ist auch *abaA* für die transkriptionelle Expression vieler Entwicklungsgene erforderlich (Boylan, et al., 1987; Mirabito, et al., 1989). Durch biochemische *in vitro* Methoden konnte eine Konsensussequenz für die Bindung des AbaA-Proteins definiert werden, die unter anderem im Promotorbereich der entwicklungsspezifischen Gene *brlA*, *wetA*, *rodA*, *yA* und *abaA* selbst vorkommen (Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Eine Induktion von *abaA* in Flüssigmedium war im Gegensatz zur Induktion von *brlA* nicht ausreichend, um Konidiosporen zu produzieren, es führt jedoch zur Akkumulation einiger sporulationsspezifischer Gene, wie *wetA* und auch *brlA* (Adams & Timberlake, 1990; Mirabito et al., 1989). Diese Rückkopplung auf Transkriptionsregulationsebene führt somit zu einer sehr starken *brlA* Expression während der Konidiophorbildung.

Der dritte Regulator in der Entwicklungskaskade ist *wetA*. Das *wetA*-Genprodukt wird spät in der asexuellen Sporenbildung für die Synthese von wichtigen Zellwandkomponenten der Konidiosporen benötigt (Marshall & Timberlake, 1991). *wetA*-Mutanten bilden normale Konidiophore, die gebildeten Sporen sind jedoch unpigmentiert und lysieren (Sewall et al.,

1990). Für die korrekte räumliche und zeitliche Expression von *brlA* und *abaA* werden die Gene *stuA* und *medA* benötigt. *stuA*-Mutanten bilden stark verkürzte Konidiophore ohne Metulae und Phialiden aus, so dass die Sporen direkt vom Vesikel gebildet werden (Clutterbuck, 1969). Dieser Phänotyp wird wahrscheinlich durch räumlich inkorrekte Expression der Regulatoren BrlA und AbaA verursacht (Miller et al., 1992). *stuA* kodiert für einen putativen Transkriptionsfaktor mit Ähnlichkeiten in seinem DNA-Bindemotiv zu verschiedenen pilzlichen Regulatoren (Adams, et al., 1998; Gimeno & Fink, 1994), und könnte als Repressor von *brlA* fungieren. Neben seiner Rolle in der negativen Regulation der asexuellen Sporulation, hat *stuA* auch eine wichtige Rolle als positiver Regulator während des sexuellen Vermehrungszykluses von *A. nidulans* und könnte somit für die Koordination der zwei Entwicklungsvorgänge verantwortlich sein (Dutton et al., 1997; Miller et al., 1991; Wu & Miller, 1997). *medA*-Mutationen führen zur Produktion von mehreren Schichten von Sterigmata am Vesikel, die allerdings Konidiosporen bilden können. Oft werden auch sekundäre Konidiophore am Vesikel ausgebildet (Clutterbuck, 1969; Martinelli, 1979). Diese lineare Regulationskaskade ist für die differentielle Expression einer Vielzahl von Genen während der Konidiophorbildung in *A. nidulans* verantwortlich (Adams et al., 1998). Dazu gehören unter anderem Gene, die für die charakteristische dunkelgrüne Pigmentierung der Konidiosporen verantwortlich sind (Aramayo & Timberlake, 1993; Mayorga & Timberlake, 1990), oder für ihre Hydrophobizität benötigt werden (Stringer et al., 1991; Stringer & Timberlake, 1995).

3. Die sexuelle Entwicklung

Der sexuelle Entwicklungszyklus von *A. nidulans* wird in der Abwesenheit von Licht eingeleitet. Diese Bedingungen sind im natürlichen Habitat „Boden“ gegeben, wo eine Verbreitung der asexuellen Konidien durch Wind nicht möglich ist. Der Pilz bildet statt dessen komplexe Fruchtkörper (Kleistothezien), die sexuelle Sporen beinhalten. Diese Sporen können lange im Boden verweilen und noch nach Jahren unter passenden Umweltbedingungen auskeimen. Die Entwicklung beginnt mit der Bildung von Nestern der sogenannten Hülle-Zellen, dickwandiger globulärer Zellen, die über einen kurzen Stiel mit dem vegetativen Myzel verbunden sind. Trotz der massiven Auftretens dieser Zellen in der frühen sexuellen Entwicklung ist die Funktion der Hülle-Zellen noch immer unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass sie die Fruchtkörperbildung eventuell durch die Versorgung mit Nährstoffen unterstützen (Wei et al., 2001; Wei et al., 2004). Etwa 48 Stunden nach Inokulation einer Mediumplatte werden in den Hüllezellnestern liegende Primordien sichtbar,

aus denen sich innerhalb der folgenden 72 Stunden die dunkel gefärbten Kleistothezien entwickeln. Die Hülle dieser Fruchtkörper besteht aus einem dreischichtigen, durch das extrazelluläre phenolische Polymer Kleistin zu einer Einheit verbundenen Hyphen-Netzwerk (Benjamin, 1955). Während des gesamten Entwicklungszeitraums ist das entstehende Kleistothezium von einer Schicht Hülle-Zellen umgeben (Zonneveld, 1977). Die Reifung der meiotischen Ascosporen findet im Inneren des Kleistotheziums statt. Ausgangspunkt ist vermutlich eine einzige dikaryotische Zelle, die aus einer mehrkernigen vegetativen Hyphe hervorgeht. Aus dieser Zelle entsteht ein reich verzweigtes dikaryotisches Myzel (Ward, 1991), das durch die Fusion zweier haploider Kerne in terminalen Zellen die Entwicklung der Asci einleitet. Eine meiotische und eine mitotische Kernteilung führen zur Bildung von acht haploiden einkernigen Ascosporen, die eine weitere Mitose ohne Zellteilung durchlaufen, so dass die Ascosporen zwei Zellkerne beherbergen. Die rot pigmentierten Ascosporen können viele Jahre im Boden überdauern, bevor sie wieder auskeimen (Champe & Simon, 1992; Timberlake, 1990).

3.1 Regulation der sexuellen Entwicklung

Die Einleitung der sexuellen Entwicklung ist von abiotischen und biotischen Faktoren abhängig, wie z. B. der Abwesenheit von Licht, einer Boden-Luft-Interphase und dem Nährstoffangebot. Ein an ein Pheromon erinnerndes System, das die asexuelle und sexuelle Entwicklung koordiniert, hat einen wichtigen Einfluss. Es werden drei sogenannte Psi-Faktoren (*precocious sexual inducer*) beschrieben. Dies sind aus Fettsäuren abgeleitete biologisch aktive Oxylipine. Alle drei Psi-Faktoren haben ein von der Linolensäure abgeleitetes Grundgerüst. PsiB und PsiC stimulieren die sexuelle und hemmen die asexuelle Entwicklung, während PsiA eine entgegengesetzte Wirkung hat (Champe & el-Zayat, 1989; Champe et al., 1987). Diese Ergebnisse konnten kürzlich auf molekularer Ebene durch Untersuchungen an einer putativen Dioxygenase (PpoA) verifiziert werden (Tsitsigiannis et al., 2004). Dioxygenasen sind an der Oxylipin-Synthese beteiligt, und die Deletion dieser Dioxygenase führt zu einem erniedrigten Level von PsiB, was in einer verstärkten asexuellen Entwicklung phänotypisch sichtbar wird. Überexpression von *ppoA* erhöht die Konzentration von PsiB, was gleichzeitig zu einer Verstärkung der sexuellen Entwicklung führt. Eine Möglichkeit wie diese ausserhalb der Zelle liegenden Signale wahrgenommen und weitergeleitet werden können, wurde kürzlich durch Arbeiten mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) untersucht. Heterotrimere G-Proteine und die an sie gekoppelten Rezeptoren sind in Eukaryoten oft an der Weiterleitung von extrazellulären Signalen in die

Zelle beteiligt, wie z.B. die Pheromon-Antwort (Hagen et al., 1986) oder die Glukosewahrnehmung (Kraakman et al., 1999) in *S. cerevisiae*. In *A. nidulans* finden sich insgesamt neun putative GPCR, von denen bisher sechs untersucht wurden (Seo et al., 2004). Zwei von ihnen, *gprA* und *gprB*, Homologe der beiden Pheromon-Rezeptoren Ste2p und Ste3p aus *S. cerevisiae*, zeigen eine abnormale homothallische, sexuelle Entwicklung, also in der Entwicklung ohne Kreuzungspartner. Bei Deletion eines der beiden GPCRs finden sich in der Größe und Ascosporenzahl reduzierte Fruchtkörper. In einer Doppelmutante finden sich keine Kleistothezien (Seo, et al., 2004). Die sexuelle Reproduktion mit einem Kreuzungspartner ist nicht betroffen. Ein weiterer untersuchter GPCR ist *gprD*, das Ähnlichkeiten mit dem Glukose-Sensor Gpr1p aus *S. cerevisiae* aufweist. Eine Deletion dieses Genes führt zu einer starken sexuellen Entwicklung bei gleichzeitiger, drastischer Reduzierung des Hyphenwachstums. Unter Bedingungen, die die sexuelle Entwicklung hemmen, wie z. B. Wachstum auf Sorbitol, ist das Hyphenwachstum wieder normal (Han et al., 2004). *gprD* scheint die sexuelle Entwicklung mit dem Hyphenwachstum zu koordinieren und fungiert dabei als Repressor der sexuellen Entwicklung. Untersuchungen über den Zusammenhang der GPCR und der Psi-Faktoren wurden noch nicht unternommen.

Als frühe Regulatoren des sexuellen Entwicklungsprozesses können die Gene *veA* und *nsdD* bezeichnet werden. Eine Deletion in jedem dieser Gene, verhindert die Fruchtkörperbildung in einem sehr frühen Stadium. Es werden keine Hüllezellnester gebildet, und auch die darauf folgenden Stadien, wie Primordien und Kleistothezien fehlen (Han et al., 2001; Kim et al., 2002). Auch *stuA*, welches gleichzeitig auch die asexuelle Entwicklung steuert, zeigt diesen Effekt (Wu & Miller, 1997). *veA* und *nsdD* Mutanten sind zusätzlich in ihrer Lichtregulation gestört. Demzufolge werden große Mengen an Konidiophoren auch im Dunkeln gebildet. Eine Überexpression dieser beiden Regulatoren induziert die sexuelle Entwicklung auch unter Bedingungen, die diese normalerweise verhindern, wie z.B. Flüssigkulturen und auf Hochsalzmedium (Han, et al., 2001; Kim, et al., 2002).

Eine MAP-Kinase-Kaskade ist auch in der Regulierung der sexuellen Entwicklung beteiligt. Die Deletion der MAPKK Kinase SteC hat unter anderen den Verlust der sexuellen Entwicklung zur Folge, jedoch werden weiterhin noch Hüllezellen gebildet (Wei et al., 2003). Die Deletion der MAP Kinase *sakA* zeigt auch einen Effekt auf die sexuelle Entwicklung, allerdings scheint *sakA* an der Repression beteiligt zu sein, da die *sakA* Mutante mehr Fruchtkörper als der Wildtyp bildet (Kawasaki et al., 2002). Die Beteiligung einer MAP-Kinase-Kaskade an der sexuellen Entwicklung wird nochmals durch den Transkriptionsfaktor SteA unterstrichen, eines am Ende der MAP-Kinase-Kaskade wirkenden Faktors. SteA ist das

Homolog zu Ste12p aus *S. cerevisiae*, dort notwendig für die Karyogamie und Festlegung des Zelltyps (Johnson, 1995; Kurihara et al., 1996). In *A. nidulans* ist SteA für die Entwicklung von Fruchtkörpern, jedoch nicht für die Bildung von Hüllezellen notwendig (Vallim et al., 2000).

Die zentrale Rolle des sexuellen Stadiums in *A. nidulans* zeigt sich nochmals durch die Regulierung durch einen weiteren großen Regulationskomplex. Durch neuere Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen dem COP9-Signalosom und der Fruchtkörperbildung gezeigt werden (Busch et al., 2003). Das COP9 Signalosom besteht aus acht Untereinheiten und ist in höheren Eukaryoten konserviert (Kapelari et al., 2000), seine regulatorische Funktion liegt indirekt (durch Deneddylierung einer Ubiquitin Ligase und Phosphorylierung der Zielproteine) in der Ubiquitinierung von Proteinen. Die ubiquitinierten Proteine werden vom 26S Proteasome abgebaut (Schwechheimer, 2004; Wolf et al., 2003). Die Deletion verschiedener Komponenten (*csnD* und *csnE*) des Signalosoms hat in *A. nidulans* einen pleiotropen Phänotyp, wie z.B. abnormal verkürztes Hyphenwachstum und die Anreicherung von rot gefärbten Sekundärmetaboliten im Myzel. Aber auch die sexuelle Entwicklung ist in den COP9-Mutanten gestört. Es bilden sich zwar noch Hüllezellnester mit Primordien, jedoch ist die Entwicklung danach unterbrochen. Interessanterweise ist diese Entwicklung unabhängig vom Licht (Busch, et al., 2003). Der räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmte Abbau von Proteinen scheint also für die korrekte Regulation der morphologischen Differenzierung der Fruchtkörper notwendig zu sein.

Die Ergebnisse der Forschung mit den verschiedenen Regulationskaskaden (MAP-Kinase Kaskade und COP9 Signalosome) lassen die Vermutung zu, dass nach der Initialisierung der sexuellen Entwicklung weitere Signale für die Bildung von reifen Fruchtkörpern benötigt werden. Ein mögliches Signal könnten ROS („reactive oxygen species“) sein. Durch das Ausschalten einer NADPH-Oxygenase in *A. nidulans* wurde ein Block in der Entwicklung nach der Primordienbildung herbeigeführt. Es konnte gezeigt werden, dass diese NADPH-Oxygenase *noxA* verantwortlich für die Erzeugung von Superoxid ist, vorwiegend in den Hüllezellen und Primordien (Lara-Ortiz et al., 2003). Der Fund der Expression einer Katalase-Peroxidase in den Hüllezellen während der sexuellen Entwicklung (Scherer et al., 2002) deckt sich gut mit diesen Erkenntnissen, denn so ergibt sich die Möglichkeit, diese biologisch aktiven Signalstoffe unschädlich zu machen, bevor sie für den Pilz schädlich werden können.

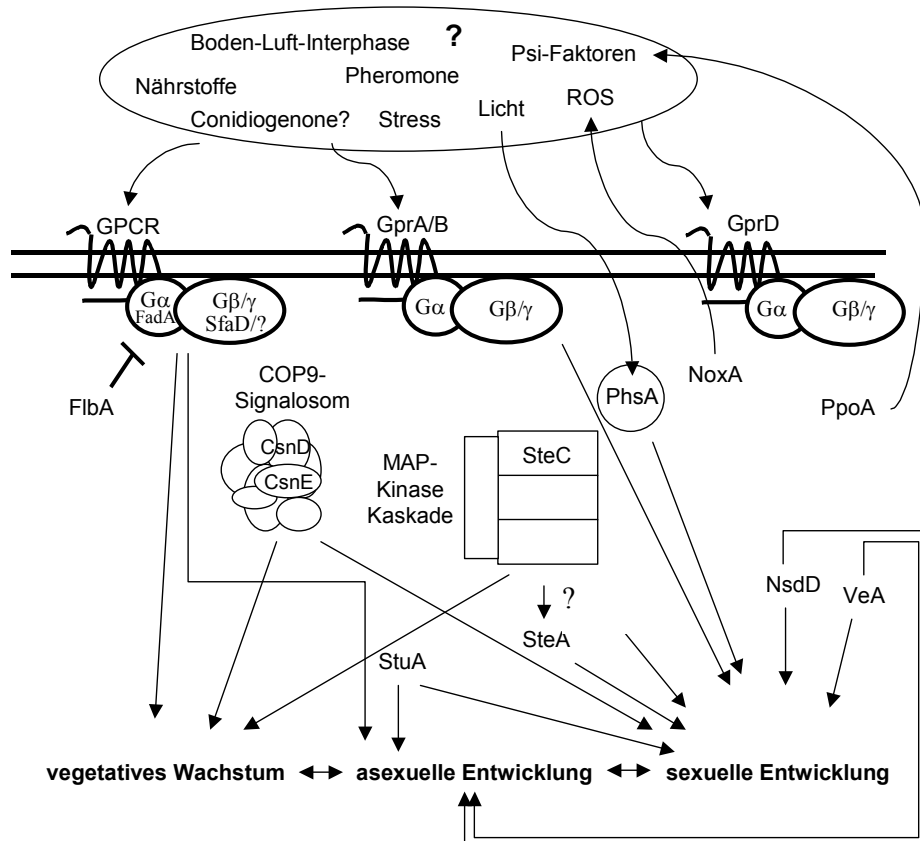


Abb. 2: Schematische Darstellung einiger bisher beschriebenen Faktoren mit Einfluss auf die sexuelle Entwicklung in *A. nidulans*. Einzelne Komponenten verschiedener Regulationswege konnten identifiziert und ihre Beteiligung an der sexuellen Entwicklung gezeigt werden, doch die genauen Regulationswege und –mechanismen sind weitestgehend unverstanden. Eine große Anzahl unterschiedlichster Faktoren haben Einfluss auf die Differenzierungsprozesse im Pilz. Einige davon werden direkt vom Pilz gesteuert (Psi-Faktoren durch PpoA; ROS durch NoxA), andere sind von der Umwelt abhängig. Die Wahrnehmung der Signale wurde durch GPCRs („G-Protein coupled receptors“) und ein Phytochrom bereits gezeigt. Viele andere Möglichkeiten sind denkbar, konnten aber noch nicht bestätigt werden. Die Beteiligung von Komponenten an der Weiterleitung der Signale in der Zelle konnte bisher für G-Proteine, das COP9-Signalosome und eine MAP-Kinase-Kaskade gezeigt werden. Auch einzelne, unabhängige Faktoren, die für die sexuelle Entwicklung notwendig sind, konnten identifiziert werden (NsdD, StuA, VeA). Leider sind so gut wie keine Zusammenhänge zwischen all diesen Faktoren bekannt.

3.2 Der Entwicklungsregulator Pro1, ein Zn(II)₂Cys₆ binukleäres Clusterprotein

In *Sordaria macrospora* wurde ein Transkriptionsfaktor beschrieben, der für die Bildung eines reifen Fruchtkörpers notwendig ist (Masloff et al., 1999). *S. macrospora* gehört wie *A. nidulans* zum Stamm der Ascomycota (Unterstamm der Pezizomycotina), vermehrt sich im Gegensatz jedoch rein sexuell mittels Ascosporen. Die Ascosporen entstehen in Fruchtkörpern (Perithezien) mit einer birnenförmigen Gestalt. Die Perithezienbildung von *S. macrospora* wurde durch zahlreiche Mutanten untersucht (Esser & Straub, 1958). Einige dieser Mutanten wurden bisher molekularbiologisch charakterisiert und die entsprechenden

Gene durch Komplementation kloniert. Eines der Gene kodiert für eine ATP-Citratlyase und ein zweites, *pro1*, für einen Transkriptionsfaktor (Masloff, et al., 1999; Nowrousian et al., 1999). Eine Mutation in dem *pro1*-Gen führt dazu, dass die Entwicklung der reifen Fruchtkörper zu einem frühen Zeitpunkt abbricht, und zwar nach der Bildung der Protoperithezien. In diesem sehr frühen Stadium der Fruchtkörperentwicklung sind noch keine ascogenen Hyphen, oder sogar reife Asci zu finden.

Der Transkriptionsfaktor Pro1 gehört zur Familie der $Zn(II)_2Cys_6$ binukleären Clusterproteine. Diese Familie von DNA-bindenden Transkriptionfaktoren ist bisher nur in Pilzen beschrieben worden, und bis auf einen Fall (in *Lentinus edodes*, Basidiomycet (Endo et al., 1994)) auch nur in Ascomyzeten. Alle genauer untersuchten Proteine dieser Klasse haben regulatorische Funktionen und können je nach Faktor als Aktivatoren oder Repressoren wirken (Bechet et al., 1970; Bowdish et al., 1995; Messenguy et al., 1986; Rubin-Bejerano et al., 1996; Strich et al., 1994; Sze et al., 1993; Sze et al., 1992). Die prominentesten Vertreter sind die Regulatoren Gal4 aus *S. cerevisiae* und AlcR aus *A. nidulans*. In dem annotierten Genom von *Neurospora crassa* finden sich von insgesamt 176 putativen Transkriptionsfaktoren 77 mit diesem Motiv (Borkovich et al., 2004). Mit einem Anteil von 44% an allen theoretischen Transkriptionsfaktoren ist die Gruppe der $Zn(II)_2Cys_6$ binukleären Cluster Proteinen die Größte. In dem annotierten Genom von *A. nidulans* finden sich 123 putative Proteine mit einem $Zn(II)_2Cys_6$ binukleären Cluster Motiv (Gallagan et al., 2005). Auch hier scheinen die sie dominante Familie unter den Transkriptionsfaktoren zu sein. Sechs Cysteine, die in folgender Reihenfolge angeordnet sind; $CX_2CX_6CX_6CX_2CX_6C$ sind charakteristisch. Sie fixieren zwei Zink(II)-Ionen so, dass sich eine kleeblattähnliche Struktur ergibt (Gardner et al., 1991; Pan & Coleman, 1990)(siehe Abb. 3). Dabei interagieren Cys1 und Cys4 mit beiden Zink-Ionen und jeweils zwei der vier übrigen Cysteine interagieren mit einem der Zink-Ionen (Gardner, et al., 1991; Pan & Coleman, 1991). Man kann das Motiv in zwei CX_2CX_6C -Einheiten unterteilen, die durch sechs Aminosäuren getrennt sind. Jede dieser Einheiten bildet eine α -Helix, die durch eine Prolin unterstützte Schleife getrennt wird. Während der Interaktion des Proteins mit der DNA liegt das Zink(II)-Motiv in der großen Furche der DNA (Marmorstein et al., 1992).

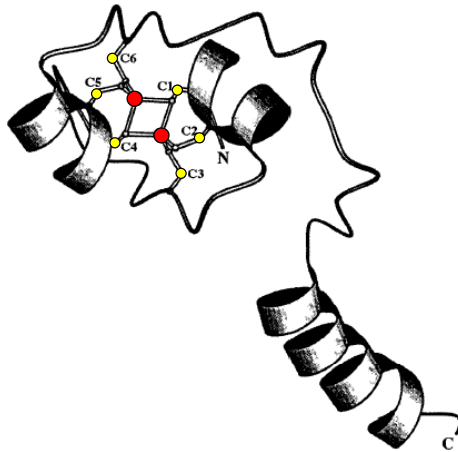


Abb. 3: Modell des GAL4 Proteins als Beispiel für ein $Zn(II)_2Cys_6$ binukleäres Cluster Protein. Die DNA-bindende Domäne befindet sich immer im N-terminalen Bereich der Proteine. Die sechs hoch konservierten Cysteine (C, gelb) fixieren zwei Zinkionen, wobei C1 und C4 mit beiden Zinkionen interagieren. Die räumliche Struktur der DNA-bindenden Domäne entsteht durch zwei kurze α -Helices, die um die Zn-Ionen drapiert sind. Das carboxy- (C) und amino-(N)-terminale Ende des Proteins sind gekennzeichnet. Abbildung verändert aus Todd & Andrianopoulos, 1997.

4. Ziele dieser Arbeit

Die meisten der beschriebenen Regulatoren der sexuellen Entwicklung in *A. nidulans* haben einen pleiotropen Phänotyp, zeigen außer der gestörten Fruchtkörperbildung auch andere Effekte, wie z.B. auf die asexuelle Entwicklung (*stuA*) oder das vegetative Hyphenwachstum (COP9-Signalosome). In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, mit einem reversen Genetik-Ansatz spezifische Regulatoren der sexuellen Entwicklung ohne sekundäre Effekte auf das vegetative Wachstum und die asexuelle Sporulation zu finden.

Da *prol* aus *S. macrospora* für die sexuelle Entwicklung des Pilzes notwendig ist, sollte getestet werden, ob es in *A. nidulans* auch einen solchen Regulator gibt und ob er eine Rolle in der Kleistothezienbildung hat. Deshalb wurde in der Genomsequenz von *A. nidulans* (Whitehead Institute, <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/index.html>) nach sequenzähnlichen Genen gesucht und interessanterweise zwei ähnliche Gene gefunden. Diese wurden nach ihrer funktionellen Analyse *nosA* und *rosA* genannt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden diese beiden putativen Transkriptionsfaktoren auf molekularer Ebene analysiert, und dabei festgestellt, dass *nosA* eine ähnliche Funktion, wie *prol* aus *S. macrospora* hat und für die sexuelle Entwicklung notwendig ist. Auch *rosA* hat eine Funktion in der sexuellen Entwicklung, dessen Funktion jedoch in der Repression des Entwicklungsvorganges liegt.

Zusätzlich zu dem gezielten Ansatz zur Isolierung von Regulatoren, wurde ein ungerichteter Ansatz gewählt, um Proteine, die in der Differenzierung benötigt werden, zu

identifizieren. Dies geschah in einem „Proteom-Ansatz“. Für die Analyse der verschiedenen Differenzierungsstadien wurden Mutanten benutzt, die mit einem Wildtyp verglichen wurden. Alle Stämme wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, welche die sexuelle Entwicklung im Wildtyp induziert. Eine der beiden Mutanten ($\Delta nsdD$) wächst rein asexuell und bildet nur große Mengen an Konidiophoren. In der anderen Mutante ($\Delta nosA$) beginnt die sexuelle Differenzierung, jedoch stoppt dieser Prozess nach der Bildung von Primordien. Zu jeweils zwei Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Zum einen nach 48 Stunden, in der frühen sexuellen Entwicklung, und zum anderen nach 120 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt ist die sexuelle Entwicklung bereits abgeschlossen. Somit war ein Vergleich der Proteinmuster zwischen früher und später sexueller, sowie der asexuellen Entwicklung möglich. Zusätzlich können durch den gewählten Versuchsansatz Proteine identifiziert werden, deren Expression von dem neu identifizierten Transkriptionsfaktor NosA beeinflusst werden.

III. Material und Methoden

1. Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), BIOMOL (Hamburg), AppliChem (Darmstadt), Difco (Augsburg), Gibco (Karlsruhe) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande), andernfalls ist die Herkunft im Text gesondert ausgewiesen. Restriktionsendonukleasen und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden bei Amersham (Freiburg), New England Biolabs (Frankfurt), Die β -D-Glukanase "Glucanex" wurde von GeWe Biotechnologie (Bad Kreuznach). DNA- und RNA-Marker stammten von MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), Nitrocellulosemembranen wurden bei Amersham und Pall Gelman Laboratories (Dreieich), Miracloth-Filtermembranen bei Calbiochem (Heidelberg) und das Blocking-Reagenz „Skim-milk“ bei Difco bestellt. Von Hartmann Analytic (Braunschweig) stammte [α - 32 P]-dATP. Der Protease Inhibitor Cocktail wurde von Sigma-Aldrich (C-6637) bezogen. Die Autoradiographiefilme waren von Fuji (New RX, Fuji, Japan). Für die DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde Agarose Low Melt 3 von AppliChem und das Wizard DNA PCR-Preps-DNA-Purification-System von Promega (Manheim) verwendet. Die Elektrophoresegele wurden mit einem "Duo store" Kamera- und Videoprintergerät (INTAS, Göttingen) fotografiert. Die Fotografie von Kolonien erfolgte mit einer digitalen Kamera (Olympus CAMEDIA C2500L). Alle mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Zeiss Axiophot-Mikroskop durchgeführt. Zur Bildaufnahme diente eine CCD Kamera von Hamamatsu (ORCA ER). Als UV-Lampe wurde eine Osram HBO50 Quecksilberdampf Lampe verwendet.

2. Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden

2.1 Organismen

In dieser Arbeit wurde mit folgenden *Aspergillus nidulans*- und *Escherichia coli*-Stämmen gearbeitet.

Tabelle 1: Genotypen und Herkunft der *A. nidulans* und *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Aspergillus nidulans</i>		
RMS011	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801; veA1</i>	Stringer et al., 1991
SRF200	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1</i>	R. Fischer
FGSC A4	Wildtyp	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, USA
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, USA
Wim126	<i>pabaA1, yA2; veA⁺</i>	S. Champe
KHH52 (<i>ΔnsdD</i>)	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; ΔnsdD::argB; trpC801</i>	Han et al., 2001
SKV1	„Wildtyp“ SRF200 transformiert mit pDC1: <i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1; argB⁺</i>	diese Arbeit
SKV6	RMS011 transformiert mit pKV12 (<i>rosA</i> -Überexpressionskonstrukt): <i>pabaA1, yA2; veA1; alcA(p)::rosA</i>	diese Arbeit
SKV8	SRF200 transformiert mit pKV18 (<i>rosA</i> -Deletionskonstrukt): <i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1; ΔrosA::argB</i>	diese Arbeit
SKV30	SKV8 kotransformiert mit pMut(p)-GFP und pRG1: <i>pyroA4; veA1; ΔrosA::argB; mutA(p)::sGFP</i>	diese Arbeit
SKV31	SRF200 transformiert mit <i>nosA</i> -Deletionskonstrukt: <i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4, ΔnosA::argB; veA1</i>	diese Arbeit
SKV32	<i>ΔnosA::argB; veA⁺</i> ; aus Kreuzung SKV30 x WIM126	diese Arbeit
SKV37	<i>pyrG89; ΔnosA::argB; veA⁺</i> aus Kreuzung SKV30 x WIM126	diese Arbeit
SKV38	<i>pabaA1, pyrG89, yA2; ΔnosA::argB; veA⁺</i> aus Kreuzung SKV30 x WIM126	diese Arbeit
SKV47	SRF200 transformiert mit pKV71: <i>ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1; alcA(p)::GFP::stuA(NLS)</i>	diese Arbeit
SKV48	SRF200 transformiert mit pKV72: <i>ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1; alcA(p)::GFP::stuA(NLS)-rosA²⁹⁴⁻⁴⁴⁹</i>	diese Arbeit
SKV49	<i>ΔnsdD::argB; veA⁺</i> aus Kreuzung KHH52 x SRF200	diese Arbeit
SKV50	<i>ΔnosA::argB; ΔrosA::argB</i> aus Kreuzung SKV8 x SKV38	diese Arbeit
SKV51	SKV31 transformiert mit pHHgfp4: <i>pyroA4, veA1; ΔnosA::argB, hxtA(p)::sGFP</i>	diese Arbeit
SKVw3	<i>ΔrosA::argB; veA⁺</i> aus Kreuzung SKV8 x WIM126	diese Arbeit
SKVw5	<i>ΔrosA::argB; veA⁺</i> aus Kreuzung SKV8 x WIM126	diese Arbeit
SWHHgfp	SRF200 transformiert mit pHHgfp4: <i>ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1; hxtA(p)::sGFP</i>	Wei et al., 2004

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
Top10F ^c	F ^c [lac ^Q , Tn10 Tet ^R] mcrA Δ(mrrr-hsdRMS-mcrBC), Ø80 lacZ ΔM15ΔlacX74, deoR, recA1, araD139 Δ(ara-leu) 7679, galU, galK, rpsL (Str ^R) endA1, nupG	Invitrogen, Leek, Niederlande
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F ⁺ proAB lacI ^Q ZΔM15: Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene Europe, Amsterdam Zuidoost, Niederlande

2.2 Kultivierung der Organismen

Die *E. coli* Medien wurden wie bei Sambrook (1989), beschrieben hergestellt (Tabelle 2) und je nach Versuchsansatz mit Antibiotika und Nachweisreagenzien supplementiert (Tabelle 3).

Die *A. nidulans* Medien wurden wie bei (Pontecorvo et al., 1953) beschrieben, hergestellt. *A. nidulans* Voll- und Minimalmedien wurden je nach Stamm und Versuch mit Vitaminen, Aminosäuren, Nukleotiden bzw. für Transformationsexperimente mit osmoprotektiven Substanzen (Tabelle 4 und 5) komplementiert. Für Festmedien wurden zusätzlich 15 g Agar pro Liter eingewogen.

Tabelle 2: Medien für *E. coli*

Medien	Zusammensetzung (je l)
LB	10 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl ₂ x 7H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 3,6 g Glukose

Tabelle 3: Antibiotika und Nachweisreagenzien für *E. coli* Medien

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin	25 µg/ml
XGal	40 µg/ml
IPTG	8 µg/ml

Tabelle 4: Medien und Zusätze für *A. nidulans*

Medien	Zusammensetzung (je l)
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung; 20 g Glukose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 g Casaminosäuren; 1 ml Vitaminlösung; 1 ml Spurenelementelösung; mit 10 N Natriumhydroxid auf pH ~6,5 eingestellt
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung; 1 ml Spurenelementelösung; 20 g Glukose; mit 10 N Natriumhydroxid auf pH ~6,5 eingestellt; zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 M KCl supplementiert
Salz-Stammlösung (20-fach)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
Vitaminlösung (1000-fach)	0,1 g D-Biotin; 0,1 g Pyridoxin-HCl, 0,1 g Thiamin-HCl; 0,1 g Riboflavin; 0,1 g p-Aminobenzoesäure; 0,1 g Nicotinsäure
Spurenelementelösung (1000-fach)	22 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O; 11 g H ₃ BO ₃ ; 5 g MnCl ₂ x 4H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit Kaliumhydroxidplätzchen auf pH 6,5-6,8 eingestellt

Tabelle 5: Vitamine, Aminosäuren und andere Medienkomponenten

Substanz	Konzentration der Stammlösung	eingesetzte Menge (je l)
Biotin	0,05 %	1 ml
Nicotinamid	0,5 %	1 ml
Pyridoxin-hydrochlorid	0,1 %	1 ml
p-Aminobenzoesäure	0,1 %	1 ml
Riboflavin	0,25 %	1 ml
Arginin	500 mM	10 ml
Uracil	-	1 g
Uridin	500 mM	10 ml
Methionin	1 %	3 ml

A. nidulans- und *E. coli*- Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, aerob bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben auf Schütteltischen (200-300 rpm) gezüchtet.

Medien und Lösungen wurden 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck, Glaswaren und Keramiknutschen im Heizschrank 3 Stunden bei 180°C sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wie Antibiotika, Aminosäuren und Vitamine wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße; Schleicher und Schüll, Dassel).

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei 578 nm (ΔOD_{578}) an einem Pharmacia Photometer (Pharmacia LKB - UltrospecIII) bestimmt.

3. Genetische Methoden in *A. nidulans*

Genetische Untersuchungen bei *A. nidulans* wurden im wesentlichen nach den Protokollen von (Clutterbuck, 1969; Clutterbuck, 1994; Käfer, 1977; Morris, 1976; Pontecorvo, et al., 1953), durchgeführt. In Tabelle 6 sind alle Gene aufgeführt, die in den verwendeten Stämmen mutiert sind und im Text nicht näher erklärt werden.

Tabelle 6: Liste der *A. nidulans* Marker

Marker	Nachweis/Funktion	Chromosom
<i>argB</i>	Arginin-Auxotrophie/ OTCase	III
<i>biA1</i>	Biotin-Auxotrophie	I
<i>methH2</i>	Methionin-Auxotrophie/ THPTG Methyltransferase	III
<i>pabaA1</i>	<i>p</i> -Aminobenzoessäure- Auxotrophie	I
<i>pyrG89</i>	Uracil-Auxotrophie/ Orotidin- MP-Decarboxylase	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxin-Auxotrophie	IV
<i>trpC801</i>	Tryptophan-Auxotrophie/ Phosphoribosylanthranilat- Isomerase	VII
Marker	Nachweis/Funktion	Chromosom
<i>veA1</i>	Konidienbildung lichtunabhängig	VIII
<i>wA3</i>	weiße Konidiosporen/ Polyketidsynthase	II
<i>yA2</i>	gelbe Konidiosporen/ Laccase I	I

3.1 Kreuzungen von *A. nidulans* und Genotypen-Test

Die zu kreuzenden Stämme wurden auf Vollmedium (CM)-Platten nebeneinander angeimpft und zwei Tage inkubiert, bis die Myzelien zusammengewachsen waren. Aus der Schnittstelle beider Kolonien wurde ein kleiner Agarblock ausgeschnitten und auf Minimalmedium(MM)-Platten, die nur ein Wachstum des Heterokaryons erlaubten, überführt. Die Platten wurden mit Klebeband verschlossen und für 10-14 Tage bei 37°C inkubiert. Die nach diesem Zeitraum gebildeten Fruchtkörper (Kleistothezien) wurden mit Hilfe einer sterilen Impfnadel isoliert, auf einer Agarplatte unter dem Binokular durch vorsichtiges Rollen von den an ihn hängenden Hülle-Zellen befreit und in 0,2 ml sterilen Aqua dest. in einem Eppendorf-Cup zerdrückt. Ein Aliquot der Ascosporensuspension wurde auf CM-Platten ausplattiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation konnte die Kreuzung ausgewertet werden. Für die Genotypenbestimmung eines *A. nidulans*-Stammes wurde dieser auf MM-Platten transferiert, auf denen jeweils einer der zu testenden Auxotrophiemarker fehlte. Sollten mehrere Stämme untersucht werden, so wurden diese auf Rasterplatten (20 Kolonien/Platte) angeimpft (Sievers et al., 1997).

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Plasmide und Cosmide

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Plasmiden und Cosmiden gearbeitet.

Tabelle 7: Plasmide und Cosmide

Plasmid/ Cosmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript KS ⁻	Klonierungs- und Expressionsvektor mit hoher Kopienzahl, Amp ^R	Stratagene, Heidelberg
pCR2.1 TOPO	Klonierungsvektor mit 3'T-Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten; hohe Kopienzahl	Invitrogen, Leek, Niederlande
pENTR/D-TOPO	GATEWAY TOPO Vektor, zur Klonierung von Blunt End-PCR-Produkten	Invitrogen, Leek, Niederlande
pMT-sGFP	GATEWAY Vektor, <i>alcA(p)::cccD</i> -Box (incl. <i>attR</i> -sides):: <i>sgfp</i>	Toews et al., 2004
pDC1	<i>argB</i> -Gen aus <i>A. nidulans</i> tragendes Plasmid	Aramayo et al., 1989
pRG1	<i>pyr4</i> -Gen beinhaltendes Plasmid, <i>pyr4</i> aus <i>Neurospora crassa</i>	Waring et al., 1989
pHHgfp4	2,5 kb Fragment des HxtA-Promotors, fusioniert mit <i>sgfp</i> in pKS ⁻ (<i>EcoRV</i> , <i>NotI</i>)	Wei, et al., 2004

Plasmid/	Beschreibung	Referenz
Cosmid		
pHW	<i>argB</i> aus pDC1 in pKS-Bluescript	H. Wei, Marburg
pMut(p)-GFP	1,8 kb Fragment des MutA-Promotors, fusioniert mit <i>sgfp</i> in pKS ⁻ (<i>EcoRV</i> , <i>NotI</i>)	Wei et al., 2001
pJH19	<i>gpd(p)::dsRedT4-stuA(NLS)</i> , <i>argB</i>	Toews, et al., 2004
pMS19	<i>gpd(p)::nsdD</i> , <i>pyr4</i>	M. Scherer, Marburg
pMS51	PCR (Expand)-amplifiziertes <i>rosA</i> mit <i>XhoI</i> -Schnitten in pCR2.1	M. Scherer, Marburg
pSK70	<i>argB</i> mit <i>SfiI</i> -Schnittstellen	S. Konzack, 2004
pCMB17apx	<i>alcA(p)::egfp</i> , <i>pyr4</i> für N-terminale Fusion von GFP an Zielprotein, <i>N. crassa pyr4</i>	V. Efimov (Piscataway, USA)
42D6	Cosmid aus pUI-Genbank mit <i>rosA</i>	diese Arbeit
pKV8	<i>alcA(p)</i> in <i>BamHI</i> , <i>argB</i> in <i>NotI</i> in pKS ⁻ -Bluescript	diese Arbeit
pKV12	<i>alcA(p)::rosA</i> , <i>argB</i> ; <i>rosA</i> aus pMS51 mit <i>XhoI</i> in pKV8	
pKV15	<i>KpnI/XbaI</i> -Subklon von <i>rosA</i> aus 42D6 in pBluescript KS ⁻	diese Arbeit
pKV18	<i>argB</i> aus pHW mit <i>EcoRI/BamHI</i> in pKV15, KO-Konstrukt	diese Arbeit
pKV43	<i>nosA</i> ca. 1kb der 3' Flanke mit <i>SfiI</i> -Schnittstelle in pCR2.1	diese Arbeit
pKV45	<i>nosA</i> ca. 1kb der 5' Flanke mit <i>SfiI</i> -Schnittstelle in pCR2.1	diese Arbeit
pKV46	<i>nosA</i> -Deletionskonstrukt; 3' Flanke aus pKV43 mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i> ausgeschnitten und zusammen mit <i>argB</i> aus pSK70 und pKV45 ligiert	diese Arbeit
pKV47	<i>rosA(Aa1-294)</i> von genom. DNA mit <i>AscI/PacI</i> -sites amplifiziert in pCR2.1	diese Arbeit
pKV48	<i>alcA(p)::GFP-rosA(Aa1-294)</i> aus pKV47 mit <i>AscI/PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pKV49	<i>rosA(Aa1-713)</i> von genom. DNA mit <i>AscI/PacI</i> -sites amplifiziert in pCR2.1	diese Arbeit
pKV50	<i>alcA(p)::GFP-rosA(Aa1-713)</i> aus pKV49 mit <i>AscI/PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pKV51	<i>nosA</i> (ATG-kurz vor Stopp) in pENTR/D TOPO	diese Arbeit
pKV52	<i>alcA(p)::nosA-sgfp</i> , <i>argB</i> , <i>nosA</i> aus pKV52 per GATEWAY in pMT-sGFP	diese Arbeit
pKV57	<i>alcA(p)::GFP-rosA(Aa1-642)</i> ; pKV50 mit <i>PstI</i> geschnitten, religiert	diese Arbeit
pKV58	<i>alcA(p)::GFP-rosA(Aa1-449)</i> ; pKV50 mit <i>BglIII</i> geschnitten, religiert	diese Arbeit
pKV59	<i>rosA(As 1-80)</i> mit <i>AscI/PacI</i> -sites amplifiziert in pCR2.1 TOPO	diese Arbeit
pKV60	<i>rosA(As 1-80)</i> mit <i>AscI/PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pKV68	<i>rosA(As 294-449)</i> mit <i>PacI</i> -sites amplifiziert in pCR2.1 TOPO	diese Arbeit

Plasmid/ Cosmid	Beschreibung	Referenz
pKV69	<i>stuA</i> (NLS) mit <i>AscI/PacI</i> -sites amplifiziert in pCR2.1 TOPO	diese Arbeit
pKV71	<i>alcA(p)::GFP-stuA</i> (NLS), <i>stuA</i> (NLS) aus pKV69 mit <i>AscI/PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pKV72	<i>alcA(p)::GFP-stuA</i> (NLS)- <i>rosA</i> (294-449), <i>pyr4 rosA</i> (294-449) aus pKV68 mit <i>PacI</i> in pKV71	diese Arbeit

4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde in 2 ml Ansätzen wie bei Sambrook (1989) beschrieben oder durch das Wizard™ Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) durchgeführt. Um Plasmid-DNA aus 100 bis 500 ml Ansätzen (Midi- und Maxiprep) zu isolieren, wurde alkalische Lyse nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) verwendet. Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion. Wenn ein höherer Reinheitsgrad erreicht werden sollte, wurden die großen Ansätze mit Nucleobond AX100 oder AX500 der Firma Macherey-Nagel (Düren) aufbereitet und gereinigt. Die Plasmid-DNA Konzentration wird durch Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm in einem Photometer (Gilford, Response) in Quarzküvetten bestimmt. Ein ΔA_{260} von 1 entspricht einer doppelsträngigen DNA-Konzentration von 50 μg pro 1 ml (Sambrook *et al.*, 1989). Zur groben Abschätzung der DNA-Konzentration wurde die Intensität der DNA-Bande mit der Markerbande verglichen.

4.3 Isolierung genomischer DNA aus *A. nidulans*

Um Myzel aus sporenbildenden *A. nidulans* Stämmen zu gewinnen, wurden 20 ml MM mit einer Impföse voll Sporen in einer Petrischale angeimpft und für 12-15 h bei 37°C wachsen gelassen. Das Myzel wurde mit einem Spatel vom Medium getrennt und zwischen Papiertüchern trockengepreßt. Die anschließende Reinigung des Myzels erfolgte mittels des DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden). Um die Qualität und die Ausbeute der genomischen DNA zu testen, wurde ein 1%iges Agarosegel mit 5 μl der DNA-haltigen Lösung beladen.

4.4 DNA Restriktion, Gelelektrophorese und Isolierung aus Agarosegelen

Es wurden, soweit im Text nicht anders angegeben, Restriktionsverdau mit 20 μ l Gesamtvolumen angesetzt, die 0,5 μ l oder 1 bis 20 U/ μ l Restriktionsenzym enthielten. Inkubiert wurde für eine Stunde in den vom Hersteller angegebenen Puffern, mit empfohlener Pufferkonzentration. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde es gemäß den Herstellerangaben erhitzt.

Die DNA-Fragmente wurden in 1%igen Agarose-Gelen (Sambrook, 1989) in TAE-Puffer aufgetrennt (40 mM Tris/Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA). Als Größenmarker wurde λ -DNA verwendet, die zuvor mit *Eco*130I geschnitten worden war. Die Gele wurden 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (1 μ g/ μ l) gefärbt, die DNA-Banden unter UV-Licht bei 302 nm nachgewiesen und mit einem Videoprinter aufgenommen.

Wenn DNA-Fragmente aus Gelen isoliert werden sollten, wurden 0,8%ige "low melting" Agarosegele mit DNA beladen. Die DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in einem TAE-Agarosegel getrennt und in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die zu isolierende Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und entsprechend der Vorschrift des Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) präpariert. Alternativ wurde die DNA in gewöhnlichen Agarosegelen aufgetrennt und mit dem QIAEX II Gelextraktionssystem (Qiagen, Hilden) isoliert. Weitere Alternative war die „Freeze squeeze“ Präparation. Die zu präparierende Bande wurde ausgeschnitten und 10 min bei -20°C auf Parafilm eingefroren. Das Gelstück wurde zwischen den Fingern aufgetaut und ein DNA-haltiger Tropfen in ein Eppendorfcup überführt.

4.5 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten und Sequenzierung

Bei der Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten wurden jeweils 3-5 μ g Vektor- und Insert-DNA verdaut. Der Vektor wurde nach dem Verdau mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert. Anschließend wurden die Restriktionsfragmente auf einem low-melting Agarosegel wie oben beschrieben gereinigt und die zu isolierenden Banden ausgeschnitten und nach dem Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) in 100 μ l TE eluiert. Die Insert-DNA wurde mit EtOH gefällt und in Vektor-DNA-Lösung, die ca. 50 ng DNA enthielt, resuspendiert. Zur Bestimmung der Konzentrationen der Vektor- und Insert-DNA wurden 10 μ l auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen und die Konzentrationen im Vergleich zu den Markerbanden abgeschätzt.

Ligationen wurden mit der T4 Ligase (NEB, Frankfurt) bei 16°C über Nacht in einem Volumen von 15 µl durchgeführt. Für die Ligation kohesiver Enden lag das Verhältnis von Vektor zu Insert meistens bei 1:2-3. Für Religationen wurde ein größeres Ligationsvolumen (100 µl) gewählt und die Dephosphorylierung und die Behandlung des Inserts ausgelassen. Zur direkten Klonierung von PCR-amplifizierten „blunt-end“ Fragmenten wurden die Oligonukleotide mit einer Polynukleotid Kinase nach Angaben des Herstellers phosphoryliert. Zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen wurden diese in das Oligonukleotid integriert, so dass die PCR-Produkte unmittelbar geschnitten werden konnten. Alternativ wurden PCR-Fragmente mit dem TOPO Cloning Kit der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) nach den Angaben des Herstellers kloniert.

Sequenzierungen von den DNA-Fragmenten wurden durch einen kommerziellen Anbieter (MWG Biotech, Ebersberg) vorgenommen.

4.6 Gateway-LR-Rekombinationsreaktion

Für die LR-Rekombinationsreaktion wurden 300 ng pENTR-Vektor und 300 ng Destination-Vektor eingesetzt. Beim Einsatz mehrerer Destination-Vektoren in einer LR- Reaktion wurden die Vektoren in gleichen molaren Verhältnissen zueinander eingesetzt. Die LR-Rekombinationsreaktion wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem LR-Rekombinationsmix „Gateway LR Clonase™ Enzyme Mix“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt (Toews, et al., 2004).

4.7 PCR

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde mit Taq-, Pfx-, Pvu- oder Expand-Polymerasen von Amersham oder Gibco nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR der DNA-Fragmente, welche für die Herstellung der pENTR-Vektoren amplifiziert wurden, wurde mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Die Oligonukleotide von MWG (Biotech GMBH, Ebersberg) oder Sigma-Genosys (Steinheim) wurden mit einer Konzentration von 10 pmol (25 bzw. 50 µl) eingesetzt. Es wurden 0,2-20 ng genomische DNA bzw. 10 ng Plasmid-DNA pro Ansatz verwendet. Die PCR Reaktionen wurden mit einem Rapid Cyclor der Firma Idaho Technologie (Hirschmann Instruments GmbH, Neurid) durchgeführt, dessen Programme entsprechend der Anforderung in Polymerisationsdauer und Annealingtemperatur variierten:

Denaturierungstemperatur: 95°C

Polymerisationstemperatur: 68 bis 72°C (je nach Polymerase)

Zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen an PCR-Fragmente wurden zunächst 2-4 Zyklen mit einer Annealingtemperatur 5° - 10°C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide durchgeführt.

Sporen-PCR

Da die Extraktion von DNA aus filamentösen Pilzen für PCR-Analysen gewöhnlich zeitaufwendig können Konidien von *A. nidulans* ohne vorherige DNA-Isolation direkt für PCR-Analysen eingesetzt werden. Hierzu werden Sporen frisch gewachsener Kolonien (zwei Tage bei 37°C) in einem kleinen Volumen (5-10 µl) sterilen Wassers mit der Pipettenspitze aufgenommen und in ein Eppendorf-Cup überführt. Die Sporen wurden für 15-20 min bei -80°C tiefgefroren und für die PCR (1-2 µl/Ansatz) verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide. Eingefügte Schnittstellen wurden durch Unterlegung kenntlich gemacht

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
RosA-5'	TACCTCGAGCACCTGTCGCAGATATCTGG
RosA-3'	GCCCTCGAGAAATATTAAGCAGAAGATAGTGCC
RosA-for- <i>AscI</i>	<u>GGCGCGCCCGGGATGTCAGCTCTCGCCGGAC</u>
RosA-long-rev- <i>PacI</i>	<u>TTAATTAAGAATGTTTCAGACTCATGTAG</u>
RosA-80-aa-rev	<u>TTAATTAACTATCGGTATTCGCAGCTGAC</u>
RosA-300-aa-rev	<u>TTAATTAATTAGTCGACAAAGTGATAGAGTAG</u>
RosA-294aa-for- <i>PacI</i>	<u>TTAATTAAGGACAATGTCCTCCGGCTG</u>
RosA-449aa-rev- <i>PacI</i>	<u>TTAATTAATCATCCGAGCATTGTGGCACC</u>
RosA-rev1	CCAGATAGAAAGATAGTGGTC
RosA-rev2	GGTTTCGCTGATGGGACCGCACG
StuA-NLS-for- <i>AscI</i>	<u>GGCGCGCCGCGCTACGGCCAAGGC</u>
StuA-NLS-rev- <i>PacI</i>	<u>TTAATTAATTGCTGCAGCCCAAGAG</u>
Primer1	CCCAGCTCGACCATGCCG
Primer2	GAAATATTAAGCAGAAGATAGTGCC
nos.int1	CCTGAGTTCGAATATGGC
nos.int2	CAGGGCTTGGCATAGTTG
NosA-Kpn-for	<u>GGTACCCGACGTCTTGAGATACAATC</u>
NosA-intseq-rev2	CAGGGCTTGGCATAGTTG
NosA-GW-ORF-for	<u>CACCATGCCGGCAGCACCGAGA</u>
NosA-GW-ORF-rev	AAGAAGAAGGTAGTTCCAACC
nos5	TCGGTACATCTAGGACAGCC

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
nosA5- <i>Sfi</i> I	TGGTGGCCATCTAGGCCTGTAATAAACGGCCGATTCAG
nos3	CCCACATAGATGTGAGGTTG
nosA3- <i>Sfi</i> I	AATAGGCCTGAGTGGCCCGTATGCTTCGCTTCTTAATG
NosA-nested-for	TCGGTACATCTAGGACAGCCAGA
NosA-nested-rev	CCAGCCGTATCACTTGTCCATCTAT
alcA1	CGCTATGATGGGTCACTGGCC
arg3'	GAC TCT CCT CAT TCC ATA C
arg5'	CTGAGAAATGATTCGTGAATG
veA Anfang for	CTT TCC TTG AAT TGC CTT TCG
veA Anfang rev	GAT GTT CAA TTC AAT GAC TGG

4.8 Transfektion von *E. coli*

Für die Klonierungen mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor wurden chemisch kompetente Zellen verwendet. Es wurden dazu Zellen des *E. coli*-Stamms TOP10F⁺ der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) benutzt.

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli* wurden Übernachtskulturen (ca. 12 Std.; OD₆₀₀ 0,5 – 0,8) zentrifugiert und die Zellen wiederholt bei niedrigen Temperaturen (2°C) mit destilliertem Wasser (Quarzdest) gewaschen, wie bei Ausubel *et al.* (1992) beschrieben. Die Zellen wurden in einer 10%igen Glycerinlösung resuspendiert und bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Für eine Transfektion wurde Plasmid-DNA durch Elektroporation (Gene-Pulser, BioRad) in elektrokompente Zellen des *E. coli* Stammes XL1-Blue (Stratagene; La Jolla, USA) übertragen.

4.9 Transformation von *A. nidulans*

Für die Transformation von *A. nidulans* (Yelton *et al.*, 1984) wurden 500 ml MM mit etwa 10⁹ Konidien inokuliert. Die Pilzsuspension inkubierte je nach Stamm für 12-15 Stunden bei 30°C auf einem Schüttler (300 rpm). Anschließend wurde das Myzel durch Gießen auf eine sterile Mira cloth Membran filtriert und mit Myzel Waschlösung (MWL) gewaschen. In 5 ml osmotischem Medium (OM) wurde das Myzel resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml Glucanex (150 mg/ml)(GeWe, Bad Kreuznach) für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Albuminlösung (12 mg/ml) sowie eine einstündige Inkubation bei 30°C unter vorsichtigem Schütteln (100 rpm). Von da an wurden die Protoplasten auf Eis

weiter bearbeitet. Nach mikroskopischer Kontrolle der Protoplasten wurden sie durch Gradientenzentrifugation vom restlichen Myzel getrennt, indem die Myzelsuspension mit 10 ml Überschichtungs-Puffer (ÜP) vorsichtig überschichtet und 15 Minuten bei 5000 rpm in einem HB-6 Ausschwingrotor (SORVALL, Bad Homburg) zentrifugiert wurde. Die Protoplastenbande, die sich an der Phasengrenze gebildet hatte, wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Zu der Suspension wurde das gleiche Volumen Sorbitol-Tris-Calcium Puffer (STC) zugegeben und für 8 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Protoplastenpellet zweimal mit je 10 ml STC gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 0,5 ml STC resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Helber-Zählkammer (Firma W. Schreck, Hofheim) bestimmt. Aus einem 500 ml Kulturansatz konnten mit dieser Methode im Durchschnitt 1×10^7 Protoplasten gewonnen werden.

Für einen Transformationsansatz wurden etwa 10^6 Protoplasten in 100 µl STC aufgenommen. Zu den Protoplasten wurden 5-10 µg DNA (in 100 µl STC gelöst) zugegeben und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml Polyethylenglykol-Lösung (PL) und eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Nach Zugabe von 8 ml STC wurde je 1 ml auf 0,6 molaren KCl-Platten vorsichtig verteilt und für 3-5 Tage inkubiert.

Lösungen für die *Aspergillus*-Transformation:

MWL (Myzel Wasch Lösung):	0,6 M MgSO ₄ (autoklaviert und bei 4°C gelagert)
OM (Osmotisches Medium):	1,2 M MgSO ₄ ; 10 mM Na ₂ PO ₄ -Puffer pH 5,8 (sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert)
ÜP (Überschichtungs Puffer):	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris/HCl pH 7,0 (autoklaviert und bei 4°C gelagert)
STC (Sorbitol-Tris-Calcium Puffer):	1,2 M Sorbitol; 10 mM Tris/HCl; 10 mM CaCl ₂ , pH 7,0 (autoklaviert und bei 4°C gelagert)
PL (PEG-Lösung):	60 % Polyethylenglykol 4000; 10 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris/HCl pH 7,0 (15 min bei 100 °C sterilisiert, bei 4°C gelagert)

4.10 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot)

Die Southern-Blot-Analysen wurden mit radioaktiv markierten Sonden, mit [α - 32 P]-dATP durchgeführt, die nach Angaben des Herstellers hergestellt wurden. Die DNA wurde mit einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine neutrale Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde die Membran prähybridisiert, mit der Sonde hybridisiert und bei 68°C stringent mit den von Boehringer Mannheim angegebenen Lösungen gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

4.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. nidulans*

Zur Isolierung von entwicklungspezifischer RNA der asexuellen Entwicklung, wurde das Myzel einer Flüssigkultur auf eine Miracloth-Membran gefiltert und dann auf Agarmediumsplatten deponiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde das Myzel geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser pulverisiert. Zur Isolierung von entwicklungsabhängiger RNA der sexuellen Entwicklung wurde Einmachhaut (Ostmann, Bielefeld) passend zugeschnitten, in H₂O autoklaviert, auf Agarplatten aufgebracht und mit Suspensionen von ca. 10⁵ Konidiosporen beimpft. Die bewachsenen Einmachhäute wurden zu definierten Zeitpunkten abgezogen, eingefroren und pulverisiert. Zur Isolierung von RNA aus Flüssigkulturen wurden Sporen in Erlenmeyerkolben auf Schüttlern (300 rpm) inkubiert. Das Myzel wurde anschließend filtriert, trockengepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Aus den so aufgeschlossenen Zellen wurde die RNA mit TRIZOL (Gibco) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde zunächst in 20–50 μ l DEPC-H₂O gelöst und 20 U RNase-Inhibitor (Promega, Mannheim) zugegeben. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration in einem Photometer (Pharmacia LKB - UltrospecIII) wurde die RNA mit DEPC-H₂O auf einen Wert von 1 μ g/ μ l eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

4.12 DNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot-Analyse)

Die Northern-Blot-Hybridisierung erfolgte nach der Beschreibung von Sambrook *et al.* (1989). Die RNA wurde mit Formamid und Formaldehyd denaturiert. Anschließend wurden 10 μ g pro Spur auf ein denaturierendes Formamid/Formaldehyd-Gel aufgetragen und nach Gelelektrophorese wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne Plus,

Pall, Ann Arbor, MI, USA) transferiert. Zur Kontrolle der Qualität der aufgetragenen RNA wurde die Membran mit Methyleneblau (0,03 %) gefärbt. Nach Waschen mit H₂O blieb nur die RNA angefärbt. Mit Hilfe eines RNA-Markers der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) wurde die Größe der RNA-Banden bestimmt. Die Dokumentation erfolgte durch eine digitale Kamera (Olympus CAMEDIA Digital Camera C2500L). Anschließend wurde die Membran vollständig mit Entfärbelösung (1 % SDS, 1 x SSC) entfärbt. Die Prähybridisierung (min. 1 Std.) und Hybridisierung (16 –20 Std.) erfolgte bei 42°C in Hybridisierungslösung mit 50 % Formamid. Das Waschen der Membranen erfolgte mit unterschiedlicher Stringenz bei 60 – 65°C. Es wurde zwischen den einzelnen Schritten mit einem Geiger-Müller-Zähler die verbliebene unspezifisch an die Membran gebundene Aktivität abgeschätzt und nötigenfalls stringenter gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie, wobei Filme von Kodak (Rochester, NY, USA) oder Fuji (New RX, Fuji, Japan) gebraucht wurden. Die Herstellung der DNA-Sonden erfolgte mittels Random Priming mit Hexamer-Primern, dabei wurde der synthetisierte DNA-Strang mit [α -³²P]-dATP markiert.

4.13 cDNA-Synthese

cDNA wurde mit Hilfe des SMART™ cDNA Synthesis Kit (Clontech) hergestellt. Für die Erststrangsynthese wurden je 2 µg Gesamt-RNA verwendet. Die RNA wurde in 3 µl H₂O aufgenommen, mit je 1 µl SMART und CDS Oligonukleotid (je 10 µM) vermischt und zwei Minuten bei 70°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT abgekühlt, 2 µl 5x Puffer, 1 µl DTT (20 mM), 1 µl dNTP (10 mM) und 200 U Reverse Transkriptase (Superscript III, Invitrogen) zugegeben. Die Erststrangsynthese wurde eine Stunde bei 42°C durchgeführt, der Reaktionsansatz anschließend mit TE auf 50 µl aufgefüllt.

4.14 Konstruktion von DNA-Plasmiden

Klonierung des *rosA*-Deletionskonstruktes (pKV18)

Das *rosA*-Deletionskonstrukt pKV18 wurde aus dem Subklon des *rosA* in den Vektor pKS⁻ konstruiert. Der Subclon pKV15 wurde mit *EcoRI/BamHI* geöffnet. Dabei wurde ein Großteil des *rosA*-ORF und ein Teil des Promoters entfernt (es verbleiben nur ca. 100bp vor dem Stoppcodon aus dem ursprünglichen ORF). Der Auxotrophiemarker *argB* wurde mit *EcoRI/BamHI* aus dem Plasmid pHW ausgeschnitten und mit dem geöffneten Vektor ligiert.

Vor der Transformation in den Stamm SRF200 wurde das KO-Konstrukt mit *KpnI/XbaI* linearisiert.

Klonierung des *rosA*-Überexpressionskonstruktes (pKV12)

Der *rosA*-ORF wurde mit den Oligonukleotiden RosA-5' und RosA-3' (70 bp vor dem ATG bis zum Stoppcodon) von genomischer DNA mit der Expand-Polymerase (Roche, Mannheim) amplifiziert. Beide Oligonukleotide enthalten eine angehängte *XhoI*-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde zuerst in den pCR2.1 Vektor kloniert (pMS51), und nach der Sequenzierung mit *XhoI* in den Überexpressionsvektor pKV8 kloniert. Dieser Vektor trägt den induzierbaren *alcA*-Promotor und den Auxotrophie-Marker *argB*. Das *rosA*-Überexpressionskonstrukt pKV12 wurde in den Stamm RMS011 transformiert.

Klonierung der *gfp-rosA* Konstrukte (pKV48, pKV50, pKV57, pKV58, pKV60)

Für die N-terminale Fusion von RosA an GFP wurde der *rosA* ORF (mit dem ATG beginnend bis ca. 750 bp nach dem Stopp-coden) mit der Pfu Ultra Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) von genomischer DNA mit den Oligonukleotiden RosA-for-*AscI* und RosA-long-rev-*PacI* amplifiziert, 30 min. mit Taq Polymerase inkubiert, und in den Vektor pCR2.1 kloniert (pKV49). Nach der Sequenzierung wurde der *rosA*-ORF durch schneiden mit *AscI* und *PacI* ausgeschnitten und in den Vektor pCMB17apx hinter ein GFP, welches hinter dem induzierbaren *alcA*-Promotor liegt, kloniert (pKV50). Die beiden verkürzten Konstrukte pKV57 und pKV58 wurden durch schneiden und religieren von pKV50 mit *PstI* (642 Aminosäuren, pKV57), bzw. *BglII* (449 Aminosäuren, pKV58) erzeugt. Im Konstrukt pKV57 werden so zusätzlich 33 Aminosäuren im Polylinker des Vektors translatiert bis zu einem Stoppcoden; im pKV58 sind es 18 Aminosäuren.

Das ganz kurze RosA-Konstrukt (80 Aminosäuren, pKV60) entstand durch Klonierung eines kleinen Amplifikates (Oligonukleotide RosA-for-*AscI* und RosA-80-aa-rev) in den Vektor pCMB17apx. Für das kurze RosA-Konstrukt (294 Aminosäuren, pKV48) wurden die Oligonukleotide RosA-for-*AscI* und RosA-300-aa-rev im selben Prozedere benutzt. Beide reversen Oligonukleotide hatten eine zusätzliche *PacI*-Schnittstelle und ein Stoppcodon.

Klonierung des *gfp-stuA-rosA*(294-449) Konstruktes und der Kontrolle (pKV71, pKV72)

Für die Fusion der *stuA*-Kernlokalisierungsdomäne mit dem mittleren Teil von *rosA* (As 294-449) wurde zuerst der C-terminale Bereich von *stuA* mit den Oligonukleotiden *StuA-NLS-for-AscI* und *StuA-NLS-rev-PacI* amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 kloniert (pKV69). Von dort wurde das *StuA-NLS*-Fragment mit *AscI/PacI* in den Vektor pCMB17apx kloniert (pKV71). Dieser Vektor diente als Kontrolle. Die Region von Aminosäure 294 bis 449 von *RosA* wurde mit den Oligonukleotiden *RosA-294aa-for-PacI* und *RosA-449aa-rev-PacI* amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 kloniert (pKV68). Das Oligonukleotid *RosA-449aa-rev-PacI* hat zusätzlich zur angehängten *PacI*-Schnittstelle noch ein Stoppcodon. Von dort wurde das Fragment mit *PacI* in den Vektor pKV71 kloniert (pKV72).

Klonierung des *nosA*-Deletionskonstruktes (pKV46)

Das DNA Fragment, das die 5'-Flanke von *nosA* darstellt, wurde mit Taq-Polymerase und den Oligonukleotiden *nosA5* und *nosA5-SfiI* amplifiziert und in den pCR2.1 TOPO-Vektor kloniert (pKV45). Die 3'-Flanke wurde mit Taq-Polymerase und den Oligonukleotiden *nosA3* und *nosA3-SfiI* amplifiziert und ebenfalls in den pCR2.1 TOPO-Vektor kloniert (pKV43). Der an die Oligonukleotide angehängte *SfiI* Schnitt der beiden Flanken unterscheidet sich in der Sequenz der mittleren 5 Nukleotide und ist nicht palindromisch. So können beide Fragmente gleichzeitig mit dem Selektionsmarker, der mit *SfiI* Schnitten flankiert ist, zusammenligiert werden. Das Plasmid pSK70, mit dem *argB*-Gen, wurde mit *SfiI* und die Plasmide pKV43 und pKV45 mit *SfiI* und *NotI* geschnitten. Das Plasmid pKV45 wurde dann mit SAP dephosphoryliert. Diese Fragmente wurden miteinander ligiert und zirkularisierten zum Vektor pKV46. Die drei ligierten Fragmente wurden mit den Oligonukleotiden *NosA-nested-for* und *NosA-nested-rev* amplifiziert und als lineares Konstrukt in den Arginin-auxotrophen *A. nidulans* Stamm SRF200 transformiert. Die homologe Integration des linearen Fragments entfernte den kompletten ORF von *nosA*. Diese Methode der Gendeletion ist an (Kämper, 2004) angelehnt.

Klonierung des *nosA-gfp* Konstruktes (pKV52)

Der *nosA*-ORF wurde mit den Oligonukleotiden *NosA-GW-ORF-for* und *NosA-GW-ORF-rev* (ca. 50 bp vor dem ATG und kurz vor dem Stoppcodon) mit der Phusion-Polymerase

(Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) amplifiziert und den Vektor pENTR/D-TOPO kloniert (pKV51). Das 5'-Oligonukleotid hat zusätzlich die 4 Basen CACC angehängt, die eine orientierungsgerichtete Klonierung zulässt. Nach der Sequenzierung wurde der *nosA*-ORF mittels einer LR-Reaktion (siehe 4.6 Gateway-LR-Rekombinationsreaktion) in den Vektor pMT-sGFP (Toews, et al., 2004) eingebracht.

5. Mikroskopische Methoden

5.1 Präparation von *A. nidulans* für die Hellfeld-, Interferenz-, und Phasenkontrastmikroskopie

Untersuchung von Konidiophoren und Hyphen

Sterile Objektträger wurden mit einem dünnen Film Vollmedium (+1 % Agarose) überschichtet und auf zwei Glasstäbe in eine Petrischale transferiert. Nachdem der Objektträger punktförmig mit Mycel inokuliert worden war, wurde das Gefäß bis zur Unterkante des Objektträgers mit CM befüllt und bei 37°C inkubiert.

Untersuchung von Keimlingen

Eine kleine Petrischale wurde mit CM befüllt und ein steriles Deckglas (24 x 40 mm) eingebracht. Nach Inokulation mit einer Impföse voll Sporen wurde die Petrischale bei 37°C für 6 – 8 h inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Keimlingen aus der Schale genommen und mit dem Axiovert-Mikroskop (Zeiss, Jena) untersucht.

5.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Alle Epifluoreszenzbeobachtungen und Fotos wurden an einem Zeiss Axiophot, das mit einem 63er und 100er Plan-ApoChromat-Ölimmerersionsobjektiv (Zeiss, Jena) ausgestattet war, durchgeführt. Zur Bildaufnahme diente die zeitlich und räumlich hoch auflösende CCD Kamera von Hamamatsu (ORCA ER) mit optionalem RGB Modus. Bei der UV-Lampe handelte es sich um eine Osram HBO50 Quecksilberdampf Lampe. Gegebenenfalls wurden die Aufnahmen mit der Bildbearbeitungssoftware von Adobe (Adobe Photoshop 6.0) in Helligkeit und Kontrast überarbeitet.

Tabelle 9: Filterzusammensetzung

Fluoreszenzfarbstoff (Filterset Zeiss)	Erregerfilter (Bandpassfilter) [nm]	Farbteiler [nm]	Sperr-Filter (Langpassfilter) [nm]
DsRed (15)	546	580	590
GFP (09)	450 – 490	510	520

5.3 Präparation von *A. nidulans* für die Rasterelektronenmikroskopie

Für die Fixierung des Myzels wurde eine auf einer CM-Platte gewachsene Kolonien mit dem Agar ausgeschnitten und in einer 5%-igen Glutaraldehydlösung zwei Stunden fixiert. Nach mehreren Waschschritten mit Wasser über zwei Stunden wurden die Proben in Ethylenglykolmonoethylether transferiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sie in wasserfreiem Aceton über zwei Stunden mehrfach gewaschen worden waren, erfolgte eine Kritisch-Punkt-Trocknung (Polaron E3000, Balzers Union, Lichtenstein). Die getrockneten Proben wurden mit Hilfe von Klebeplättchen (Leit-Tabs, Plano, Marburg) auf 15 mm kleine Objekteller (Hitachi, Japan) geklebt und mit einem Sputter-coater (Typ 07120-A, Balzers Union, Liechtenstein) vergoldet. Die Untersuchungen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (S-530, Hitachi, Japan) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit Agfapan APX25 Film (Agfa-Gevaert AG, Leverkusen) gemacht.

6. In der Proteom-Analyse verwendete Methoden

6.1 Kultivierung der Stämme

Die Stämme FGSC A4 (Wildtyp), SKV32 ($\Delta nosA$) und SKV49 ($\Delta nsdD$) wurden jeweils auf einer MM Platte vorkultiviert und eine Sporensuspension in sterilem H₂O hergestellt. Die Anzahl der Sporen wurde mit Hilfe einer Helber-Zählkammer bestimmt, und eine Sporensuspension mit 10⁶ Sporen/ml erstellt. Die für die Kultivierung benötigten Mediumsplatten wurden mit Minimalmedium gefüllt, und auf den festen Agar wurde zweimal in H₂O gewaschene Einmachhaut gelegt. Auf dieser Einmachhaut wurden 100 μ l der Sporensuspension mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Die Einmachhaut

ermöglicht die Entfernung des Pilzmyzels auch nach mehrtägigem Wachstum vom Medium, und beeinträchtigt dabei nicht das Wachstum des Pilzes. Die inokulierten Platten wurden mit Klebeband geschlossen. Dies stimuliert die sexuelle Entwicklung, vermutlich durch die Erhöhung des CO₂-Partialdruckes. Die Platten wurden mit Aluminiumfolie umwickelt, um eine Inkubation in vollständiger Dunkelheit zu gewährleisten, und 48 bzw. 120 Stunden bei 37°C inkubiert.

6.2 Aufschluss des Pilzgewebes

Das Pilzmaterial wurde nach dieser Zeit mit einem Spatel vorsichtig abgekratzt und sofort in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Der mechanische Aufschluss des Materials erfolgte in einer Kugelmühle vom Typ Mikro-Dismembrator S (Sartorius, Göttingen) mit 2600 rpm für 2 Minuten. Das zerkleinerte Material wurde 1 zu 2 (Gewicht zu Volumen) mit TE-Puffer (10 mM, pH 8) mit dem Proteaseinhibitor PMSF bei 4°C eine Stunde schüttelnd gemischt. Durch eine schwache Zentrifugation (5000xg, 15 Min.) wurde der Hauptteil der Zelltrümmer vom Proteinextrakt getrennt. Eine zweite Zentrifugation (12000xg, 1 Std.) trennte den Rest der Zelltrümmer vom Proteinextrakt. Die Proteinextrakte wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Quantifizierungsmethode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brillantblau von 465 nm auf 595 nm nach Bindung an Proteine. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Pipettierarbeit bei diesem Test ist gering und die Farbreaktion in 2 min abgeschlossen. Allerdings findet die Reaktion in saurem Milieu statt, in dem viele Proteine ausfallen. Außerdem stören Puffer mit Triton-X-100, SDS und Chaps die Reaktion. Für den Test wurde das Fertigreagenz von Biorad (München) in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Vor der Quantifizierung unbekannter Proben wurde immer eine Eichreihe (1-20 µg/ml) mit BSA als Standardprotein aufgenommen. Anhand dieser Eichreihe war es möglich die Proteinkonzentration in den Zellextrakten zu bestimmen.

6.4 Zweidimensionale Trennung von Proteinen

Diese Technik zur Analyse komplexer Proteinextrakte wurde 1975 von O'Farrell und Klose zeitgleich entwickelt (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Die Kombination zweier unterschiedlicher Trennprinzipien ermöglicht die Auflösung von mehr als 1000 Proteinen auf einer Fläche von ca. 13 x 14 cm². In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, erfolgt die Trennung der Proteine in einem pH-Gradienten nach dem isoelektrischen Punkt, während in der zweiten Dimension, der „SDS-PAGE“, die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Bevor die erste Dimension durchgeführt werden kann, muss das Protein in die Gelmatrix der immobilisierten pH-Gradientenstreifen (IPG-Streifen, Amersham Biosciences, Freiburg) einhydratisieren. Für die hier verwendeten Gele (24 cm x 20 cm) wurden bei anschließender Silberfärbung 100 µg Gesamtprotein auf insgesamt 500 µl Rehydratisierungslösung (375µl bei 18 cm Streifen) aufgefüllt. Für die Rehydratisierung wurden diese 500 µl in die Vertiefungen eines Acrylglasbrettchens pipettiert. Die Streifen mit einem pH-Gradienten von 4-7 oder 3-10 wurden mit der Gelseite nach unten in die Lösung gelegt. Die Streifen wurden dann vollständig mit Mineralöl überschichtet und mit einer Glasplatte abgedeckt, um eine Verdunstung der Rehydratisierungslösung und ein Auskristallisieren des Harnstoffs zu verhindern. Die Rehydratisierung wurde bei RT ausgeführt, bis die komplette Lösung in die Streifen diffundiert war, um sicher zu gehen, dass auch große Proteine komplett aufgenommen wurden (ca.18 h). Mit entionisiertem Wasser wurde der restliche Harnstoff von den Streifen entfernt, und dann zum Abtropfen kurz auf ein feuchtes Filterpapier gelegt. Jetzt konnten die Streifen mit der sauren Seite zum Pluspol in die Multiphor II-Apparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) gelegt werden. Auf die Streifenenden wurden mit entionisiertem Wasser befeuchtete Filterpapierstreifen gelegt, um eventuell vorhandene Salze aufzunehmen. Zusätzlich wurde auf die basische Seite ein weiterer Filterpapierstreifen gelegt, der mit 500 µl 15 mM DTT getränkt war. Nun wurden die Elektroden auf den mit Wasser getränkten Filterpapierstreifen befestigt und Mineralöl über die Streifen gegossen. Das Spannungsgerät EPL-35S00-XL (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde auf das in Tab. 5.14 stehende Programm eingestellt und der Lauf bei konstanten 20 °C ausgeführt. Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen bei -20 °C zur Lagerung eingefroren. Die fokussierten IPG-Streifen mussten vor dem Einsatz in der zweiten Dimension äquilibriert werden, damit die Proteine möglichst vollständig in das SDS-Gel einlaufen. Dafür wurden die Streifen für 15 min. in Lösung A und dann für 15 min. in Lösung B bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Für die Auftrennung nach der Molekülmasse wurden die Streifen mit den fokussierten Proteinen auf zuvor gegossene 12,5%ige SDS-Gele gelegt. Die Trennung wurde vertikal in der Dodoca

Kammer (Biorad, München), oder horizontal mit der mit 2-3 Watt pro Gel bei konstanten 10 °C durchgeführt. Der Lauf dauerte ungefähr 14-16 Std. und wurde beendet, sobald die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Tabelle 10: Rehydratisierungslösung für 2D-Gele

Substanzen (Hersteller)	Menge	Endkonzentration
Harnstoff (Merck)	1,92 g	8 M
Thioharnstoff (Sigma)	0,61 g	2 M
Chaps (Sigma)	81 mg	25 mM
Pharmalyte pH 3-10 (Amersham)	52,5 µl	1,3 %
DTT (Amersham)	17,5 mg	30 mM
Bromphenolblau	Spatelspitze	
Aqua dest.	auf 3 ml auffüllen	

Tabelle 11: Programm der isoelektrischen Fokussierung von 24 (18) cm IPG-Streifen

Stufe	V	mA	W	Vh
1 Gradient	500	1	5	1000
2	500	1	5	2000
3 Gradient	3500	1	5	10000
4	3500	1	5	46000 (35000)

Tabelle 12: Äquilibrierungslösungen für 2D-Gele

Substanzen	Lösung A	Endkonz.	Lösung B	Endkonz.
Tris/HCl pH 6,8; 0,5 M	2,5 ml	50 mM	2,5 ml	50 mM
Harnstoff (Merck)	9 g	6 M		6 M
Glyzerin 87% (Roth)	8,6 ml	30%		30%
SDS 10% (Roth)	10 ml	4%		4%
DTT (Amersham)	87,5 mg	23 mM		
Iodoacetamid (Sigma)			1,125g	210 mM
Bromphenolblau			Spatelspitze	
Aqua dest.	ad. 25 ml		ad. 25 ml	

6.5 Färbung der 2D-Gele mit Silber

Bei der Silberfärbung bildet das Ag⁺-Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Durch alkalisches Formaldehyd wird das komplexierte Ag⁺ zu Ag reduziert. Die Nachweisgrenze liegt bei ungefähr 50-100 pg Protein pro Bande. Das Problem bei der Silberfärbung ist, dass sie nicht quantitativ ist und Proteine nicht spezifisch anfärbt, sondern auch Nukleinsäuren, Lipide, Liposaccharide und Glykolipide. Außerdem sind silbergefärbte Proteine kaum weiteren Analysen zugänglich. Trotzdem wird diese Färbung wegen der hohen Sensitivität sehr häufig für qualitative Analysen verwendet. Die Färbeprozedur dauerte ungefähr 3-4 Std.. Zuerst wurden die Gele für 1 h mit einer Fixierungslösung behandelt und dann 2 x 20 min. mit 50% Ethanol gewaschen. Als nächstes folgte die 1 minütige

Sensitivierung mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Das Natriumthiosulfat wurde durch waschen mit entionisiertem Wasser (3x) wieder entfernt und die Gele für 20 min in der Silberfärbelösung inkubiert. Das überschüssige Silber wurde dann wieder in drei kurzen Waschschrritten mit entionisiertem Wasser entfernt. Nun wurden die Gele mit einer K_2CO_3 -Lösung entwickelt. Diese Reaktion wurde mit 1% Glyzin kurz abgestoppt und der restliche Entwickler durch kurzes Waschen mit entionisiertem Wasser entfernt. In einem zweiten Abstoppschritt wurden die Gele für 10-30 min. in 1% Glyzin gegeben und zum Schluss ebenfalls für 30 min in entionisiertem Wasser gewaschen. Die gefärbten Gele wurden in Plastikfolie eingeschweißt, gescannt und bei 4 °C gelagert.

Lösungen für die Silberfärbung:

Sensitivierungslösung: 0.02 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l)
Waschlösung: 50 % vergällter Ethanol
Stopplösung: 1% Glyzin

Tabelle 13: Fixierlösung für die Silberfärbung

Substanzen	Menge	immer frisch ansetzen
Verg. EtOH	500 ml	
Eisessig	120 ml	
Formaldehyd 37%	0,5 ml	
Aqua dest.	380 ml	

Tabelle 14: Silberfärbelösung

Substanzen	Menge	4-5 x verwendbar, im Dunkeln lagern
Silbernitrat	2 g	
Formaldehyd 37%	0,75 ml	
Aqua dest.	ad 1 L	

Tabelle 15: Entwicklungslösung für die Silberfärbung

Substanzen	Menge	immer frisch ansetzen
Na_2CO_3	60 g	
Eisessig	4 mg	
Formaldehyd 37%	0,5 ml	
Aqua dest.	ad. 1 L	

6.6 Färbung der 2D-Gele mit colloidalem Coomassie-Blau

Coomassie ist ein Triphenylmethan und färbt unspezifisch fast alle Proteine. Dieser Farbstoff wird auch beim Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung verwendet. Der Detektionsbereich dieser Färbung liegt bei 10 ng -1 µg. Damit ist die colloidale Coomassiefärbung schwächer als die Silberfärbung, aber sensitiver als die herkömmliche Coomassiefärbung. Der Vorteil dieser Färbung ist, dass die Proteine ohne Probleme im MALDI-TOF analysiert werden können. In dieser Arbeit wurde der Farbstoff Coomassie BrilliantBlue G-250 (Serva, Heidelberg) eingesetzt, um Proteine in der „SDS-PAGE“ sichtbar zu machen. Zuerst wurden die Gele 1-2 Stunden fixiert. Die Fixierlösung wurde durch zweimaliges Waschen (jeweils 15 min.) mit entionisiertem Wasser entfernt. Die Gele wurden über Nacht in einer Glasschale mit Färbelösung langsam schüttelnd inkubiert. Die Gele waren dabei gut mit Flüssigkeit bedeckt. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung durch Waschen mit 20%igen Methanol (2x 10 min.) entfernt.

Lösungen für die Coomassie-Färbung:

Lösung	Fixierer:	40% EtOH (vergällt), 10% Eisessig
	ccB:	5 g BrilliantBlue G-250 in 100 Aqua dest. lösen
	ccD:	50 g (NH ₄) ₂ SO ₄
		6 ml Phosphorsäure 85%
		ad. 490 ml Aqua dest.
		10 ml Lsg. ccB
	Färbung:	200 ml ccD + 50 ml Methanol (frisch ansetzen)

6.7 Färbung der 2D-Gele mit Fluoreszenzfarbstoffen (CyDyes)

Die Detektierung der Proteine mit den CyDyes (Amersham, Freiburg) erfolgte nach einem anderen Prinzip, als die bisher vorgestellten Färbungen. Während die Silber- und die Coomassie-Färbung nach der Auftrennung der Proteine erfolgte, fand die Markierung der Proteine mit den CyDyes schon vor der isoelektrischen Fokussierung statt. Der Vorteil dieser Färbung liegt darin, dass unterschiedliche Proteinproben mit verschiedenen Cy-Farbstoffen markiert werden können und somit gleichzeitig auf einem Gel aufgetragen werden können. Außerdem haben diese Fluoreszenzfarbstoffe bei der Detektion einen sehr großen linearen Bereich, so dass eine Quantifizierung über einen großen Bereich möglich ist. Die Farbstoffe

werden in einer Ester-Substitutions-Reaktion kovalent an die Aminogruppe des Lysins von Proteinen gebunden. Sie haben keinen Einfluss auf den IP der Proteine und stören auch nicht die Auftrennung in der zweiten Dimension.

Es wurden jeweils 50 µg Protein mit 400 pmol CyDye markiert. Die Proteine werden einfach mit der entsprechenden Menge des CyDyes gemischt. Die Reaktion erfolgte auf Eis im Dunkeln. Danach erfolgte die 2D-Gelelektrophorese wie beschrieben. Die Detektion erfolgte an einem Laserscanner des Types Typhoon (Amersham, Freiburg).

6.8 Identifizierung der Proteine aus den 2D-Gelen

Zur Identifizierung ausgewählte Proteine wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus dem Gel ausgestanzt und in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Identifizierung erfolgte nach einem tryptischen Verdau der Proteine mittels MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight). Dies geschah im Labor von Prof. Hecker mit deren Standardlaborprotokollen.

IV. Ergebnisse

Der Prozess der sexuellen Entwicklung und seine Regulation im filamentösen Pilz *A. nidulans* ist ein gutes Beispiel für die Komplexität eines Vorganges, bei dem morphologische und genetische Umstrukturierungen in einem Organismus stattfinden. Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis der sexuellen Entwicklung in *A. nidulans* zu gewinnen, unter besonderer Berücksichtigung von Regulatoren, die an diesem Prozess beteiligt sind.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung zweier möglicher Regulatoren, und ihrem Vorkommen innerhalb des Reiches der Pilze. Im zweiten und dritten Teil der Arbeit erfolgt die molekulare Analyse dieser beiden potentiellen Transkriptionsfaktoren. Der vierte Teil widmet sich einer umfassenderen Analyse der sexuellen Entwicklung beruhend auf einem Proteom-Ansatz.

1. Identifizierung zweier *pro1*-ähnlicher Gene

Der Regulator Pro1 aus *Sordaria macrospora* hat einen starken Einfluss auf die sexuelle Entwicklung dieses Ascomyzeten. Bei Mutation, bzw. Deletion des Gens stoppt die Entwicklung in einem sehr frühen Stadium der Fruchtkörperbildung, reife Perithezien werden nicht mehr gebildet. Nur noch sogenannte Protoperithezien, Vorläufer der reifen Fruchtkörper sind zu finden, in denen die sexuelle Formation von meiotischen Ascosporen noch nicht begonnen hat (Masloff et al., 1999).

Bei Datenbanksuchen mit dem Pro1 Protein als Suchsequenz in der Genomdatenbank von *A. nidulans* (Whitehead Institute; <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/index.html>) mittels tBlastN fanden sich interessanterweise zwei dem Pro1 sehr ähnliche aus der Gensequenz abgeleitet hypothetische Proteine (die genauen Werte der Ähnlichkeit sind im Kapitel 1.3, nach Verifizierung der Proteinsequenzen zu finden). Diese beiden Gene wurden im Verlauf dieser Arbeit im Detail analysiert. Sie wurden aus den später in dieser Arbeit beschriebenen Phänotypen *rosA* („**r**epressor **o**f **s**exual development“) und *nosA* („**n**o **s**ex“) genannt.

1.1 Sequenzbestimmung und Analyse des ersten *pro1*-ähnlichen Gens, *rosA*

Zur Verifizierung der Sequenz des in der genomischen Datenbank gefundenen Gens *rosA* wurde ein das *rosA* tragendes Cosmid aus einer Cosmid-Genbank, die das komplette Genom von *A. nidulans* beinhaltet (freundlicherweise von B. Miller zur Verfügung gestellt, Moscow, Idaho, USA), isoliert. Dies geschah mit Hilfe einer PCR mit Oligonukleotiden, die im 5'-Bereich und im 3'-Bereich des putativen ORF abgeleitet wurden, um sicherzustellen, dass das Gen komplett auf dem Cosmid liegt. Ein ca. 6 kb großes *XbaI/KpnI*-Fragment, welches den *rosA* ORF beinhaltet, wurde in den Klonierungsvektor pKS⁻ subkloniert (pKV15). Der ca. 2,1 kb grosse ORF wurde doppelsträngig sequenziert (MWG-Biotech), um Fehler in der genomischen Datenbank auszuschließen.

Zur Identifizierung von möglichen Introns wurden Teilfragmente des Gens (jeweils ca. 700-800 bp) mit cDNA des Pilzes als Template amplifiziert, kloniert und sequenziert. Beim Vergleich von cDNA und genomischer DNA wurden zwei Introns gefunden. Beide liegen im 5'-Bereich des Gens. Das größere Intron (82 bp) liegt genau an der gleichen Stelle vor dem Zn(II)₂Cys₆-Zinkfinger, an der auch ein Intron im *pro1*-Gen von *S. macrospora* und *N. crassa* liegt (siehe Abb. 4).

Die beiden Introns im *rosA*-Gen unterbrechen einen offenen Leserahmen von 2142 bp, der für 713 Aminosäuren kodiert. Der Translationsstartpunkt wird bei filamentösen Pilzen durch die Kozak-Konsensussequenz 5'-CCACCATGGC-3' gekennzeichnet, wobei vor allem das Adenin bei Position -3 konserviert ist (Gurr et al., 1987). Die das Startcodon von *rosA* umgebende Sequenz lautet 5'-ACACCATGTGTC-3', weicht also nur in zwei Basen von der Kozak-Sequenz ab. Die beiden Introns zeigen beide die Konsensussequenzen an den 5'- und 3'-Seiten, und beinhalten auch beide eine Verzweigungsstelle, die genau mit dem Konsensus einer speziell für Pilze entworfenen Konsensussequenz (RCURAY, (Kupfer et al., 2004)) übereinstimmen. Diese Verzweigungsstelle ist für die Ausbildung der Lariat-Struktur beim Spleißprozess der RNA nötig (Reed & Maniatis, 1988).

Eine Vorhersage über einen möglichen Transkriptionsstart in dem untersuchten Bereich 1800 bp vor dem putativen Startcodon konnte nicht getroffen werden. Die benutzten Computerprogramme [http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html], [<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter>] und [<http://promoter.informatik.uni-erlangen.de/>] wurden allerdings nicht speziell für die Promotorensuche in Pilzen entwickelt. Zum Auffinden möglicher Polyadenylierungsstellen wurde der Sequenzbereich nach dem Stoppcodon auf das eukaryotische Polyadenylierungsmotiv TTATTT hin untersucht. Die

Sequenz wurde 831 bp hinter dem Translationsende gefunden. Es treten allerdings mehrere AT-reiche Basenabfolgen im Bereich davor auf, die möglicherweise auch als Polyadenylierungssignal fungieren, denn bei filamentösen Pilzen gibt es eine große Variation der Konsensussequenz (Gurr, et al., 1987).

```

TC TAGAT GT TAC TGCTGTT TCT TGAATCATAGC CTTT AC TTC AAGCGGT TGT CGGGTGAAT CTTGGTAGCCCA CGATAAACACAC TCC CTGTC GTGAC ATCAT AAAT TGGGGTAT CT 120
AC AT CCGGATA TTATGAA TGGCC TTGTACCAATT CC ATGTTGCCGGTGT TAAA AGCGGCAAAAGCTTT TTTCA TTGAC ACAACGGAAAATG CCAAGATCGCT TGGCA TAGCTGAGAT CC 240
ATGC CGGAGATA TTAGCC CAAGA TTGCC GGC GGACT ACCTA TCT TGGCAGC TCA AGCGCT CATGC AGA AACGT TGTCTAAT TAT GT TCGAGGGC CTTAAT TGTAT TGGAA T 360
GGCC TTGAACCGGGGTAAT AAACC TTATTCAGA AAGAA TGTCT AT TAA TAGAT GC GCACGTCA TTTCAGTCT TTGTAGCTCTGTCGT CAC TAATTAACTTCT TTTCCGCC CTGAACT 480
AGTAGAA TTAAAGCTGCA TT AAGTT CATGAT TTAGC AGTTAAGGGC GTCAAT TTTGGGAAAT TAT TGGGAT TGCAGT GAGCGGCCCGC CAGCGAATCAGAGCT TAT CAAGGCC TAGAT TT 600
ACCGGTT CGGCA CGGCCACTC ATTAATTGCTAA TCTGTGAT TGGT TGA TCTTGTGAAA GCGCC AGCATGTGGAGCGCT CCC TGCCAATCTA GTGGC CAGTGA ACCGCTGTATGCG TGGAG 720
TTGC TGC CAATC GAGCC TT TAGCAGCGAAGCT TTAGC ATGCACCTCCGCTC TGTCTT TCA CA AAG AACCC TCC AGGCG AGCGT TTT CAT CAGTGC TGGGAGGACTGTA AAGC AAGCAAT T 840
CTGA TTC TGAACA TAAAT CAGCCA AATGATA TTGCGAGT TTTGTTGAGGT AGGCGACTAATGATA TTGCAATCAAGA TCGAGTCCAGC AAAAGAGT CGAAGATGCT CAAGAA TCGGTC AG 960
TTTGAGT GAGGAGTAA TTTCAAGAGGTGAT TTGATGGAAGAGACAATG ATAGC ATGGAAGATG AATA TCA GATCGAGCAT TACCCGG AAATTAGCGAGC ACGCA TCCAGATGCC GC 1080
ATCCGTGACCTGCT TCGCGGCCCAACTATGCCC GAACGGGAGC AGCGCTGAC AGGGGAC TCGGCACCTCAAGTTCTCAACT TAGTCGGCCCTGATCATCCCA GGCACAAACCGCC GG 1200
TCAGGATCCAAAAT TAGT TCT TTTGCGGTGT CATTCTCGT TTGCTCCAGA TCGCC CCCCGCCGCC GTC TCGAGTGC ACTCTCA CGCAGCTAAC TAGCTCAACCGC CGCATGG 1320
TGGAAA AATAGAAAGCTC AGAGC ATGGCATTGC TACTTTTGGCTTGTATAGG TCTTCTCATCAAGAT AT TAA GAGCATCATGTT CAC CAGGCTCGTTCAG TTTCTTCGCA 1440
GACGCTC TCGACACTCGACTCGGCTGTGCGC TACAACA TAAACAACA CAGCAGCGGGGACAC AGAAGGCG AGT GAGGACTGCT TGGAT ATATGGT CAT TGTGT CGCGTACTACGCC 1560
GTTCC ACCGTGCGCAGAT ATCTGACTTGATA TTTGCTTCCA GTCCGCGCAACCGATAGT TACACATGT CAGCTCTCGCCGAGCTAGTACGCAAGCCAGCCACACACAGCT 1680
M S A L A G P S T Q A K P Q Q S
GC GGAA CAAGGCGAGCCGAA AAGCCAAAATC AGACATCGT TATCA AGGCA CAGC AAATA TGGT TAC GAAGCATA CAACAACGGT CCGT AACGGTTAGT GTT GCGGGGACATACT 1800
A R T R A D P K S Q N O T S V I K D H A N M V T K A Y K R S R N Intron 1
CGAC TAGTTGGCCGTGCGGCC AA TTTATTCAGC ATGGAACTGAC TGTCTCCTCGCAGGTTGCTATACCTGCCGCCTACGAAAGGAAGAAA TGCGACGAGACTCAT CCTAATTGCGTGGC 1920
G Y T R L R R K K D E T H P N V A
ATGCCAGTCTGGGCTCAGCTGCCAATACCGAAAGCGAGTGGTGGAT AAGTACTCAGCGCGAA TGC TACAA AAGGACA AGATAAAA CAAGGGTCAGGGAGACTAAGTACTGCA 2040
T S L G V S E Y R K P S W W I S T Q A R M L O K D K I K Q K V R E T K V L Q
AAAGGAGGTAGCGCTTACGGGTATGCTGCTCTATGTGCTCGTACATCGCTGACACTGCGTACACTGGGTAGAATACATCAAA CGTGGTCCCATCA GCGAAACCTCGCAC AACCTGTCAGC AA 2160
K E V A L Q Intron 2 E Y I K R A V P S A K P R D N P V S K
GCCTCAAACGCCCGGATGAAACC AATGGTGGCC AC CACATATGATCCC TCTACGTCTTACTTACCGACACTGCAAC CAGCGCAC TAATGTC TACCCCATATGGCT TGTGATGCTGGAAT 2280
P Q T P P M E P M V A T T Y D P S T S Y L P A P A T S A L M S T P Y G F D A G I
TGGTAGCAGCATTATATCTCGTACACCACTACGTACC TGATACAACC CCAATTGC AAGACTACTAGTGTCTTTGGTTTGACC CAACAGCAACTCCGTAA TACCTACACCGACTCAAT 2400
G S S T Y I P D T T Y V P D T T P L Q D T S V F W F D P T A T P L I P T P T S I
TTCAAGACTACAGCGATTCAGCGCAATGACAGCGACCAACAACAACGACAGCGACTCAGCAGTACAGAGTGACGAA TGGTATCAAGGATTTACTGACC CCC TACCGCG 2520
S E L S A S A A M T A T T T T T A M M T T P A V Q S D E W Y Q G F T D P L P R
TGTGCAGAA TCC TCTCTCTTGGATCTTCCGAA TCCC GGACGACCACTATCTTCTCTCTG GAAAGGAAGATGTTCAAATGACGGA GAGCGCTCCC TACTCTATCTACTTGTGCA 2640
V Q N P L S L G S S E F P D R P L S F Y L E G K M S S N D R E R S L L Y H F V D
CAATGTCCTCGGCTGGT TTTCCATTCGACCTCCATA AACAGGGA CCAATCAGAGCCCGC GAGATCC TGGCGTCCCTT GACTCGAAC AAGTCAATATTACCAGGCTGTC TCAGC GT 2760
N V L R L V F P I L D L H K O G P S R A R E I L R S L D S N K S Y Y H F T D P L S V
ATCAGCTATCCACC TCAAGACTGTGAAGAAGCAGCGAGGTA AACGAGTAGA AAGAGACATATGCGCC ACCGTAC GCGGCATCTCAGAA CTCCA AAGCC TTA TAGCGGATCATGG 2880
S A I H L R T V K K Q R G K R V E R D I M R H R Y A A I S E L H K A L Y A D H G
CCAGATCAATCTTAGACGCAAGCTGGCAATGATCTTCTTCCACTGCTCGGTGGGATCACCTGAAG TGGACGGCTCCCGGATATAGGA TGGAAAGGAGACTTACAGCGCTCACA GA 3000
H D T I L D A T L A M I F F H C S V G S P E V D G L P D I G W N E H F T A V T D
CCTGTC AACAAAGTAGGGCTATGGAGGCAAAC CCAATTCAGCGCGCCCAATTAGCA TGTCTCTCAGTACA TGGATGACATTTTGGTGC CACAA TGC TCGGAAGATCTCCCAA T 3120
L V N K L G L M E A N P F T P P F S M S L S T W I D I F G A T M L G R S P O F
CGCACACGATA TAGGCAT AAGCACCTGAACGGA ATTTGCTGCTGTTA CGCAAC TAA TGGGGTGCAGCAGCAGCA ATCATGTACCTGATC TCGAAATCGCC TGGCTT GATTTTAA 3240
A H A Y R H K H L N G I S S G L R E L M G C D D R I M Y L I S E I A C L D S L K
GGAA GAA GCGC GCA TCAATGAC TACAGCTGTCG CACCACTGCTCGGCA TTAACAGCCAGCTGACCATGCGGAGCAAGTGGTCTGCTAATCCGACTCGAA AACCCATTTCCGCCAC 3360
E G R I N D Y T V C H I V S A L T A Q L D H A E O V V V N P T L E R P I S A T
GGCGATTATCCAGCGGCAATAAA CTCAAGAAAGC ATGACGCGCA TATTCGCGCTG CAGCGC GATCTACC TATACAGCTTAA TGC CGGC TCCCATCCGGAGCAGCAGACA TCGTA GA 3480
G I I O A D K L T K N M T A I F R V A A R I Y L Y S L M P G F H P E Q O N I V D
TCTCTGTCGAGAA GGTTCAGAAE TCTGCAATATATCCGTCAGGACCC TTTGGATTTGACCGC TCGCTTGTGGCCAAATGC TAACTACTGGCGCTTCTCAACGCCAACCA GCAACT 3600
L V E K L V S E L L Q Y I P S G P F G F D R S L V W P M L I T G A F S T P T S N F
TGGCATTATCCTTGAGCAAGGAATGGCCGATGGCGATTGCAGCGACTTTGGCAGTTTGGACGCA TGTATCCGTCTCGAGGACTTGGAAACTTTCCGACGACGACAGTGGAGCC 3720
R I I L E Q R I A A L G D C S D F G S F G R C M Y S V L Q E T W K L S D D D S E P
TGTCTATATGAGCGCACG TCTGGCC TCC TTTGGCTCCCTCGTCGCTTTTGAATTCGAC GCGCATA TGGCTATGCCGTCTCGGGGCTTGGCTGTGGCGC GCAACGAGTCAAGCA 3840
V Y T E R T S G L L G P P S S S A F E F D A H M A M P S P A L A V G A O R V K Q
ACAAACC ATTCATTTGGCAGATGTATGAGGGCTCGGAAATGGC ACTATCTCTGCTTAAATATTTCTGCACTAAT TATGCTAGGATGTCGCTACTATTCTGACTCACTCTGGCTT 3960
Q P I H W R D V M R A R E W H Y L L L
GATAGCTGACCCAACTAGTAT TCAACATGCGCA TTTGGCGCACCGGTGGCGTGTGTTTTCGGTTA CCCC TTGGCTTGGCGTTATAAC TAGT 4052
    
```

Abb. 4: Genomische Sequenz des *rosA* Genlokus mit gekennzeichneten Introns und der abgeleiteten Proteinsequenz. Es ist ein 4052 bp großes *XbaI/SpeI*-Fragment des *rosA*-Subklons pKV15 dargestellt. Der offene Leserahmen (ORF) von *rosA* ist 2142 bp lang (von Position 1633 bis 3900, unterbrochen von zwei Introns), und kodiert für ein putatives 713 Aminosäuren großes Protein. Die Kozak-Region, die den Translationsstart kennzeichnet, ist mit einer grünen Box gekennzeichnet. Das Zn(II)₂Cys₆ Zinkfingermotiv ist mit einem roten Rahmen umgeben, die sechs hochkonservierten Cysteine, die die beiden Zink-Ionen fixieren, sind rot unterlegt. Mit dem blauen Rahmen ist eine threonienreiche Region des Proteins markiert. Blau unterlegt sind die Verzweigungsstellen der Introns, die für die Lariat-Formation, während des Spleissens der RNA benötigt werden.

1.1.1 Proteinsequenzanalyse von RosA

Das putative Protein besteht aus 713 Aminosäuren und hat eine berechnete molekulare Masse von 79,6 kD. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 7,6. Im N-terminalen Bereich des Proteins findet sich ein $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ binukleäres Cluster (As 49-79), welches in jedem der ähnlichen Proteine zu finden ist, und ein zweiteiliges Kernlokalisierungsmotiv, welches mit den ersten Aminosäuren des Cys-Clusters überlappt (As 44-62) (Motive wurden mit einem „Motif Scan“ auf der Seite: http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan identifiziert). Desweiteren enthält das Protein eine Threonin-reiche Region (As 178-236) und zwei putative PEST Sequenzen (As 133-253 und 646-659, gefunden mit dem PESTfind Analysis Programm <http://www.at.embnnet.org/embnnet/tools/bio/PESTfind/>).

1.2 Sequenzbestimmung und Analyse des zweiten *pro1*-ähnlichen Gens, *nosA*

Zum Zeitpunkt der Identifizierung des zweiten dem *pro1*-ähnlichen Gens, war bereits ein Zugriff auf die *A. nidulans* Genomsequenz des Whitehead Institutes, kombiniert mit der bereits bekannten Sequenz der Firma Monsanto, möglich. Diese kombinierte Sequenz gewährleistet eine 13fache Abdeckung des gesamten Genoms. Diese sehr hochwertige Sequenz wurde zusätzlich durch die doppelsträngige Sequenzierung des kompletten ORF von *nosA* bestätigt, kloniert in dem Vektor pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) nach Amplifikation mit einer „Proof-reading“-Polymerase (Phusion-Polymerase, Finnzymes, Espoo, Finnland) (Vektor pKV51). Auf die Isolierung eines Cosmids und Sequenzierung eines Subclons, wie im Fall von *rosA*, wurde verzichtet.

Die Identifizierung von möglichen Introns erfolgte durch Amplifikation von Teilfragmenten des Gens (jeweils ca. 700-800 bp) von der cDNA, und anschließende Klonierung und Sequenzierung. Wie bei *rosA* wurden zwei Introns gefunden. Beide liegen im 5'-Bereich des Gens. Ebenso wie bei *rosA* liegt das erste Intron (62 bp) an der gleichen Stelle vor dem $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ Motiv.

Die beiden Introns im *nosA* Gen unterbrechen einen offenen Leserahmen von 2025 bp, der für 675 Aminosäuren kodiert (Abb. 5). Die Kozak-Konsensussequenz am Translationsstart weicht bei *nosA* vier Basen vom Konsens ab (5'-ACAAGATGCC-3'). Die beiden Introns zeigen beide die konservierten 5'- und 3'- Seiten, jedoch stimmt der Konsens für die Verzweigungsstelle nicht überein.

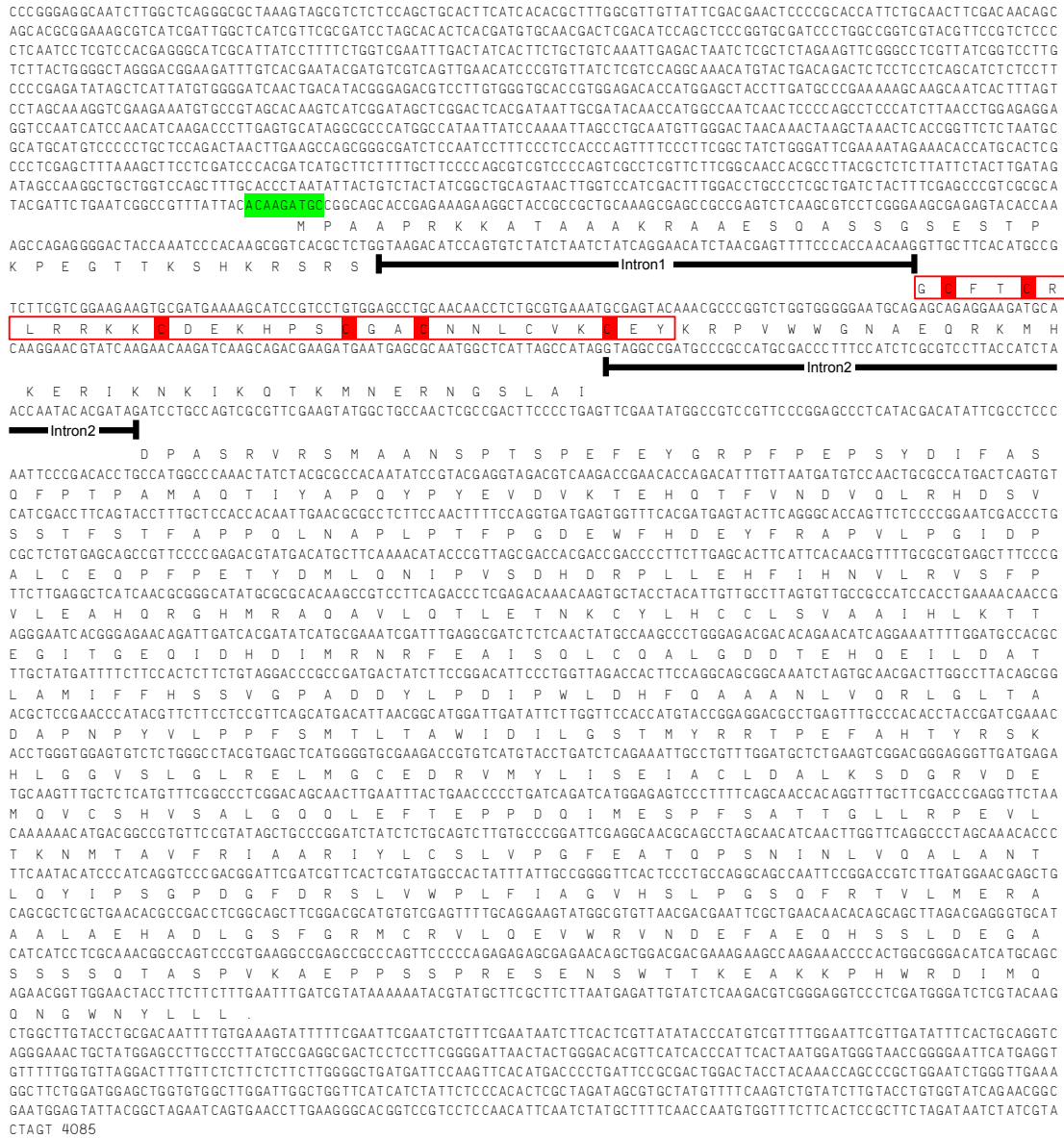


Abb. 5: Genomische, cDNA und abgeleitete Protein-Sequenz des nosA Genlokus. Es ist ein 4085 bp großes *SmaI/SpeI*-Fragment gezeigt. Der offene Leserahmen (ORF) von *nosA* (2025 bp lang, unterbrochen von zwei Introns) kodiert für ein putatives 675 Aminosäuren großes Protein. Die Kozak-Region, ist mit einer grünen Box hinterlegt. Das Zn(II)₂Cys₆ Zinkfingermotiv ist mit einem roten Rahmen umgeben, die sechs hochkonservierten Cysteine sind rot unterlegt.

1.2.1 Proteinsequenzanalyse NosA

Das abgeleitete Protein besteht aus 675 Aminosäuren und hat eine berechnete molekulare Masse von 75,6 kD. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,3. Wie bei RosA finden sich im N-terminalen Bereich des Proteins ein Zn(II)₂Cys₆ binukleäres Cluster (As 44-74), und ein zweiteiliges Kernlokalisierungsmotiv, welches mit den ersten Aminosäuren des

Cys-Clusters überlappt (As 39-56) identifiziert (Suche mit „Motif Scan“ auf der Seite: http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

1.3 Sequenzvergleich der putativen Proteine aus *S. macrospora* und *A. nidulans*

Von den verifizierten genomischen und cDNA Sequenzen wurden die putativen Proteine RosA und NosA abgeleitet und mit Pro1 verglichen. RosA hat auf der gesamten Proteinnlänge eine Identität von 38% und eine Ähnlichkeit von 52%. NosA zeigt eine Identität von 44% und eine Ähnlichkeit von 58%. Untereinander zeigen RosA und NosA eine Identität von 43% und eine Ähnlichkeit von 60%. In Abbildung 6 ist eine Sequenzanalyse von Pro1, RosA und NosA zu sehen. Die hoch konservierten Cysteine des Zn(II)₂Cys₆ binukleären Clusters, die zweigeteilten Kernlokalisierungsdomänen, und die Lage des hochkonservierten Introns im 5'-Bereich der Gene sind eingezeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass der C- und der N-terminale Bereich der Proteine starke Ähnlichkeit aufweist. Der Mittelteil hingegen ist schwächer konserviert.

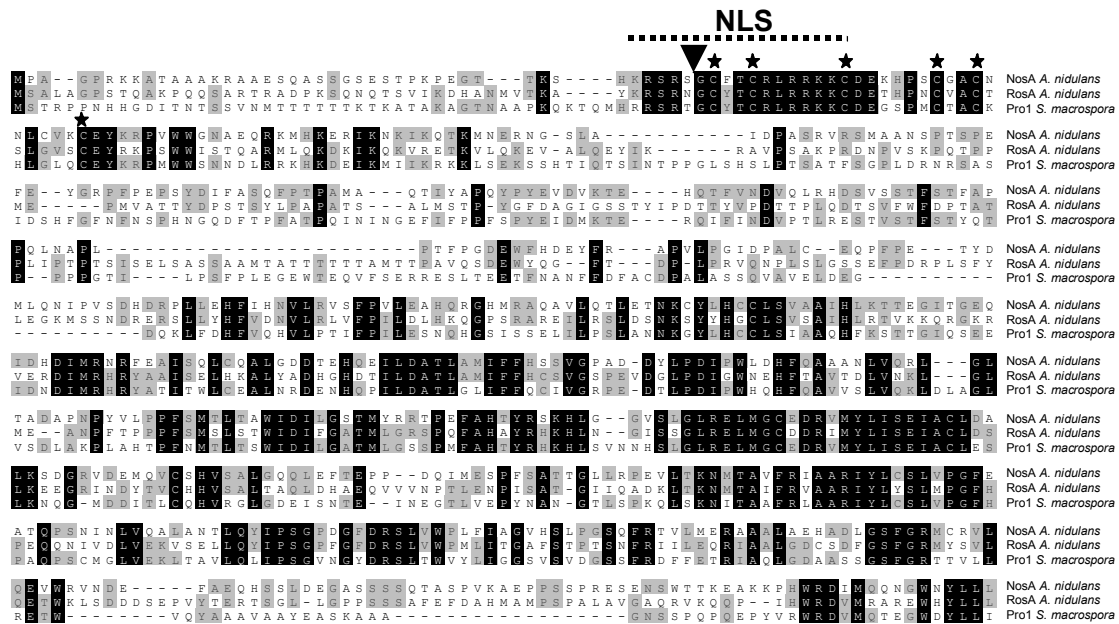


Abb. 6: Vergleichende Sequenzanalyse von RosA, NosA und Pro1. Die Kernlokalisierungsdomäne (NLS) ist bei allen Proteinen zu finden, ebenso wie die stark konservierten Cysteine des Zn(II)₂Cys₆ binukleären Clusters (mit Sternen gekennzeichnet). Die Lage des stark konservierten Introns im 5'-Bereich des Gens ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm Megalign (DNA-Star) unter Benutzung der Standardparameter.

In *Neurospora crassa* wurde neben Pro1 ein sequenzähnliches Protein, Pro1A genannt, beschrieben. Dies wurde durch Sequenzsuchen von Pro1 in der genomischen Datenbank von *N. crassa* gefunden. Da *S. macrospora* und *N. crassa* eng miteinander verwandt sind, wurde

angenommen, dass dieses „Homolog“ auch in *S. macrospora* zu finden ist. Mittels einer Northernblot-Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für *pro1A* aus *N. crassa*, konnte tatsächlich ein Transkript in *S. macrospora* gefunden werden (Masloff, et al., 1999). Pro1A zeigt jedoch nur schwache Sequenzähnlichkeit zu Pro1 (23% Identität), ebenso zu NosA (22% Identität) und RosA (22% Identität). Da auch keine experimentellen Daten über die Funktion von Pro1A vorhanden sind, wird Pro1A nicht als ähnliches Protein angesehen und im Folgenden auch nicht weiter beachtet.

1.4 Vorkommen von Pro1-ähnlichen Proteinen in unterschiedlichen Pilzen

Durch einen Vergleich gegen die Genome verschiedener Asco- und Basidiomyceten mittels des BLAST-Algorithmus konnten homologe (e-Werte kleiner e^{-30}) Proteine für folgende Pilze identifiziert werden: *Gibberella zeae*, *Magnaporthe grisea*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*. In *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*, *Coprinus cinereus* und *Ashbya gossypii* wurden keine Proteine mit signifikant ähnlichen Aminosäuresequenzen gefunden. Nur in den mit *A. nidulans* eng verwandten Arten *A. oryzae* und *A. fumigatus* fanden sich jeweils zwei Pro1-ähnliche Proteine, wie RosA und NosA in *A. nidulans*. Allerdings sind die Genome einiger der untersuchten Organismen bislang noch nicht komplett sequenziert, so dass zur Zeit nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass auch Pilze anderer Gattungen als *Aspergillus* zwei dieser homologen Proteine besitzen.

Abbildung 7 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum einiger ausgewählter Asco- und Basidiomyceten, beruhend auf einer Analyse der 18S ribosomalen RNA mittels des Arb-Programmes, der das Vorhandensein von Pro1-ähnlichen Proteinen verdeutlicht. Interessanterweise kommen diese Proteine nur in den *Sordariomycetes* und den *Eurotiomycetes* vor, und nur in der Gattung *Aspergillus* findet man zwei ähnliche Proteine.

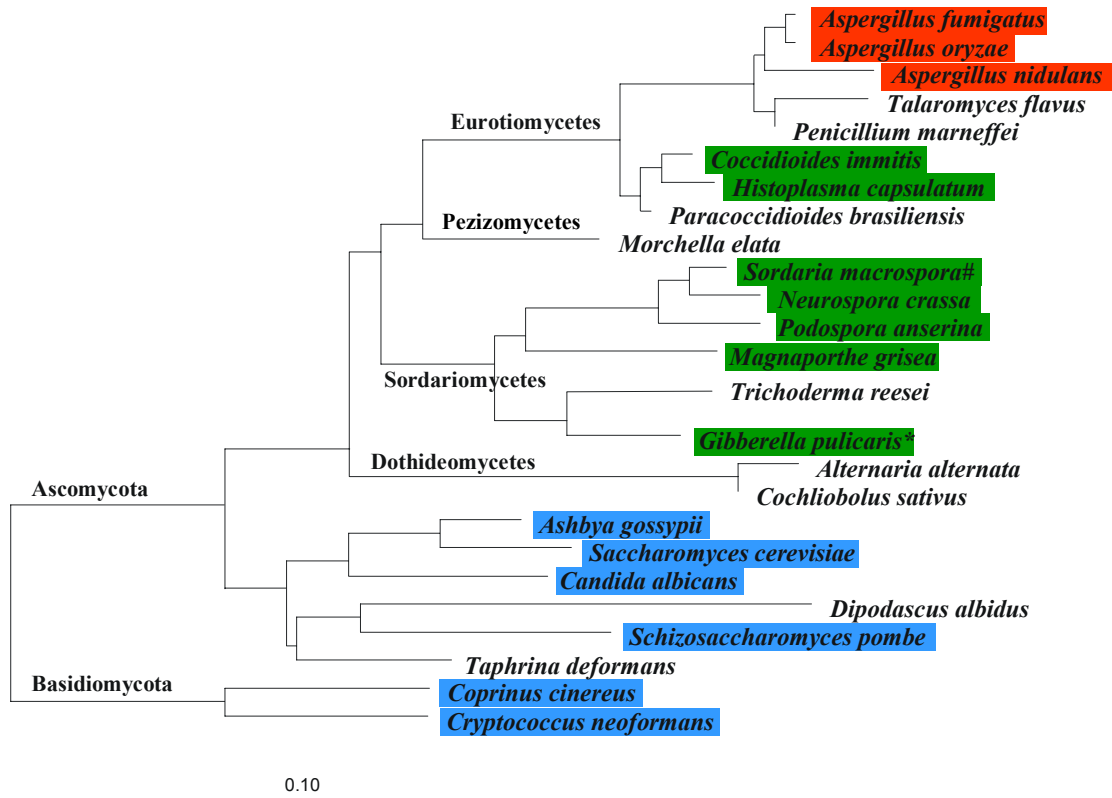


Abb. 7: Phylogenetischer Stammbaum einiger Pilze, beruhend auf der Analyse der 18S rRNA. Der Baum stellt einen Konsensusbaum verschiedener Pilze dar, der mit Hilfe des Programms ARB (Ludwig et al., 2004) unter Verwendung von sowohl Distanz (Neighbour-Joining)- als auch Positions (fastDNAML, TreePuzzle)-basierter Algorithmen rekonstruiert wurde. Rot sind Organismen mit zwei Pro1-ähnliche Proteinen gekennzeichnet; in grün gekennzeichnete Organismen wurde lediglich ein Pro1-ähnliches Protein nachgewiesen. In den blau gekennzeichneten Pilzen fand sich kein zu Pro1 homologes Protein. Die farblich nicht hervorgehobenen Organismen konnten wegen fehlender Genomdaten nicht überprüft werden, und wurden nur zur Vervollständigung des Baumes eingefügt. (# = *S. macrospora* Genom ist nicht sequenziert, die *pro1*-Mutante stammt aus diesem Organismus. * = nicht *Gibberella pulicaris*, sondern *G. zeae* wurde untersucht. Da die 18S rRNA von *G. zeae* nicht bekannt ist, wurde statt dessen die 18S rRNA Sequenz von *G. pulicaris* verrechnet.

1.5 Sequenzanalyse der putativen Proteine aus verschiedenen Pilzen

Nach einer ersten Untersuchung auf ein Vorhandensein von Pro1-ähnlichen Proteinen in verschiedenen Pilz-Genomen wurde die Phylogenie der identifizierten Proteinen aus *S. macrospora*, *N. crassa*, *G. zeae*, *M. grisea*, *A. nidulans*, *A. oryzae* und *A. fumigatus* rekonstruiert. Dabei ist zu beachten, dass nur für *A. nidulans*, *S. macrospora* und *N. crassa* die Sequenz der Proteine experimentell durch Bestimmung der Sequenz der cDNA bestätigt wurde. Die Proteine aus den Organismen *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *G. zeae* und *M. grisea* wurden in den annotierten Genomen gefunden, mussten jedoch manuell unter Zuhilfenahme

der bekannten Sequenzen „nachannotiert“ werden. Da die übrigen Genome nicht annotiert sind, wurden ähnliche Proteine mit Hilfe des Programmes tblastN über die *in silico* translatierte DNA gefunden. Die putativen Proteine aus *C. immitis* und *H. capsulatum* wurden manuell auf Grundlage der frei zugänglichen Genomsequenzen und mit Hilfe der bekannten Proteine RosA, NosA, Pro1 (*S. macrospora*) und Pro1 (*N. crassa*) annotiert. Dabei zeigte sich, dass auch in diesen Organismen ein Intron unmittelbar vor dem Zn(II)₂Cys₆ binukleären Cluster vorhergesagt wurde. Dabei wurde ein interessantes Merkmal der Introns aller Organismen gezeigt: Das für ein am Anfang des Zn(II)₂Cys₆ binukleären Clusters gelegenes, hochkonserviertes Glycin codierende Triplet, setzt sich aus einem Guanin vor dem Intron und zwei Basen nach dem Intron zusammen (zumindest bei *S. macrospora*, *N. crassa*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *C. immitis* und *H. capsulatum*). Weiterhin scheinen nur in den *Aspergillen* zwei Introns die codierenden Regionen zu unterbrechen, während in allen anderen Organismen nur ein Intron vorhanden ist.

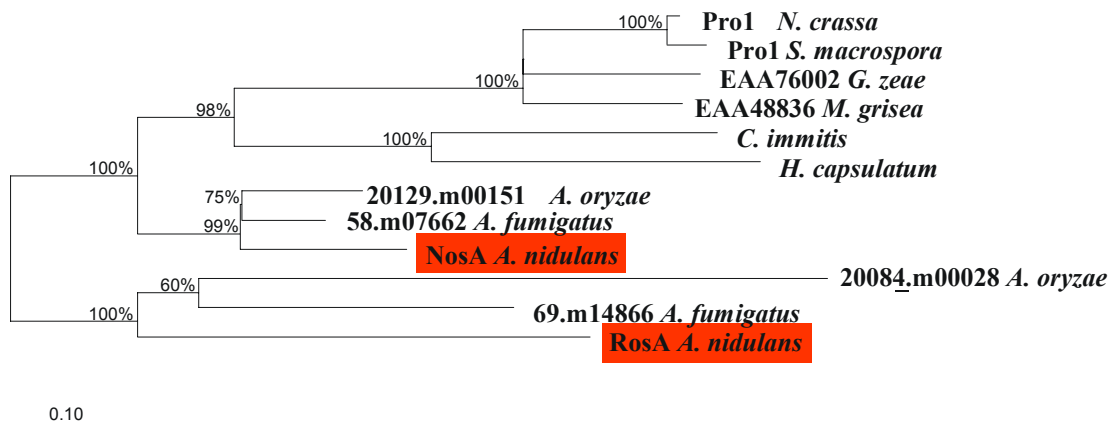


Abb. 8: Sequenzanalyse der putativen, *in silico* abgeleiteten „Pro1-ähnlichen“ Proteine. Die Phylogenie der Pro1-homologen Proteine korrespondiert zur Phylogenie der 18 S rRNA der jeweiligen Organismen (siehe Abb. 7), NosA aus *A. nidulans* weist eine höhere Ähnlichkeit zu den verrechneten Pro1-Sequenzen auf. RosA und seine beiden *Aspergillus*-Homologe sind weniger stark konserviert, was an den im Vergleich zur NosA-Linie deutlich längeren Astlängen erkennbar ist. Der Baum wurde mit dem Programm ARB sowohl mittels Distanz- als auch Positions-basierter Algorithmen unter Verwendung verschiedener Evolutionsmodelle berechnet. Der Balken mit 0.1 bedeutet eine 10% Sequenzabweichung. Es ist zu beachten, dass ein Grossteil der hier dargestellten Proteine hypothetisch sind (siehe Text).

2. Molekulare Analyse von *rosA*

2.1 Deletionsanalyse von *rosA*

Um Einblicke in die Funktion von RosA zu bekommen, wurde das Gen in *A. nidulans* deletiert. Dies erfolgte mittels homologer Rekombination, wobei der ORF von *rosA* gegen das *argB* Gen aus *A. nidulans* ersetzt wurde (pKV18, Herstellung des Konstruktes ist im Material und Methoden Teil beschrieben). Das linearisierte *rosA*-Deletionskonstrukt wurde in den Arginin-auxotrophen Stamm SRF200 transformiert und die Transformanden nach Rekombinationsereignissen mit der daraus resultierenden Gendeletion untersucht. Dies erfolgte mittels DNA-DNA-Hybridisierungsexperimenten. Unter ca. 80 untersuchten Transformanden fand sich ein *rosA* Deletionsstamm (SKV8) (siehe Abb. 9). Weitere Tests mit unterschiedlichen Restriktionsschnitten und mittels PCR bestätigten die Deletion. Zusätzlich wurde mit einer *argB*-Sonde eine einfache Integration des Deletionskonstruktes gezeigt.

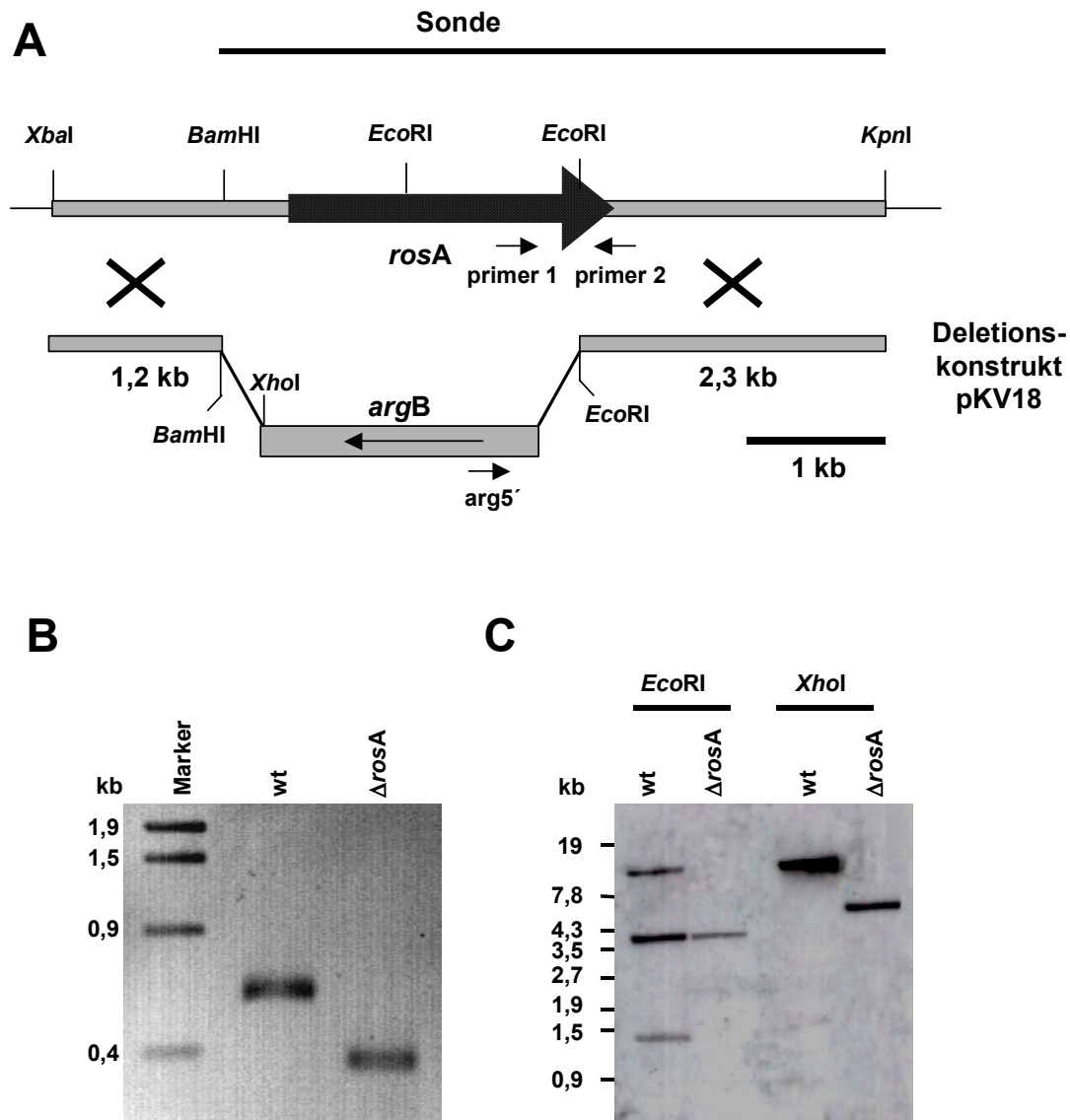


Abb. 9: Deletionsschema von *rosA*. **A:** Genlokus von *rosA* und darunter das Deletionskonstrukt, in dem der ORF mit *Bam*HI und *Eco*RI ausgeschnitten und stattdessen das *argB*-Gen eingefügt wurde. **B:** PCR mit den drei Oligonukleotiden primer1, primer2 und *arg5'*. Im Wildtyp entsteht ein ca. 600 bp großes Fragment (primer1+ primer2), im Deletionsstamm ein ca. 400 bp Fragment (*arg5'*+ primer2). Bei einer ektopischen Integration sollten beide Fragmente amplifiziert werden. **C:** DNA-DNA-Hybridisierung von genomischer DNA mit einer „random priming“ ³²P-markierten Sonde (zu sehen in A). wt = SRF200, Δ *rosA* = SKV8.

2.1.1 Phänotypische Charakterisierung des Δ *rosA*-Stammes

Der *rosA*-Deletionsstamm wurde auf Entwicklungsprozesse wie Konidien-, Kleistothezien-, und Ascosporenentwicklung hin untersucht. Es fanden sich jedoch keine Unterschiede

zwischen einem vergleichbaren *A. nidulans* Wildtypstamm und der Mutante. Unter Standardlaborbedingungen auf Agar-Platten fanden sich keine offensichtlichen Unterschiede.

Da der *rosA* Deletionsstamm, so wie fast alle Laborstämme von *A. nidulans* eine Mutation im *veA* Gen trägt, die eine Reduktion der sexuellen, und gleichzeitig eine verstärkte asexuelle Entwicklung zur Folge hat, wurde ein $\Delta rosA$ -Stamm mit einem intakten *veA* Gen (*veA*⁺) erzeugt. Dafür wurde der Stamm SKV8 mit dem Stamm WIM126 gekreuzt. Nachkommen dieser Kreuzung wurden auf ihren *veA* Genlocus untersucht, indem der die Mutation beinhaltende Teil des *veA*-Gens amplifiziert (Oligonukleotide *veA*-Anfang-for und *veA*-Anfang-rev) und anschließend sequenziert wurde. Die *rosA* Deletion wurde mit einem DNA-DNA-Hybridisierungsexperiment bestätigt. Die Stämme SKVw3 und SKVw5 (beide $\Delta rosA$, *veA*⁺) wurden im Folgenden mit dem *A. nidulans* Wildtyp FGSC A4 verglichen.

Die Kleistothezienentwicklung ist in *A. nidulans* von Licht abhängig. Im Wildtyp ist die sexuelle Entwicklung bei kontinuierlicher Lichtbestrahlung blockiert. Auch in der Mutante findet keine sexuelle Entwicklung statt (Abb. 10). Unter Bedingungen, welche die sexuelle Entwicklung fördern (Wachstum im Dunkel, Petrischalen mit Klebeband geschlossen), ist in der Mutante eine schwache Erhöhung der Kleistothezienanzahl zu beobachten.

Ein weiterer Faktor, der die sexuelle Entwicklung beeinflusst, ist die Versorgung mit Kohlenhydraten. Bei geringer Versorgung mit C-Quellen kann *A. nidulans* vegetativ wachsen, und es findet nur asexuelle Entwicklung statt. Diese Regulierung ist in der Mutante gestört. Interessanterweise findet die sexuelle Entwicklung in der Mutante trotz niedriger Glukosekonzentration statt. Die Reprimierung der Entwicklung unter niedrigen Glukosewachstumsbedingungen ist offensichtlich aufgehoben. Die Fruchtkörper bilden sich vornehmlich in den Randgebieten einer wachsenden Kolonie. Die Entwicklung dieser Fruchtkörper ist komplett; in den geöffneten Kleistothezien finden sich Asci mit reifen, rot gefärbten Ascosporen.

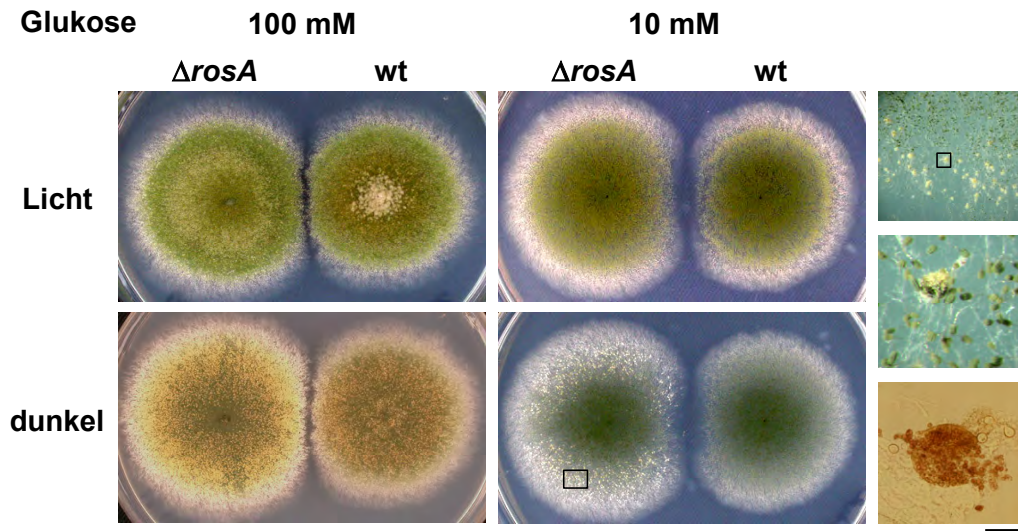


Abb. 10: Wachstum und Entwicklung der *rosA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Stamm SKVw3 ($\Delta rosA$, *ve+*) und FGSC A4 (wt) wurden auf MM Agar punktinokuliert und für 5 Tage bei Dauerlicht oder in Dunkelheit bei 37°C inkubiert. Die Glukosekonzentration wurde dabei variiert (100 mM Glukose ist Standard, 10 mM Glukose ist die reduzierte Bedingung). Bei Dauerlicht findet unter beiden Glukosekonzentrationen keine sexuelle Entwicklung statt, im dunkeln bei Standardglukosekonzentration zeigt die Mutante leicht stärkere Entwicklung (zu erkennen durch die gelbe Farbe der Hüllezellnester), bei reduzierter Glukose sieht man sexuelle Strukturen nur im $\Delta rosA$ -Stamm. **Rechte Spalte** oben: Vergrößerung der Kleistothezien; Mitte: reifes, schwarzes Kleistothezium; unten: gequetschtes und somit geöffnetes Kleistothezium unter dem Mikroskop. Die reifen, rot gefärbten Ascosporen sind gut zu erkennen. Größenbalken entspricht bei Koloniebildern ca. 1 cm, beim geöffneten Kleistothezium ca. 150 μ m.

Das Phänomen der deregulierten sexuellen Entwicklung tritt auch zutage, wenn die Stickstoffquelle des Standardmediums (100 mM NaNO_3) reduziert (10 mM NaNO_3) oder gegen andere Stickstoffquellen wie Ammoniumacetat getauscht wird (Abb. 11 A). Ebenso formen sich im Mutantenstamm reife Fruchtkörper auf Mediumsplatten mit 0,6 M KCl, eine Wachstumsbedingung, die im Wildtyp die sexuelle Entwicklung hemmt. Eine Northern-Blot-Analyse des *rosA* Transkriptes zeigt auch, dass unter Kohlenstoff- und Stickstoffmangel *rosA* transkribiert wird, in Flüssigkultur mit Standardmedium aber nicht. Die Kulturen wurden 16 Stunden schüttelnd im Minimalmedium wachsen gelassen, dann gewaschen und weitere drei Stunden mit Medium ohne Glukose, bzw. ohne Stickstoffquelle inkubiert. Das Transkript ist wesentlich stärker in der Kultur ohne Glukose zu sehen (Abb. 11 B).

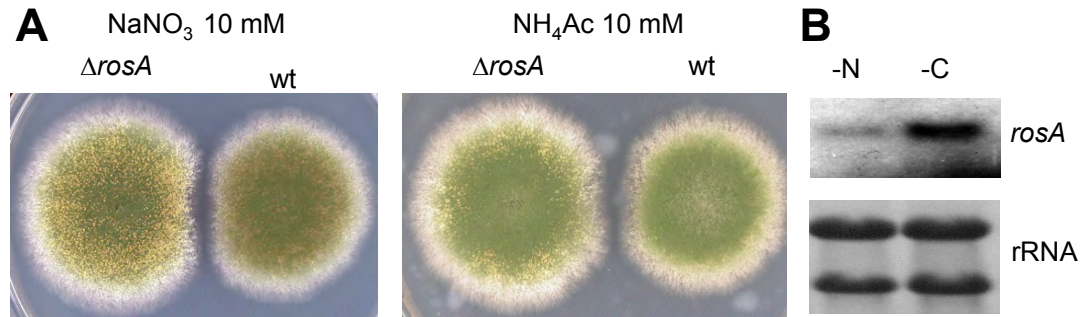


Abb. 11: A: Wachstum der *rosA*-Mutante bei unterschiedlichen Stickstoffquellen, bzw. -mengen. A: Stamm SKVw3 ($\Delta rosA$, *ve+*) und FGSC A4 (wt) wurden punktiniokuliert, und 5 Tage im Dunkeln inkubiert. Sowohl bei reduzierter N-Menge im Medium (10 mM NaNO_3), als auch bei einer anderen N-Quelle (NH_4 -Acetat) ist eine deutlich stärkere sexuelle Entwicklung festzustellen. B: Expression von *rosA* unter Glukose und Stickstoffmangel. Vegetativ wachsendes Myzel, 16 Stunden in Flüssigkultur, wurde drei Stunden ohne Glukose, bzw. ohne Stickstoff im Medium inkubiert, anschließend RNA extrahiert, ca. 10 μg auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und per Northern-Blot mit einer *rosA*-spezifischen, ^{32}P -markierten Sonde hybridisiert. Auf der unteren Spur ist die rRNA nach der Überführung auf die Membran als Ladekontrolle mit Methyleneblau gefärbt. In unbehandelten Myzel findet sich kein *rosA* Transkript (siehe Abb. 16).

Die Regulation der sexuellen Entwicklung in der *rosA*-Mutante weist einen weiteren Unterschied zu einem Wildtyp auf. So findet man normalerweise in *A. nidulans* keine morphologische Differenzierung (weder sexuelle noch asexuelle Entwicklung) in Flüssigkulturen. Um die Entwicklungsprogramme zu starten, wird eine Boden-Luft, bzw. Flüssigkeits-Luft Zone benötigt. Ist diese nicht gegeben (wie in einer ständig in Bewegung gehaltenen Flüssigkeit), wächst der Pilz vegetativ und filamentös. Der *rosA*-Deletionsstamm und der Wildtyp wurden schüttelnd inkubiert, und hinsichtlich morphologischer Unterschiede untersucht. Nach ca. 48 Stunden Wachstum finden sich auf und in den Myzelbällchen des $\Delta rosA$ -Stammes viele Hüllezellen (Abb. 12). Das Erscheinen dieser dickwandigen Zellen ist der erste Schritt in der sexuellen Entwicklung von *A. nidulans*. Sie bilden während der normalen Entwicklung auf einer Agar-Platte sogenannte Nester, in denen sich dann der Fruchtkörper entwickelt. Diese erste Stufe der sexuellen Entwicklung findet sich nun unter einer Bedingung, in der die Entwicklung normalerweise gehemmt ist. Reife Kleistothezien wurden allerdings nie gefunden, auch wenn die Inkubation auf bis zu sieben Tage mit zusätzlicher Glukose ausgedehnt wurde.

Um zu überprüfen, ob diese Hüllezellen funktionsfähig sind, wurde die Expression einer Hüllezell-spezifischen Mutanase untersucht (Wei et al., 2001). Dazu wurde ein Konstrukt, in dem der Mutanase-promotor vor einem GFP liegt (pMut(p)-GFP) in einen *rosA*-Deletionsstamm (SKV8) transformiert. Daraus resultierte der Stamm SKV30. Tatsächlich zeigten ca. 10% der dickwandigen Zellen in Flüssigkultur Fluoreszenz (Abb.12 D). Diese Anzahl entspricht ungefähr den leuchtenden Hüllezellen des Wildtyps auf festem Medium.

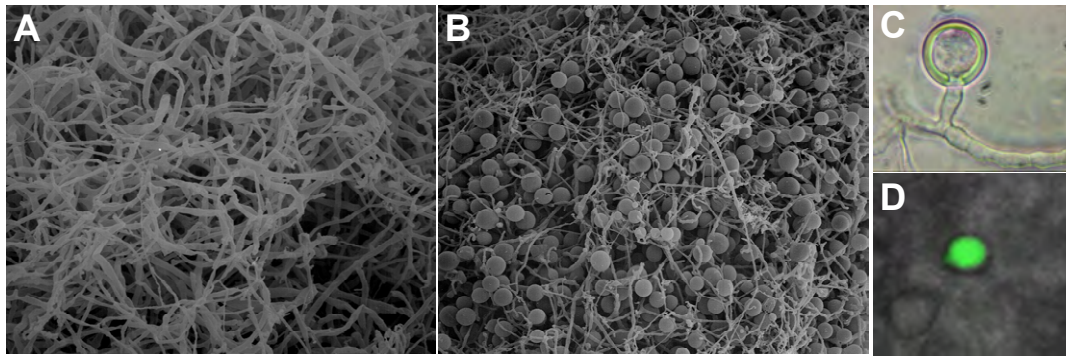


Abb. 12: Wachstum eines $\Delta rosA$ -Stammes in Flüssigkultur im Vergleich zum Wildtyp. A: Wildtyp (FGSC26) wächst vegetativ, während der $\Delta rosA$ -Stamm SKV30 (B) eine große Anzahl Hüllezzellen produziert. (Rasterelektronenmikroskopaufnahmen) C: Eine dickwandige Hüllezzelle vergrößert im Phasenkontrast. D: GFP-Fluoreszenz in einer Hüllezzelle durch MutA(p)-GFP. (Overlay eines Fluoreszenz- und Hellfeld-Bildes).

Im Gegensatz zur dereprimierten Entwicklung der $\Delta rosA$ -Mutante auf festem Medium ist die Hüllezzellbildung in Flüssigkultur vom *veA*-Gen unabhängig und findet sich sowohl in *veA1*, als auch in *veA*⁺ Stämmen.

2.1.2 Molekulare Analyse der Hüllezzellbildung in Flüssigkultur

Das Phänomen der Hüllezzellbildung in Flüssigkultur wurde bereits für zwei andere Regulatoren der sexuellen Entwicklung beschrieben. Werden *veA* oder *nsdD* überexprimiert, so bilden sich viele Hüllezzellen in Flüssigkultur, bei der Überexpression von *veA* sogar reife Kleistothezien.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Genen zu klären, wurden die entsprechenden Transkripte $\Delta rosA$ -Stamm während der Hüllezzellbildung in Flüssigkultur untersucht. Zusätzlich zu *veA* und *nsdD* wurde das *stuA*-Gen untersucht. Dabei handelt es sich um einen Regulator, welcher sowohl für die sexuelle, als auch die asexuelle Entwicklung notwendig ist (Miller et al., 1992). Es wurde RNA aus einem Wildtyp- und einem *rosA*-Deletionsstamm (FGSC A4, bzw. SKVw3) zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstums in einer Northernblot-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass *nsdD*, *veA* und *stuA* in der Mutante verstärkt transkribiert werden (Abb. 13). Im Fall von *veA* ist der Unterschied nicht so groß wie für *nsdD*. Das Transkript von *stuA*, welches Hüllezzellen-spezifische Gene induziert (Scherer et al., 2002), ist besonders nach 72 Stunden hochreguliert.

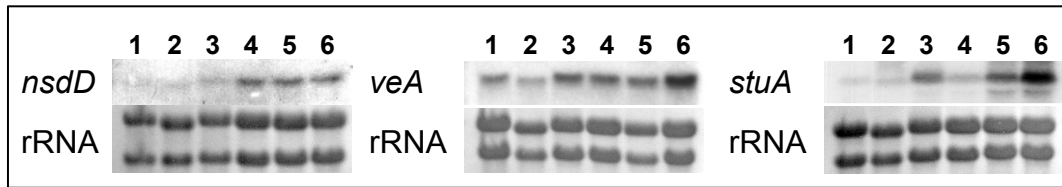


Abb. 13: Die Expression dreier Regulatoren der Entwicklung in Flüssigkultur. Northern-Blot-Analyse der *rosA*-Mutation im Vergleich zum Wildtyp. 1: wt 24 Std.; 2: wt 48 Std.; 3: wt 72 Std.; 4: $\Delta rosA$ 24 Std.; 5: $\Delta rosA$ 48 Std.; 6: $\Delta rosA$ 72 Std. Jeweils 10 μ g RNA wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit für die Gene spezifischen 32 P-markierten Sonden hybridisiert. Als Ladekontrolle wurde die Membran nach dem RNA-Transfer mit Methylblau gefärbt.

2.2 Überexpression von *rosA*

Um weitere Informationen über die Funktion von *rosA* zu erlangen, wurde es überexprimiert. Dies geschah mit Hilfe des stark induzierbaren Promotors der Alkohol-Dehydrogenase *alcA*. Der *alcA* Promotor wird mit Glukose reprimiert, und mit Ethanol oder Threonin induziert. Es wurde ein Vektor konstruiert, in dem der *rosA* ORF unter der Kontrolle des *alcA* Promotors steht, und der *argB* als Selektionsmarker enthält (pKV12). Dieser wurde in einen Arginin-auxotrophen Stamm (RMS011) transformiert.

Die Transformanten wurden auf festem Medium mit Glukose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle wachsen gelassen. Dabei zeigten die Transformanten unter induzierten Bedingungen (Wachstum auf Ethanol) einen drastischen Phänotyp. Die Transformanten wuchsen langsamer als der Ursprungsstamm RMS011 und bildeten große Mengen an vegetativem Luftmyzel (Abb. 14). Während der Ursprungsstamm nach ca. 18 Stunden asexuelle Sporenträger mit Konidien ausbildet, blieben die *rosA*-Überexpressionsstämme rein vegetativ, zeigten also weder sexuelle, noch asexuelle Entwicklung. Ein vergleichbarer sogenannter „fluffy“ Phänotyp ist bereits von einigen entwicklungsspezifisch gestörten *A. nidulans*-Mutanten bekannt und beschrieben (Adams et al., 1992). Erst nach Wachstum von 6-7 Tagen fanden sich einige wenige Sporenträger auf den Kolonien der *rosA*-Überexpressionstämme. Allerdings ist zu diesem Zeitpunkt das Ethanol im Medium vermutlich fast aufgebraucht, und somit die *rosA*-Transkription nicht mehr sonderlich hoch. Unter reprimierenden Wachstumsbedingungen (Glukose im Medium) zeigten die Überexpressionstämme normales Wachstum und normale Entwicklung. Sie unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Abb. 14).

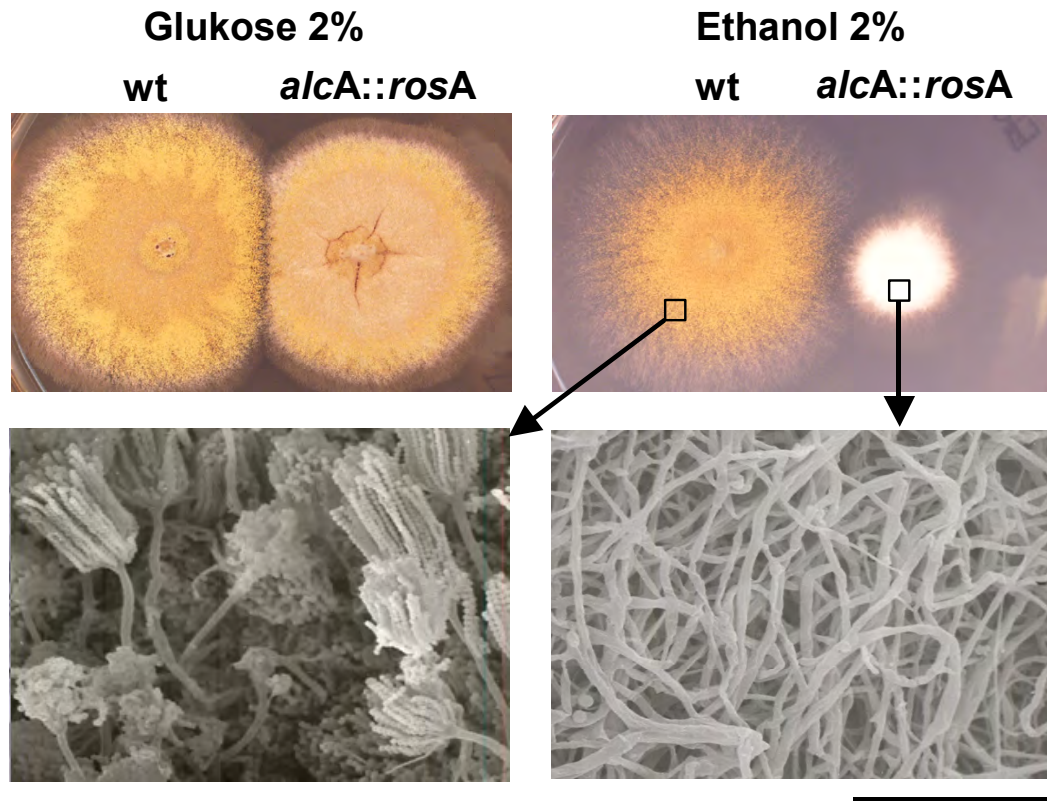


Abb. 14: Überexpression von *rosA*. Oben: Unter reprimierenden Bedingungen (2% Glukose, linke Seite) ist kein Unterschied zwischen Wildtyp und dem *rosA*-Überexpressionsstamm (SKV6) zu erkennen, während bei starker *rosA*-Überexpression (2% Ethanol) die Entwicklung komplett stoppt, und nur vegetativ wachsendes Myzel zu erkennen ist. Unten: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen des Wildtyps (RMS011, links) und des Überexpressionstammes (SKV6, rechts).

Die Überexpressionsstämme wurden auf eine einfache Integration des Konstruktes ins Genom mittels Southern-Blot-Analyse untersucht, um die Möglichkeit auszuschließen, dass dieser Phänotyp durch ektopische Integrationen des Konstrukts in andere Gene oder sehr häufige Integrationen ins Genom entstanden ist. Weiterhin wurde die vollständige Integration des ORF mittels PCR, und die Induktion der Transkription per Northern-Blot-Analyse überprüft (Abb. 15).

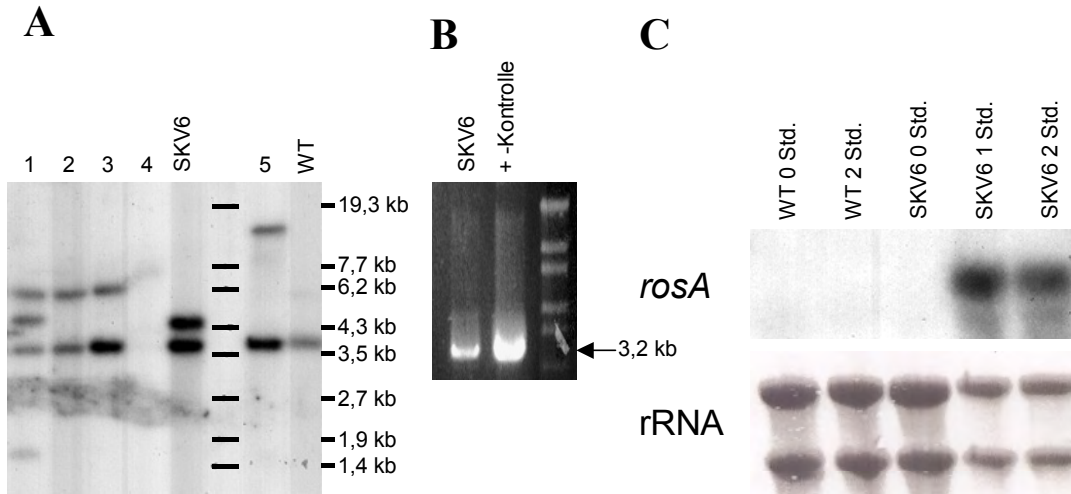


Abb. 15: Molekulare Analyse eines *rosA*-Überexpressionsstammes. (A) Einige *rosA*-Überexpressionsstämme (1-5 und SKV6) und Wildtyp FGSC26 wurden mittels Southern-Blot-Analyse untersucht. Genomische DNA wurde mit *EcoRV* geschnitten und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Der *EcoRV*-Schnitt liegt kurz vor dem *rosA*-ORF, somit sollte bei jeder Integration ein unterschiedlich langes Fragment zusätzlich zur Wildtyp-*rosA*-Bande sichtbar werden. Die Detektion erfolgte mit einer ^{32}P -markierten *rosA*-spezifischen Sonde. (B) Mit genomischer DNA des Stammes SKV6 als Template wurde eine PCR mit je einem Oligonukleotid am Anfang des *alcA*-Promotors (Primer *alcA1*) und am Ende des *rosA*-Gens (Primer *RosA-3'*) durchgeführt, um die komplette Integration nachzuweisen. Dabei sollte ein 3,2 kb großes Fragment amplifiziert werden. Als Positivkontrolle wurde das Überexpressionskonstrukt pKV12 als PCR-Vorlage genutzt. (C) Northern-Blot-Analyse: Vegetatives Myzel wurde 18 Stunden in Flüssigkultur inkubiert, dann gewaschen und mit 2% Ethanol induziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion wurde das Myzel geerntet und die RNA isoliert. 5 μg der RNA wurden auf einem 1,2%igen Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit einer ^{32}P -markierten *rosA* spezifischen Sonde. WT: Wildtyp FGSC A4; SKV6: *rosA*-Überexpressionstamm.

2.3 Expression eines konstitutiv aktiven *fadA*-Allels

Da die Überexpression von *rosA* zu einem sogenannten „fluffy“-Wachstum führte, sollte getestet werden, ob *rosA* eine Rolle in dem regulatorischen Signalweg der fluffy-Mutanten spielt. Ein Gen, das bereits beschrieben ist, ist *fadA*, welches die α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins kodiert (Yu et al., 1996). Ein konstitutiv aktives Allel dieses Gens führt bei Expression in einem *A. nidulans* Wildtypen zu einem „fluffy“-Phänotyp (Wieser et al., 1997). Sollte dieser Signalweg über den putativen Transkriptionsfaktor RosA laufen, so sollte in einem $\Delta rosA$ -Stamm das konstitutiv aktive *fadA*-Allel kein „fluffy“-Wachstum verursachen können.

Das konstitutiv aktive *fadA*-Allel tragende Plasmid (pYU8), wurde in den $\Delta rosA$ -Stamm SKV8 mit dem *pyr4* tragenden Plasmid pRG1 kotransformiert. Dies geschah, um eine Selektion der Transformanten möglich zu machen, da das Plasmid pYU8 selbst keinen Selektionsmarker trägt. Ca. 40% der Transformanten zeigten das *fadA*-typische „fluffy“-

Wachstum. Der gleiche Prozentsatz an „fluffy“-wachsenden Transformanten wurde bei einer Kotransformation von pYU8 und pRG1 in den *A. nidulans* Wildtypstamm SRF200 erreicht. Der FadA-Signalweg scheint also unabhängig von *rosA* zu sein.

2.4 Expression von *rosA* während der Entwicklung

Gene, die spezifisch an der Regulation von Entwicklungsvorgängen beteiligt sind, werden häufig selbst auf Transkriptionsebene reguliert, um ihre Funktion während des Entwicklungsvorganges zu steuern. Für die asexuelle und sexuelle Entwicklung in *A. nidulans* trifft dies ebenfalls zu. So wurde bereits gezeigt, wie während der Konidiophorbildung die Transkription einer Vielzahl von sporulationsspezifischen Regulator- und Zielgenen stimuliert wird (Aramayo & Timberlake, 1993; Birse & Clutterbuck, 1991; Boylan et al., 1987; Mayorga & Timberlake, 1990). Auch in der sexuellen Entwicklung gibt es einige Beispiele für transkriptionell regulierte Zielgene (Lara-Ortiz et al., 2003; Scherer, et al., 2002; Wei, et al., 2001; Wei et al., 2004). Da *rosA* anscheinend als ein Repressor der sexuellen Entwicklung fungiert, wurde RNA während der asexuellen und sexuellen Entwicklung untersucht. Zusätzlich wurden auch Hungerbedingungen, osmotischer Stress und die Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffverbindungen betrachtet (siehe Abb. 16). Als interne Kontrolle für die entwicklungspezifische RNA wurde *rodA* genutzt. Dieses Gen kodiert für ein auf den Konidien exponiertes Hydrophobin, und wird somit während der späten asexuellen Entwicklung exprimiert (Stringer et al., 1991). Zusätzlich wurde die Nylon-Membran nach dem Transfer der RNA mit Methylenblau gefärbt.

Tatsächlich findet sich eine transiente Expression von *rosA*. Die stärkste Expression findet sich 12 Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung. Zu diesem Zeitpunkt haben sich schon Konidiophore entwickelt und produzieren bereits Konidien. Des Weiteren wird *rosA* als schnelle Antwort des Pilzes auf Hunger transkribiert, bei lang anhaltendem Hunger jedoch findet sich kein Transkript. Auch während der sexuellen Entwicklung ist kein *rosA*-Transkript detektierbar.

Interessanterweise wird *rodA* nicht nur während der asexuellen Entwicklung, sondern auch nach lang anhaltendem Hunger, transkribiert.

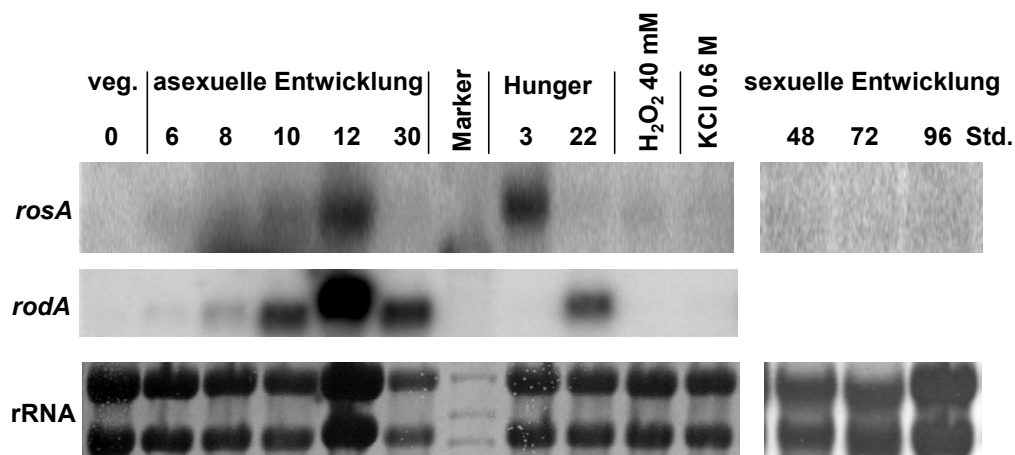


Abb. 16: Transiente Expression von *rosA* während der Entwicklung und unter Hungerbedingungen. Der Stamm FGCS26 wurde synchron für Entwicklung induziert, und die RNA nach den genannten Zeitpunkten extrahiert. Zur Gewinnung von hunger- und stressinduzierter RNA wurden Flüssigkulturen nach 18 Std. Wachstum weitere 3, bzw. 22 Stunden ohne Glukose, bzw. mit 40 mM H₂O₂ oder 0,6 M KCl inkubiert. Sonden wurden mit ³²P radioaktiv markiert. Hybridisierung der Membran erfolgte erst mit der *rosA*-Sonde, nach der Detektion (7 Tage Film aufgelegt) erfolgte dann die Hybridisierung und Detektion mit der *rodA*-Sonde (1 Tag Film aufgelegt).

Da das *rosA*-Transkript im Northern-Blot nur sehr schwer zu detektieren war, und aus den Überexpressionsversuchen bereits bekannt war, dass selbst geringe Mengen von *rosA* einen drastischen Einfluss auf das Wachstum des Pilzes haben, wurde mittels RT-PCR auch der Nachweis geringer Mengen des *rosA*-Trankripts untersucht. Dafür wurde entwicklungsspezifische RNA mit Hilfe reverser Transkriptase (Superscript 3; Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dann wurde der 5'-Bereich von *rosA*, der zwei Introns beinhaltet, mittels der Oligonukleotide RosA-for-*AscI* und RosA-rev1 amplifiziert. Da keine PCR-Produkte zu erkennen waren, wurde mit zwei Oligonukleotiden (RosA-for-*AscI* und RosA-rev2), von denen sich einer in dem bereits amplifizierten Bereich befindet mit der ersten PCR als Vorlage, eine erneute Amplifikation durchgeführt („nested PCR“). In Abb. 17 erkennt man eine Doppelbande im vegetativ wachsenden Myzel (Spur 2) und nach 26 Stunden Wachstum auf festem Medium, also in der späten asexuellen Entwicklung (Spur 3). Diese Doppelbanden kommen durch das Vorhandensein von geringen Mengen genomischer DNA neben der cDNA zustande. Da in der cDNA die Introns bereits entfernt sind, ist das Amplifikat kleiner. Zur Bestätigung wurde das jeweils kleinere DNA-Fragment in den Vektor pCR2.1 TOPO kloniert und sequenziert. Tatsächlich handelt es sich bei dem kleineren Fragment um die *rosA* cDNA ohne Introns.

Während der sexuellen Entwicklung, nach 72, 96 und 120 Stunden Wachstum auf Agarmedium (Spuren 4-6), findet sich nur das größere Fragment der genomischen DNA. Da

diese Fragmente allerdings erst nach der zweiten Amplifikation der „nested PCR“ zu detektieren waren, ist davon auszugehen, dass die Verunreinigung der cDNA nicht zu stark war. Als Test, ob in diesen Proben die RNA nicht vor der Synthese der cDNA abgebaut war (obwohl die rRNA-Banden im Northern-Blot gut aussahen, siehe Abb. 16), wurde ein Bereich des *nosA*-Gens, der zwei Introns beinhaltet mit den Oligonukleotiden NosA-Kpn-for und NosA-intseq-rev2 amplifiziert (Spur 8, Spur 9 genomische DNA). Man erkennt deutlich zwei unterschiedlich große Fragmente, die durch die Amplifikation von genomischer DNA und cDNA entstehen. Die Synthese der cDNA war also erfolgreich.

Zusätzlich zu der Expression in der späten asexuellen Entwicklung, unter Hunger und ohne Stickstoff (Abb. 11), wird *rosA* also schwach auch während des vegetativen Wachstums und in der sehr späten asexuellen, nicht aber während der sexuellen Entwicklung, transkribiert.

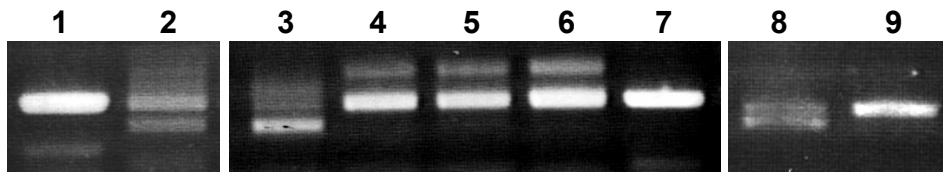


Abb. 17: Nachweis der Expression von *rosA* mittels RT-PCR. Der zwei Introns beinhaltende Teil von *rosA* wurde mittels „nested PCR“ von cDNA verschiedener Entwicklungsstadien amplifiziert. 1: genom. DNA; 2: veg. Wachstum, 18 Std.; 3: asexuelle Entwicklung 26 Std.; 4: sexuelle Entw., 72 Std.; 5: sex. Entw., 96 Std.; 6: sex Entw., 120 Std.; 7: genom. DNA; 8: Amplifikation von *nosA* als Test der cDNA, sex Entw. 72 Std.; 9: genom. DNA. Die kleineren Fragmente bei Doppelbanden sind jeweils das von cDNA amplifizierte Fragment der Gene, was durch Sequenzierung gezeigt wurde.

2.5 Intrazelluläre Lokalisierung von RosA

In der Proteinsequenz von RosA findet sich, überlappend mit dem $Zn(II)_2Cys_6$ binukleären Cluster, ein zweiteiliges Kernlokalisierungsmotiv (As 44-61). Um zu überprüfen, ob der putative Transkriptionsfaktor tatsächlich im Kern lokalisiert, wurde eine C-terminal mit dem grünfluoreszierenden-Protein (GFP) fusionierte Version des RosA hergestellt (pKV36). Mit diesem Fusionsprotein, das sich unter Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors befindet, sollte eine *in vivo* Lokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich sein. Interessanterweise war mit diesem C-terminalen GFP fusionierten RosA unter verschiedensten Induktionsbedingungen keine Fluoreszenz detektierbar.

Deshalb wurde ein weiteres RosA-GFP-Fusionsproteinkonstrukt erstellt. Diesmal erfolgte die GFP-Fusion allerdings am N-Terminus des Proteins (pKV50, siehe Material und

Methoden). Mit diesem Konstrukt transformierte *Aspergillus*-Stämme zeigten bereits unter schwach induzierbaren Bedingungen (2% Glycerin im Medium) starke Fluoreszenz. Wider den Erwartungen lokalisierte das GFP-RosA Fusionsprotein im gesamten Zytoplasma der Hyphen. Im Gegensatz zu anderen im Zytoplasma lokalisierenden Proteinen war die Kernregion nicht ausgespart, sondern zeigte ebenfalls Fluoreszenz (Abb. 18). Da bei manchen Transkriptionsfaktoren eine Regulation ihrer Funktion auch durch den Kerneintritt, bzw. die Verhinderung eben dieses stattfindet (Mingot et al., 2001), wurde bei unterschiedlichsten Bedingungen die Lokalisierung untersucht, wie z.B. Wachstum auf Festmedium, in Flüssigkultur, verschiedene Stadien der Entwicklung oder Hungerinduktion. Ebenso wurde in einem *veA* und einem *veA*⁺-Stamm gearbeitet, da sich die Deletion von *rosA* am stärksten in einem *veA*⁺-Stamm auswirkte. Allerdings wurde überall dieselbe Lokalisierung im Zytoplasma gefunden.

Anschließend wurden verkürzte GFP-Fusionsproteine erstellt, um deren Lokalisierung zu untersuchen. So entstanden insgesamt fünf N-terminal mit GFP fusionierte Fragmente von RosA unterschiedlicher Länge (pKV48, pKV50, pKV57; pKV58, pKV60). In Abbildung 18 erkennt man deutlich die unterschiedlichen Lokalisierungen der Fusionsproteine. Verkürzt bis auf eine Länge von 449 Aminosäuren, lokalisieren die Fusionsproteine immer noch im Zytoplasma. Sind jedoch nur noch die ersten 294 Aminosäuren mit GFP fusioniert, so lokalisiert das C-terminal stark verkürzte Protein hauptsächlich im Kern, und nur noch schwach im Zytoplasma. Bei noch stärkerer Verkürzung auf 80 Aminosäuren (die aber immer noch die Kernlokalisierungsdomäne und das Zn(II)₂Cys₆ binukleäre Cluster beinhalten), zeigt sich ebenso eine starke Akkumulierung im Kern. Die Kerne im Myzel wurden dabei mit dem dsRedT4-Protein, fusioniert mit der *stuA*-Kernlokalisierungsdomäne (Plasmid pJH19), sichtbar gemacht.

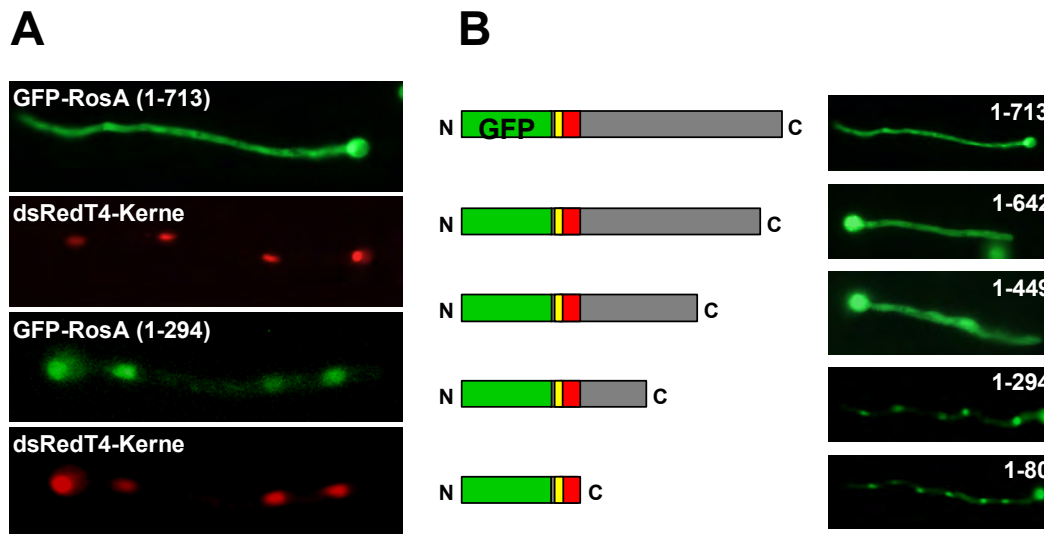


Abb. 18: Intrazelluläre Lokalisierung von RosA. (A) Das GFP-RosA-Protein in kompletter Länge (1-713) findet sich im Zytoplasma, wobei die Kerne nicht ausgespart sind. Ein verkürztes GFP-RosA (1-294) lokalisiert hauptsächlich in den Zellkernen. Die Zellkerne wurden mit Kern-lokalisiertem dsRedT4 sichtbar gemacht. (B) Verschiedene verkürzte GFP-RosA Proteine und ihre intrazelluläre Lokalisierung. Schematische Darstellung der Proteine, wobei die rote Box das Zn(II)₂Cys₆ binukleäre Cluster, die gelbe Box die zweigeteilte Kernlokalisierungsdomäne, und die grüne Box das grün fluoreszierende Protein zeigt. Die Anzahl der erhaltenen Aminosäuren ist jeweils oben rechts im Keimlingsbild zu sehen. Keimlinge wurden ca. 10 Stunden auf Deckgläschen bei 37°C in ethanolhaltigem Medium inkubiert.

Aus den Lokalisierungsexperimenten mit den verkürzten RosA-Proteinen ließ sich erkennen, dass die Region von Aminosäure 294 bis 449 einen Eintritt der Fusionsproteine in den Kern erschwert. Um die Funktion zu überprüfen, wurde diese Region des RosA (As 294-449) C-terminal mit der Kernlokalisierungsdomäne des Regulators StuA fusioniert (pKV71). Diese wird schon seit längerer Zeit routinemäßig zur Kernlokalisierung in *A. nidulans* genutzt (Suelmann et al., 1997). Tatsächlich zeigte sich ein Effekt des RosA-Fragments auf die Lokalisierung. In Abb. 19 erkennt man deutlich, dass ein stärkerer Anteil der Fluoreszenz im Zytoplasma zu finden ist, auch wenn die Kerne immer noch, im Gegensatz zu dem GFP-RosA (As 1-449), starke Fluoreszenz zeigen.

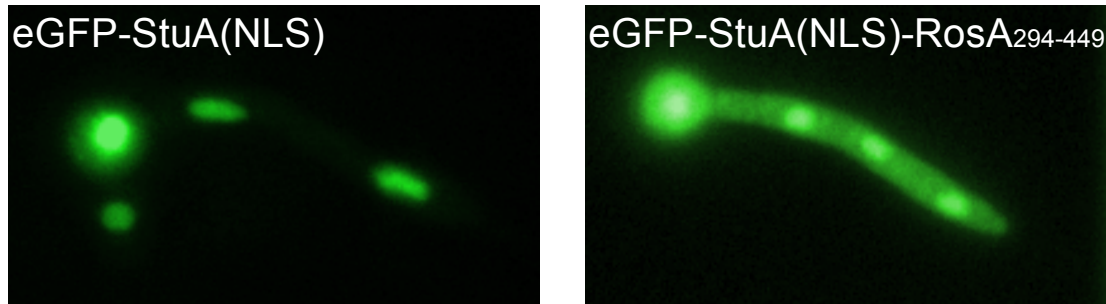


Abb. 19: Inhibierung des Transports des GFP-StuA(NLS) Proteins in den Kern durch C-terminale Fusion mit der RosA-Region As 294-449. Links StuA-Kernlokalisierungsdomäne (NLS), N-terminal mit eGFP fusioniert (pKV71); rechts zusätzlich mit RosA-Teilstück As 294-449 C-terminal an der StuA NLS (pKV72). Keimlinge wurden ca. 10 Stunden bei 37°C in ethanolhaltigem Medium auf Deckgläschen inkubiert.

3. Molekulare Analyse von *nosA*

Nachdem die Analyse von einem der zwei *pro1*-ähnlichen Gene, *rosA*, eine von *pro1* stark abweichende Funktion zeigte, wurde eine molekulare Analyse des zweiten Gens, *nosA*, angeschlossen.

3.1 Intrazelluläre Lokalisation von *nosA*

Wie in der Sequenz von RosA, findet sich auch in der NosA Proteinsequenz eine mögliche zweiteilige Kernlokalisierungsdomäne. Diese Kernlokalisierungsdomäne überlappt auch hier mit dem $Zn(II)_2Cys_6$ binukleären Cluster ($Zn(II)_2Cys_6$ As.: 44-74; NLS As.:39-56). Aus den Erfahrungen, die mit der Lokalisation von GFP-RosA gewonnen worden waren, war natürlich auch die intrazelluläre Lokalisation von NosA interessant. Die Lokalisation erfolgte mittels C-terminaler Fusion von NosA mit GFP. Zur Erstellung des GFP-Konstruktes wurde das Gateway System (siehe Material und Methoden) benutzt. Das NosA-GFP Fusionsprotein stand unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors (pKV52). Der Stamm SRF200 wurde mit dem GFP-Konstrukt pKV52 und gleichzeitig mit dem Kernfärbungskonstrukt pJH19 (*stuA*-Kernlokalisierungsdomäne mit dsRedT4 fusioniert) transformiert. Transformanden wurden auf Deckgläschen mit ethanolhaltigem Medium ca. 12 Stunden bei 37°C inkubiert und dann mikroskopiert. Dabei zeigte sich, dass NosA-GFP im Gegensatz zu GFP-RosA im Kern lokalisiert (Abb. 20). Weitere Untersuchungen zur Kernlokalisierung wurden nicht durchgeführt.

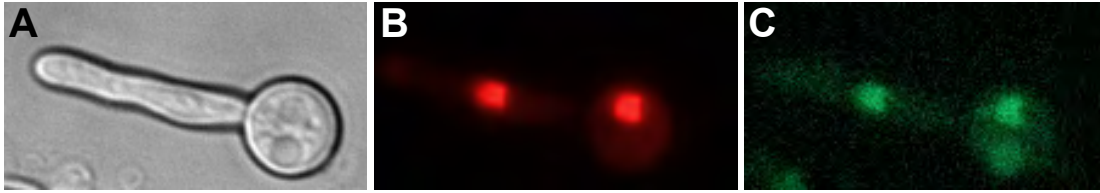


Abb. 20: Lokalisierung von NosA-GFP. (A) Interferenzmikroskopiebild eines Keimlings. (B) Mit dsRedT4-StuA(NLS) sichtbar gemachte Kerne. (C) NosA-GFP lokalisiert im Kern. Keimlinge wurden 12 Std. in ethanolhaltigem Medium auf Deckgläschen bei 37°C inkubiert.

3.2 Deletion des *nosA* Gens

Die Deletion von *nosA* erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Deletion von *rosA*. Der *nosA* ORF wurde, unter Zuhilfenahme der natürlich im Organismus vorkommenden homologen Rekombination, durch einen Selektionsmarker ausgetauscht.

Im Gegensatz zu der Deletion von *rosA*, wurde das Deletionskonstrukt nicht aus einem Subclon des Gens konstruiert, sondern durch Amplifikation zweier ca. 1 kb großer Fragmente, die das Gen flankieren und deren Ligation mit einem Selektionsmarker (*argB*) mittels *SfiI*-Schnittstellen. Dafür wurden die beiden Oligonukleotide, die an den zu deletierenden Bereich angrenzen, um die Sequenz des *SfiI* Restriktionsschnitts verlängert. *SfiI* hat die Besonderheit, in der Mitte der Sequenz fünf variable Basen zu haben, die für die beiden Fragmente unterschiedlich gewählt wurden. Dadurch konnten sie nicht direkt ligieren. Erst durch den Auxotrophiemarker *argB*, der von zwei, zu den Flanken passenden *SfiI* Schnitten flankiert wird, konnten die beiden Flanken mit *argB* zwischen ihnen ligiert werden.

Das Deletionskonstrukt pKV46 wurde als Vorlage für eine PCR benutzt, und das aufgereinigte Produkt dieser PCR in den Arginin-auxotrophen *A. nidulans* Stamm SRF200 transformiert. Transformanden wurden mittels Southern-Blot-Analyse auf ein Deletionsereignis geprüft, und schließlich auch ein Stamm (unter ca. 60 getesteten Transformanden) gefunden (SKV31, siehe Abb. 21).

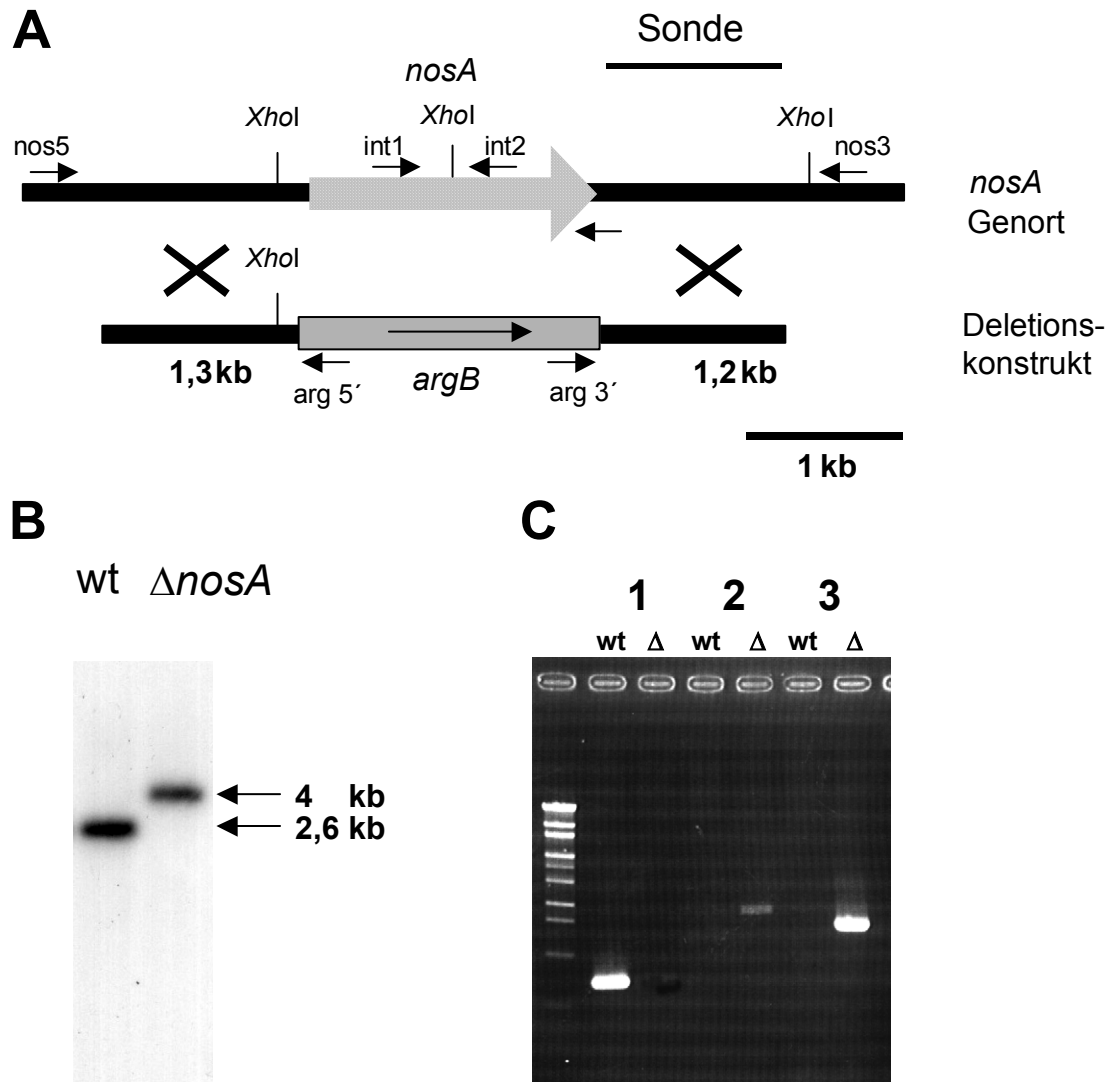


Abb. 21: Deletionsschema des *nosA* Gens und molekulare Analyse eines Deletionsstammes. **A** *nosA*-Genort und Deletionskonstrukt. Durch den Austausch von *nosA* gegen den *argB* ORF geht eine *XhoI*-Schnittstelle verloren, was in **B** für einen $\Delta nosA$ -Stamm in einem Southern-Blot gezeigt wurde. Als Sonde wurde die ^{32}P markierte 3'-Flanke benutzt (A). **C** Zusätzlich wurde mittels PCR die Deletion überprüft. In **(1)** wurden zwei im Gen liegende Oligonukleotide (*nos.int1* und *nos.int2*) verwendet, so dass nur bei Vorhandensein des Gens eine Amplifikation möglich ist. Bei **(2)** wurde ein aus dem *argB*-Gen kommendes (*arg5'*) und ein vor dem Deletionskonstrukt liegendes Oligonukleotid (*nos5*) benutzt, so dass nur bei Integration des *argB* in den *nosA* Genlokus eine Amplifikation möglich ist. Bei **(3)** lagen die Oligonukleotide (*arg3'* und *nos3*) am anderen Ende des Gens, aber mit gleicher Funktion wie bei (2). Sowohl Southern-Blot und PCR bestätigten die Gen-Deletion.

3.2.1 Untersuchung des *nosA*-Deletionsstammes

Die *pro1*-Mutante aus *S. macrospora* weist eine gestörte sexuelle Entwicklung auf, und die Fruchtkörperbildung wird in einem frühen Stadium der Entwicklung, nach der Bildung von Protoperithezien, noch vor der Ascosporenbildung, unterbrochen. Deshalb wurde als erstes der $\Delta nosA$ -Stamm im Hinblick auf die sexuelle Entwicklung untersucht. Der untersuchte Stamm wies dabei die *veA1* Mutation auf, was bereits zu einer reduzierten sexuellen Entwicklung und einer verstärkten Konidienbildung führt. In diesem $\Delta nosA$, *veA1*-Stamm (SKV31) fand keine sexuelle Entwicklung statt. Selbst unter Bedingungen, welche die sexuelle Entwicklung verstärken (mit Klebeband verschlossene Petrischalen), und verlängerten Inkubationszeiten von bis zu 10 Tagen, wurden keine Kleistothezien gefunden. Daher wurde das Gen *nosA* („**no** **sex**“) genannt. Abgesehen von diesem Phänotyp weicht der Stamm nicht von einem Wildtypen ab, weder asexuelle Entwicklung noch das Wachstum sind betroffen.

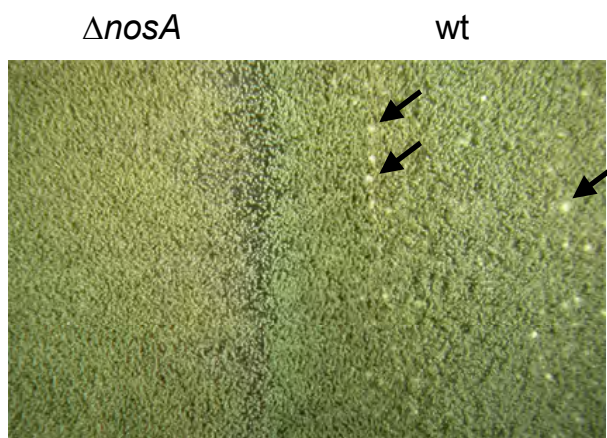


Abb. 22: Vergleich eines $\Delta nosA$ -Stammes (SKV31) mit einem Wildtypen (FGSC 26) im *veA1* Hintergrund. Die beiden Stämme wurden punktinokuliert und 4 Tage bei 37°C inkubiert. Die grüne Farbe beider Kolonien, hervorgerufen durch die asexuell entstandenen Konidien ist deutlich erkennbar. Im Wildtypstamm erkennt man die gelben Hüllezzellnester der beginnenden sexuellen Entwicklung (mit Pfeilen gekennzeichnet).

3.2.1.1 Komplementation von $\Delta nosA$ im Heterokaryon

Da die homothallische sexuelle Entwicklung in der *nosA*-Mutante nicht mehr möglich war, stellte sich die Frage, ob eine sexuelle Reproduktion zwischen einem Wildtyp-Stamm und einem $\Delta nosA$ -Stamm möglich sei; also eine einfache Kopie des *nosA* Gens im Heterokaryon für die sexuelle Entwicklung ausreicht. Dafür wurde der $\Delta nosA$ -Stamm SKV31 mit dem Stamm WIM126 (*pabaA1*; *veA*⁺) gekreuzt. Tatsächlich kreuzten sich die beiden Stämme und es bildeten sich Fruchtkörper mit reifen, aus der Meiose hervorgegangenen Ascosporen. Der Effekt der nicht vorhandenen sexuellen Entwicklung durch die Deletion von *nosA* ist also

rezessiv. Eine Kreuzung von zwei $\Delta nosA$ Stämmen (SKV31 und SKV38) untereinander war allerdings nicht möglich.

3.2.1.2 Auswirkung der *nosA* Deletion in einem *veA*⁺ Stamm

Aus der Kreuzung der Stämme SKV31 mit WIM126 wurde ein Stamm isoliert, der ein intaktes *veA* Gen und die *nosA* Deletion trägt (SKV32). Die *nosA*-Deletion wurde per Southern-Blot-Analyse und PCR nachgewiesen. Das *veA*-Gen wurde mittels PCR amplifiziert (bzw. der Bereich, in dem die *veA1* Mutation zu finden wäre) und sequenziert. Da in Stämmen mit einem intakten *veA* Gen die sexuelle Entwicklung stärker ausgeprägt, und zusätzlich die Regulierung der sexuellen/asexuellen Entwicklung durch Licht erhalten ist, konnte überprüft werden, ob diese Regulation nach Deletion von *nosA* weiterhin funktioniert. So führt beispielsweise eine Deletion des GATA-Typ Regulators *nsdD* wie bei *nosA* zu einem Verlust der sexuellen Entwicklung, gleichzeitig findet aber auch ein Verlust der Regulation von sexueller/asexueller Entwicklung durch Licht statt. Unabhängig von den Lichtbedingungen werden viele Konidien produziert (Han et al., 2001).

Die Stämme SKV32 und FGSC A4 (beide *veA*⁺) wurden punktinokuliert, die Mediumsplatten mit Klebeband verschlossen und für fünf Tage im Dunkeln oder bei Dauerlicht bei 37°C inkubiert. Abb. 23 zeigt die Kolonien, die im Dunkeln inkubiert wurden. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ist deutlich zu erkennen. Die Wildtypkolonie ist voller reifer Kleistothezien, die von den gelblichen Hüllezellen umgeben sind, daher erscheint die Kolonie gelb. Nur in der Mitte der Kolonie sind wenige Konidiophore zu erkennen. Im Gegensatz dazu erscheint der $\Delta nosA$ -Stamm besonders am Rand eher weiß. Das Grün in der Mitte der Kolonie stammt von den Konidien, der weiße Rand vom undifferenzierten Myzel. Bei stärkerer Vergrößerung sind im Wildtyp deutlich die schwarzen Kleistothezien sichtbar, in der Mutante findet man vereinzelt sehr kleine „Mikrokleistothezien“. In Abb. 23 B liegen ein Wildtyp-Kleistothezium und ein vom $\Delta nosA$ Stamm gebildetes „Mikrokleistothezium“ zum besseren Größenvergleich nebeneinander. Die Mikrokleistothezien haben ca. ein Zehntel der Größe der Wildtyp Kleistothezien (30 µm zu 300 µm). Bei Dauerlicht inkubiert zeigten beide Stämme die gleiche Entwicklung von Konidiophoren, die Lichtregulation funktioniert also noch in der *nosA*-Mutante, nur der Prozess der sexuellen Entwicklung ist gestört.

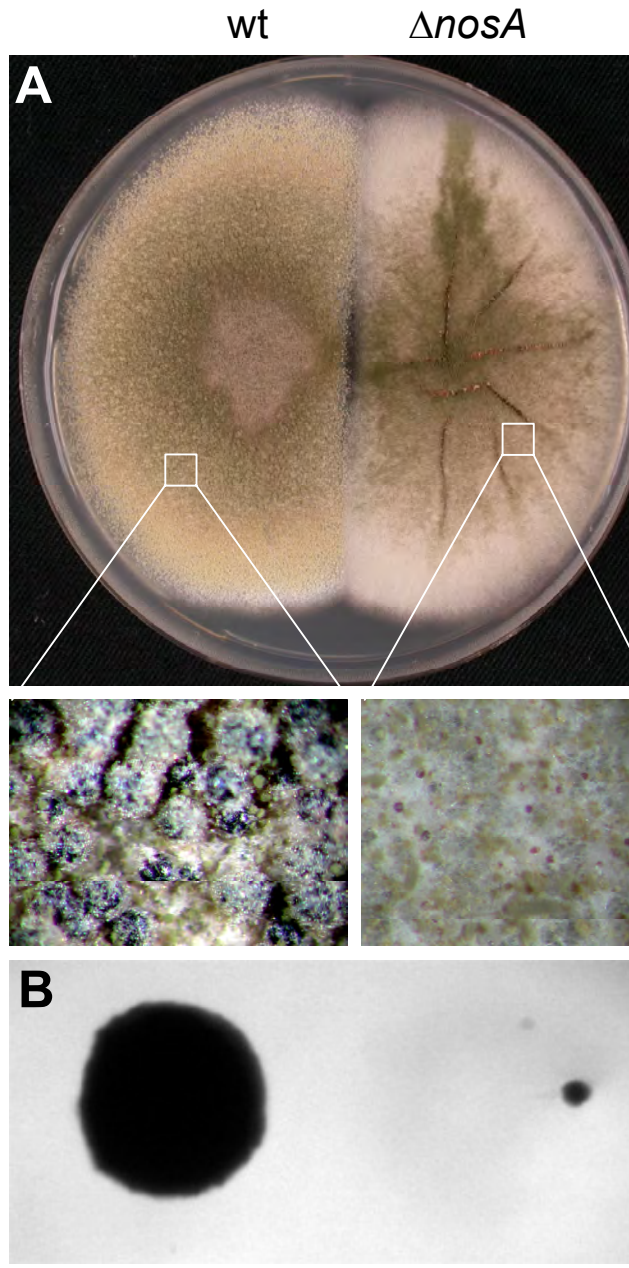


Abb. 23: Deletion von *nosA* im *veA*⁺ Hintergrund. (A) Stamm FGSC A4 (wt) und SKV32 ($\Delta nosA$) wurden punktinkuliert und 5 Tage bei Dunkelheit in abgeklebten Mediumsplatten bei 37°C inkubiert. Besonders deutlich ist die unterschiedliche Farbe, bedingt durch das Fehlen von Hüllzellumgebungen Kleistothezien in der Mutante im Randbereich der Kolonien zu erkennen. Die Vergrößerungen der weißen Quadrate (via Binokular) zeigen links deutlich die reifen, schwarzen Kleistothezien des Wildtypes. Rechts sind weißes Myzel, einige grüne Konidiophore und ein paar Mikrokleistothezien erkennbar. (B) Kleistothezien wurden zur Säuberung von Myzel und Hüllzellen auf einer Agarplatte „gerollt“ und dann mittels Binokular vergrößert dargestellt. Das Wildtypkleistothezium ist ca. 10x so groß, wie das Mikrokleistothezium der *nosA* Mutante. Der Balken entspricht in (A) ca 1 cm, der Vergrößerung von (A) ca. 500 μm und in (B) ca. 100 μm .

Die Mikrokleistothezien aus der *nosA*-Mutante wurden unter einem Deckgläschen gequetscht und im Mikroskop untersucht, um einen möglichen Entwicklungsstopp während der Ascosporenentwicklung zu finden. Interessanterweise finden sich in den Mikrokleistothezien alle Stadien der Ascus-Entwicklung bis zu den reifen, rotgefärbten Ascosporen, auch wenn die Ascosporenzahl weit unter der eines Wildtyp Kleistotheziums liegt (Abb. 24).

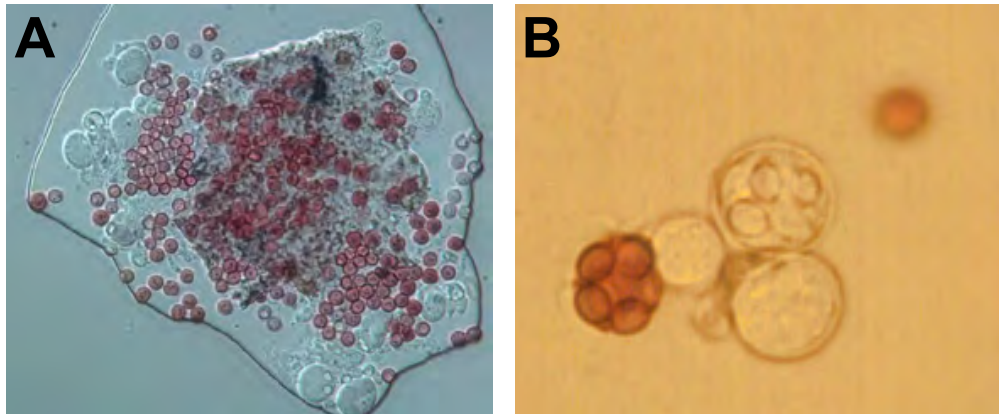


Abb. 24: (A) Geöffnetes Mikrokleistothezium enthält reife, rotgefärbte Ascosporen. (B) Nach längerer Suche kann man alle Stadien der Ascusentwicklung finden, bis hin zum fertigen, acht Ascosporen beinhaltenden Ascus (B, rechts unten).

Bei Dauerlicht inkubiert zeigten der Wildtyp FGSC A4 und der $\Delta nosA/veA^+$ -Stamm SKV32 die gleiche Entwicklung von Konidiophoren. Die Lichtregulation funktioniert also noch in der *nosA*-Mutante und nur der Prozess der sexuellen Entwicklung ist gestört. Abb. 25 verdeutlicht diesen Sachverhalt. Der Wildtyp FGCS A4, SKV32 ($\Delta nosA, veA^+$), Stamm FGSC 26 (*bioA1, veA1*) und Stamm SKV49 ($\Delta nsdD, veA^+$) wurden punktinokuliert und bei Dauerlicht, bzw. Dauerdunkelheit 120 Stunden inkubiert. Im Wildtyp finden sich bei Dauerbelichtung viele Konidiophore und keine sexuellen Entwicklungsstrukturen. Dies ist ebenso bei den $\Delta nosA$ -, $\Delta nsdD$ - und *veA1*-Stämmen der Fall. Bei Dunkelheit entwickeln sich im Wildtyp viele Hüllezellnester mit Kleistothezien, gleichzeitig ist die asexuelle Entwicklung stark reduziert. Diese starke Reduzierung der asexuellen Entwicklung findet sich auch im $\Delta nosA$ -Stamm, jedoch stoppt die sexuelle Entwicklung sehr früh, woraus die weißliche Farbe des Myzels der Kolonie resultiert. In der *veA1*-Mutante ist eine schwache sexuelle Entwicklung zu erkennen, die asexuelle Entwicklung ist jedoch genauso stark wie im Licht. Der $\Delta nsdD$ -Stamm zeigt im Dunkeln nur asexuelle Entwicklung, ebenso wie im Licht (Deletion von *veA* zeigt den gleichen Phänotyp, wie die *nsdD*-Deletion). Im Gegensatz zu den Regulatoren *nsdD* und *veA* zeigt die *nosA*-Mutante weiterhin eine Licht/Dunkel-Reaktion.

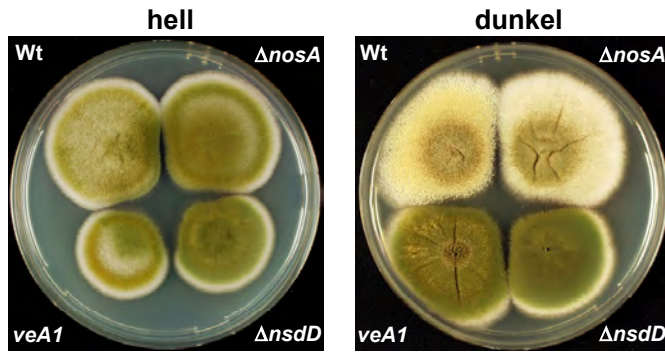


Abb. 25: Wachstum verschiedener Entwicklungsmutanten im Licht und im Dunkeln. Stämme mit unterschiedlichen Mutationen wurden punkt-inokuliert und 120 Stunden bei Dauerlicht (hell) oder Dunkelheit (dunkel) inkubiert. Im Wildtyp (Wt) erkennt man deutlich die Umstellung von asexueller (hell) zu sexueller (dunkel) Entwicklung. Diese Antwort findet sich auch im $\Delta nosA$ Stamm, auch wenn die sexuelle Entwicklung früh stoppt. Bei den anderen beiden Stämmen findet eine Hell/Dunkel Antwort kaum (*veA1*) oder gar nicht ($\Delta nsdD$) statt. Wt = FGSC A4, $\Delta nosA$ = SKV32, *veA1* = FGSC 26, $\Delta nsdD$ = SKV49.

Die Entwicklung von Mikrokleistothezien in *A. nidulans* wurde bereits unter Aminosäurelimitation beschrieben. So stoppt die sexuelle Entwicklung im Stadium der Mikrokleistothezien, wenn dem Medium das Histidin-Analog 3-Amino-1,2,4-Triazol zugesetzt wird (Hoffmann et al., 2000), was Aminosäurehunger auslöst (Klopotowski & Wiater, 1965). Interessanterweise enthalten diese Mikrokleistothezien allerdings keine reifen Ascosporen. Der Stopp der sexuellen Entwicklung im Stadium der Mikrokleistothezien kann auch durch Deletion von *cpcB* und die Überexpression von *cpcA* hervorgerufen werden. CpcA ist das *A. nidulans* Homolog eines Proteins der c-Jun Familie, GCN4p, in *S. cerevisiae*. Dort ist dieser Aktivator für die Transkription von mehr als 50 Genen der Biosynthese von Aminosäuren und Purinen verantwortlich (Mosch et al., 1991; Natarajan et al., 2001). CpcB ist in *A. nidulans* das Homolog zu CPC2p aus *S. cerevisiae* (Hoffmann, 1999) und RACK1 aus *Rattus norvegicus* (Ron et al., 1994). In *S. cerevisiae* wird CPC2p für die Repression der GCN4p Aktivität unter nicht Aminosäure limitierenden Bedingungen benötigt.

Um zu überprüfen, ob der *nosA* Deletionsphänotyp durch eine verringerte Aminosäureversorgung hervorgerufen wird, wurde die Mutante auf komplettem Medium (CM) mit vielen zugesetzten Vitaminen und Pepton wachsen gelassen. Doch auf diesem vollen Medium bildeten sich nur einige Mikrokleistothezien.

Die Anzahl der Mikrokleistothezien, die sich in der $\Delta nosA$ -Mutante in einer Kolonie bilden, ist, verglichen mit der Anzahl von reifen Kleistothezien in einem Wildtyp, sehr gering. So finden sich in einem kreisförmig ausgeschnitten Stück (0,5 cm Durchmesser) einer 120 Stunden gewachsenen Kultur ca. 10-20 Mikrokleistothezien. Im Gegensatz dazu finden sich in einem Wildtyp ca. 200-300 Kleistothezien. Viel auffallender als die Mikrokleistothezien sind die vielen Zellnester, die in der Mutante zu sehen sind. Dies ist ein sehr frühes Stadium der sexuellen Entwicklung (Abb. 26 A). Vergrößert unter dem Rasterelektronenmikroskop

finden sich in diesen Nestern sehr kleine Kleistothezienanlagen (bis 20 μm), die schon eine charakteristische Oberflächenstruktur aufweisen. Im Inneren findet man jedoch keine Ascosporen oder ascogene Hyphen (Abb. 26 B). Diese Primordien erinnern sehr stark an die Protoperithezien, die in der *pro1*-Mutante aus *S. macrospora* beschrieben wurden (Abb. 26 C und D). Möglicherweise sind die Mikrokleistothezien nur ein sehr kleiner Bruchteil der Primordien, die diesen sehr frühen Block in der Entwicklung übergehen. Der Haupteffekt der *nosA* Deletion ist aber ein Stopp der sexuellen Entwicklung im Stadium der Primordien.

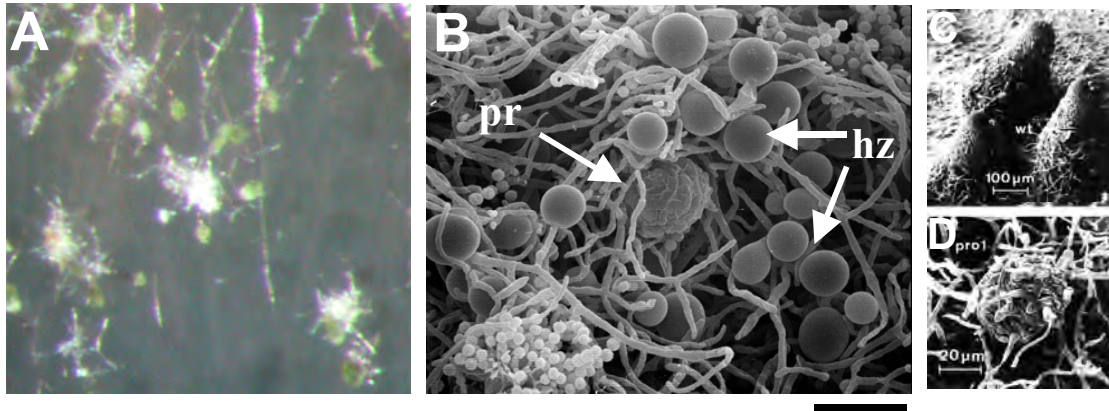


Abb. 26: Hüllezellnester mit Primordien in der $\Delta nosA$ -Mutante. (A) Aufnahme eines Nestes mittels Binokular. (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Nestes. Die Kleistothezienanlage, das Primordium (pr), ist deutlich zu erkennen. Es ist von einigen Hüllezellen (hz) umgeben. (C) Reife Fruchtkörper, Perithezien, in *S. macrospora*. (D) Protoperithezium in *pro1*-Mutante (aus Masloff et al, 1999). Größenskalen in (A) 200 μm , in (B) 20 μm .

3.2.2 Einfluss von *nosA* auf die Hüllezellbildung

In der $\Delta nosA$ -Mutante ist die Zahl der Hüllezellen im Vergleich zu einem Wildtyp-Stamm stark reduziert. Da dies möglicherweise einen Einfluss auf die sexuelle Entwicklung haben könnte, wurde ein $\Delta nosA/\Delta rosA$ -Stamm erzeugt, in dem die Hüllezellbildung in Flüssigkultur untersucht werden konnte. Die Doppelmutante (SKV50) wurde aus einer Kreuzung der Stämme SKV8 und SKV38 gewonnen. Da beide Mutationen mit Hilfe des Auxotrophiemarkers *argB* erstellt wurden, mussten die Nachkommen mittels PCR, spezifisch für das *nosA* (wie in Abb. 21) und das *rosA* Deletionsereignis (wie in Abb. 9), getestet werden.

Phänotypisch unterschied sich die Doppelmutante (SKV50) beim Wachstum auf Festmedium nicht von der *nosA*-Deletionsmutante. Bei Wachstum in Flüssigkultur zeigten sich nach 48 Stunden erste Hüllezellen, wie in der $\Delta rosA$ -Mutante. Also scheint *nosA* keinen Einfluss auf die Hüllezellbildung zu haben.

3.3 Expression von *nosA*

Ebenso wie für *rosA*, wurde für den Regulator *nosA* die Transkription während unterschiedlicher Stadien der Entwicklung untersucht. Die Regulatoren *nsdD* und *veA*, die eine wichtige Rolle in der sexuellen Entwicklung haben, werden (zumindest bei der Entwicklung auf Platten) nicht transkriptionell reguliert, *rosA* und *stuA* hingegen schon. Es wurden verschiedene Stadien der asexuellen und der sexuellen Entwicklung, sowie Stresssituationen, wie Hunger, untersucht (Abb. 27). Das *nosA*-Transkript war unter allen Bedingungen zu detektieren, allerdings gab es eine verstärkte Expression in der späten asexuellen Entwicklung und unter Hungerbedingungen (16 Stunden Wachstum schüttelnd in flüssigem Minimal Medium, danach 3 Stunden Wachstum in Medium ohne Glukose). Dabei ist zu beachten, dass die Expression von *rosA*, die auch in der asexuellen Entwicklung besonders verstärkt auftritt, frühzeitiger ist. So ist das Maximum der *rosA*-Transkription 12 Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung zu finden, und nimmt dann wieder ab. Die *nosA*-Transkription steigt 16 Stunden nach der Induktion an und erreicht nach 26 Stunden ihr Maximum.

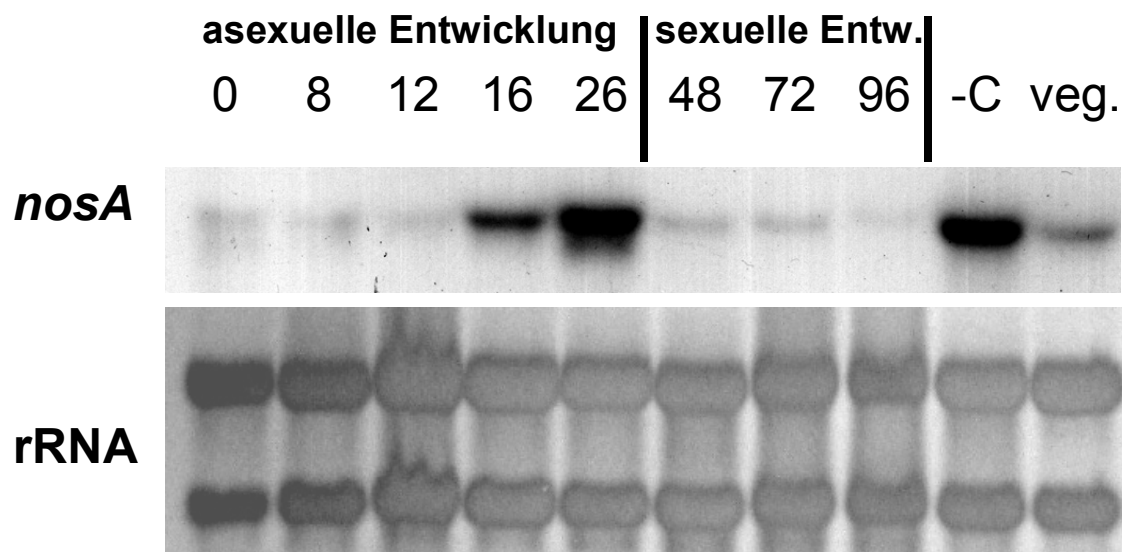


Abb. 27: Entwicklungsspezifische Expression von *nosA*. RNA aus verschiedenen Stadien der asexuellen und sexuellen Entwicklung wurde in einer Northern-Blot-Analyse untersucht. In jedem Stadium ist ein *nosA* Transkript zu detektieren, allerdings gibt es eine verstärkte Expression in der späten asexuellen Entwicklung, nach 16 Std., in der bereits fertige Konidiophore zu finden sind. Auch unter Kohlenstoffmangel (-C), induziert für drei Stunden nach 16 stündigem, vegetativen Wachstum (veg.) in Flüssigkultur, ist eine verstärkte Expression zu erkennen. 10 µg RNA wurden aufgetrennt und mit einer *nosA*-spezifischen ³²P-markierten Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle wurde die rRNA nach Transfer der RNA auf eine Membran mit Methylblau gefärbt.

3.4 Untersuchungen zu Genen unter der Kontrolle von *nosA*

Nachdem eine Rolle von *nosA* in der sexuellen Entwicklung deutlich gezeigt werden konnte, wurde nach Zielgenen dieses putativen Transkriptionsfaktors gesucht. Als mögliche Kandidaten galten dabei bereits beschriebene Zielgene der sexuellen Entwicklung. Eines dieser bereits beschriebenen Zielgene ist ein hochaffiner Hexosetransporter, *hxtA*, der erst in der späten sexuellen Entwicklung transkribiert wird (Wei, et al., 2004). Promotor-GFP Studien zeigten eine besonders starke Transkription in den ascogenen Hyphen der sich entwickelnden Kleistothezien. Zugleich wurde dieses Gen unter Hungerbedingungen stark transkribiert. Da in der $\Delta nosA$ -Mutante die sexuelle Entwicklung nicht vorhanden ist, bzw. nur sehr rudimentär auftritt, gibt es keine (oder nur sehr wenige) ascogene Hyphen. Deshalb wurde nach dem Transkript von *hxtA* nicht zum Zeitpunkt der späten sexuellen Entwicklung gesucht, sondern nach Hungerinduktion. Ein weiterer guter Kandidat für die Regulierung durch *nosA* ist *cpeA*. Dabei handelt es sich um eine Katalase-Peroxidase, die spezifisch in den Hüllzellen transkribiert wird (Scherer, et al., 2002). Wie bei *hxtA*, ist die Induktion der Transkription jedoch auch bei Hunger zu beobachten. Für beide Gene wurde mittels Northern-Blot-Analyse die Transkription unter Hungerbedingungen (16 Stunden Wachstum schüttelnd in flüssigem Minimal Medium, danach 3 Stunden Wachstum in Medium ohne Glukose) im Wildtyp FGSC26 und dem $\Delta nosA$ -Stamm SKV30 untersucht.

Weder *hxtA* noch *cpeA* wurden im $\Delta nosA$ -Stamm unter Hungerbedingungen stark transkribiert, wobei im Fall von *cpeA* ein schwaches Transkript detektierbar war, was auf eine mögliche zusätzliche Regulation hinweist. Zusätzlich wurde im Falle von *hxtA* auch eine Promotor-GFP Untersuchung durchgeführt. Dafür wurde der $\Delta nosA$ -Stamm SKV30 mit dem Plasmid pHHgfp4 (Wei, et al., 2004) transformiert. 20 Transformanden wurden auf Deckgläschen mit glukosehaltigem Medium 8 Stunden bei 37°C inkubiert, danach wurde das Medium gegen glukosefreies Medium ausgetauscht und weitere drei Stunden inkubiert. Von allen 20 untersuchten Transformanden zeigte keine das charakteristische GFP-Leuchten nach der Hungerinduktion. Als Positivkontrolle diente der Stamm SWHHgfp (Wei, et al., 2004).

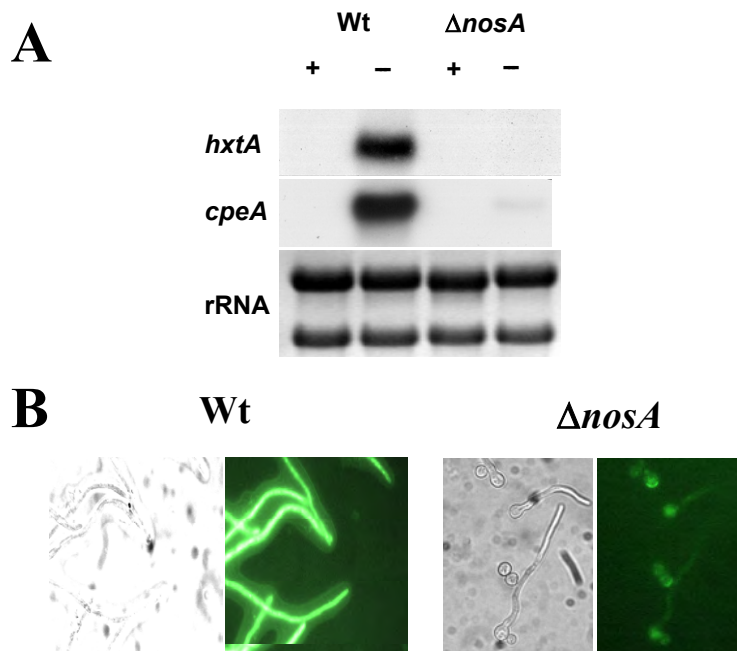


Abb. 28: Transkriptionelle Regulation von *hxtA* und *cpeA*, durch *nosA*. (A) Northern-Blot-Analyse vegetativ wachsenden Myzels mit (+) und ohne (-) Glukose. Im *nosA* Deletionsstamm findet sich keine Expression von *hxtA*, und nur eine sehr schwache von *cpeA*. (B) **Promotor-GFP-Fusion** von *hxtA*. Unter Hungerbedingungen wird im Wildtyp GFP exprimiert, in der Mutante nicht (links jeweils das korrespondierende Hellfeldbild). Bei extrem langer Belichtungszeit (750 msec.) ist nur schwache Autofluoreszenz der Konidien erkennbar. Wt = in (A) Wildtyp FGSC26; in (B) Stamm SWHHgfp; $\Delta nsdD$ = in (A) SKV30 in (B) SKV51

3.5 Regulation von *nosA*

Nachdem bereits eine Regulation von *hxtA* und *cpeA* durch *nosA* gezeigt wurde, stellte sich die Frage durch welche Faktoren *nosA* reguliert wird. Bisher ist sehr wenig über die Zusammenhänge der einzelnen Regulatoren der sexuellen Entwicklung bekannt. Zwar sind einige Regulatoren beschrieben, doch die Verknüpfung der einzelnen Fragmente ist bisher noch nicht geglückt.

3.5.1 Expression von *nsdD* in einem $\Delta nosA$ -Stamm

Die Überexpression des Regulators *nsdD* hat einen Phänotyp, der zumindest seine Rolle im Zusammenhang mit *nosA* klären konnte. Wird *nsdD* überexprimiert, so startet die sexuelle Entwicklung unter Bedingungen, die im Wildtyp keine Entwicklung zulassen, z.B. in Flüssigkultur, aber auch auf Hochsalzmedium (0,6 M KCl). Durch eine Überexpression von *nsdD* in einem $\Delta nosA$ -Stamm, konnte so überprüft werden, ob der Stopp der sexuellen Entwicklung in der $\Delta nosA$ -Mutante durch eine verstärkte Expression von *nsdD* überkommen werden kann. Dafür wurde das *nsdD* Überexpressionsplasmid pMS19 (*nsdD* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase *gpdA*) in den $\Delta nosA$ -Stamm SKV37 transformiert und die Transformanten auf KCl-Platten 5 Tage

wachsen gelassen (Abb. 29). Die Überexpression von *nsdD* konnte den Stopp in der sexuellen Entwicklung der *nosA*-Mutante nicht ausgleichen, es wurden keine Kleistothezien gebildet. Demzufolge muss *nosA* hinter *nsdD* in der Regulationskette liegen, oder an einem parallelen Weg beteiligt sein.



Abb. 29: Überexpression von *nsdD* führt nicht zur Kleistothezienentwicklung in der *nosA*-Mutante. *nsdD* wurde mit Hilfe des konstitutiv aktiven Promotors *gpd* exprimiert. Expression in einem Wildtyp führt zur Bildung von reifen Kleistothezien auf KCl-haltigen (0,6 M) Platten; in einem $\Delta nosA$ -Stamm ist diese Entwicklung nicht möglich.

3.5.2 Regulation von *nosA* durch *rosA* in Flüssigkultur

In Kapitel 2.1.2 wurde bereits gezeigt, dass *rosA* die Transkription von verschiedenen Regulatoren der sexuellen Entwicklung in Flüssigkultur reguliert, was in der $\Delta rosA$ -Mutante zu einer Deregulation dieser Gene, und der daraus resultierenden Hüllezellbildung in Flüssigkultur führt. Da auch *nosA* eine Rolle als Regulator der sexuellen Entwicklung spielt, wurde die Transkription von *nosA* in Flüssigkultur in der *rosA*-Mutante via Northern-Blot-Analyse untersucht. Wie in Kapitel 2.1.2 wurde RNA zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums in einem Wildtyp und der $\Delta rosA$ -Mutante extrahiert und mit einer *nosA* spezifischen Sonde hybridisiert. In Abb. 30 sieht man deutlich, dass auch die Transkription von *nosA* in der $\Delta rosA$ -Mutante dereguliert und im Vergleich zum Wildtyp verstärkt ist.

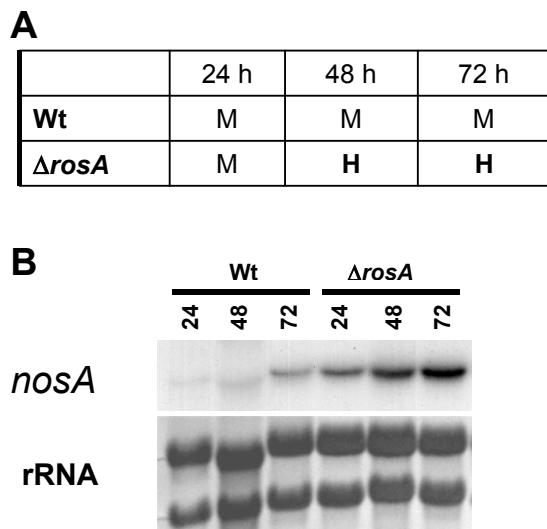


Abb. 30: Expression von *nosA* in einer $\Delta rosA$ Mutante. (A) Schematische Darstellung des Wachstums der verschiedenen Stämme in Flüssigkultur, M= veg. Myzel, H= Hüllezellen. (B) Northern-Blot-Analyse der *nosA* Transkription. Die Transkription von *nosA* ist in der $\Delta rosA$ Mutante drastisch verstärkt. Die Detektion erfolgte mit einer *nosA* spezifischen ^{32}P -markierten Sonde. rRNA wurde nach dem Transfer auf eine Membran mit Methylenblau als Ladekontrolle gefärbt. Wt = FGSC26, $\Delta rosA$ = SKV8

4. Proteom-Analyse

Zusätzlich zu den gerichteten Ansätzen der Identifizierung zweier Regulatoren, wurde auch ein ungerichteter Ansatz zur Identifizierung von in der sexuellen Entwicklung benötigten Proteinen durchgeführt. Dies geschah mittels einer Proteom-Analyse, also der Auftrennung von Proteinrohextrakten mittels 2D-Gelelektrophorese, und einer darauf folgenden massenspektrometrischen Identifizierung der Proteine. Für die Identifizierung der Proteine ist das Vorhandensein einer annotierten Proteindatenbank des Organismus sehr hilfreich, weshalb diese Methode erst seit kurzer Zeit für *A. nidulans* zugänglich ist.

Die Proteom-Analyse diente dabei zum Erreichen von zwei Zielen. Zum Einen sollten entwicklungspezifische Proteine identifiziert werden, die an den Prozessen der Fruchtkörperbildung und der Reifung der sexuellen Sporen beteiligt sind. Zum Anderen sollten direkte Zielgene, bzw. ihre korrespondierenden Proteine, des neuen Regulators *nosA* gefunden werden. Für die Analyse der verschiedenen Differenzierungsstadien wurden Proteinextrakte von Mutanten mit Extrakten aus einem Wildtypstamm verglichen. Durch die Nutzung von Mutanten ist die Unterscheidung zwischen nur für die sexuelle Entwicklung nötigen und durch Hunger induzierten Proteinen möglich. Dies wäre bei einer Analyse eines Wildtyps zu verschiedenen Zeitpunkten nicht möglich. Da zu dem Zeitpunkt der späten sexuellen Entwicklung (120 Stunden Wachstum) bereits ein Großteil der Kohlenhydrate im Medium verbraucht sind und somit Hungerbedingungen unter diesen Kultivierungsmethoden herrschen, ist diese Unterscheidung wichtig.

Alle Stämme wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert, welche die sexuelle Entwicklung im Wildtyp induziert. Zu jeweils zwei Zeitpunkten wurde das Myzel geerntet. Einmal in der frühen sexuellen Entwicklung nach 48 Stunden, und dann in der späten, abgeschlossenen sexuellen Entwicklung nach 120 Stunden. Eine Mutante wächst jedoch rein asexuell (*nsdD*), während die andere Mutante mit der sexuellen Differenzierung beginnt, doch nach der Bildung von Primordien stoppt (*nosA*) (siehe Abb. 31). Somit ist ein Vergleich der Proteinmuster zwischen früher und später sexueller, sowie der asexuellen Entwicklung möglich. Zusätzlich könnten dadurch Zielproteine des Regulators *nosA* identifiziert werden. Die zu vergleichenden Stämme haben keine Mutationen außer der kenntlich gemachten in einem Gen. Somit sind artifizielle Befunde durch z.B. eine Auxotrophie nicht möglich. Dies ist sehr wichtig, da ein Einfluss von z.B. verschiedenen Aminosäureauxotrophien auf die sexuelle Entwicklung bereits gezeigt wurde (Busch et al., 2001; Eckert et al., 1999). Zur Kultivierung der Stämme wurde Minimalmedium (MM) genutzt, da dieses im Gegensatz zu Kompletmedium (CM) weder Hefeextrakt noch Pepton enthält. Somit ist die Gefahr des Eintrages von Fremdproteinen in die Proteinextrakte verringert.

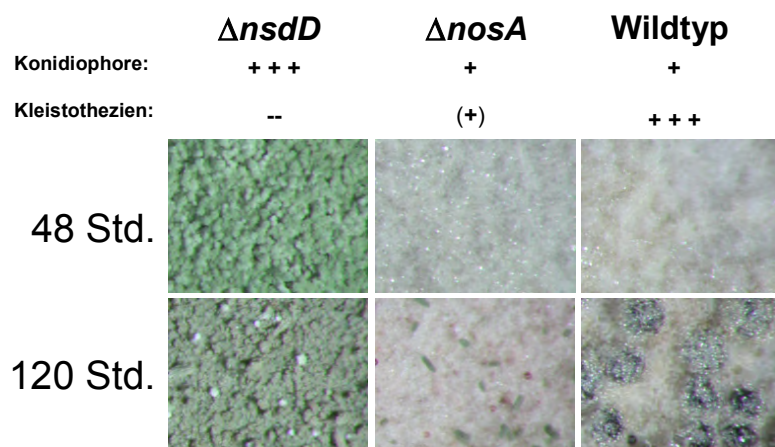


Abb. 31: Darstellung der unterschiedlichen Entwicklungsmutanten zu den Zeitpunkten der Probennahme. Die $\Delta nsdD$ -Mutante entwickelt sich rein asexuell, diese Entwicklung der Konidiophore ist nach 48 Std. bereits beendet. Die $\Delta nosA$ -Mutante beginnt mit der sexuellen Entwicklung, stoppt aber ungefähr nach 40 Std.; nach 120 Std. sind vereinzelt Mikrokleistothezien zu finden. Im Wildtyp ist die sexuelle Entwicklung nach 120 Std. abgeschlossen. ($\Delta nsdD$ = ; $\Delta nosA$ = ; Wt = FGSC A4)

4.1 Optimierung der 2D-Gelelektrophorese

Hohe Salzkonzentrationen in der Probe erschweren die Auftrennung von Proteinen während der isoelektrischen Fokussierung. Deshalb wurde zur Aufbereitung der Proben ein einfacher TRIS/EDTA-Puffer gewählt. Der Aufschluss der Proben wurde mechanisch in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Aufschlüsse wurde dafür anstatt eines Mörsers eine Kugelmühle genutzt. Da in ersten Probeläufen schon signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Stadien festgestellt werden konnten, wurde auf

eine problematischere Isolierung von Membranproteinen verzichtet und ausschließlich die im TE-Puffer lösliche Proteinfraction analysiert.

Für die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung (IEF), wurden bereits vorgefertigte Streifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) genutzt. Es gibt eine große Auswahl an verschiedenen pH-Bereichen, die dabei abgedeckt werden. Der größte Bereich, den man abdecken kann, ist von pH 3-10. Der kleinste liegt in einem pH-Bereich von eins, z.B. pH 4,5-5,5. Da die Auftrennung der einzelnen Proteinspots in einem sehr engen pH-Bereich sehr gut ist, man aber nur einen kleinen Teil aller Proteine fokussieren kann, muss ein Kompromiss von diesen beiden Faktoren gefunden werden. Dafür wurden verschiedene Proteinextrakte in einem pH-Bereich von 3-10 im Vergleich mit einem pH Bereich von 3-7 fokussiert und anschließend ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei zeigte sich, dass die Proteine mit den pH 3-7-Streifen deutlich besser voneinander getrennt werden und ein Großteil der Proteine auch in diesem pH-Bereich fokussiert. Im pH-Bereich von 3-10 finden sich zwar mehr Proteine, doch die wesentlich schlechtere Fokussierung und ein nur geringer Zuwachs an neuen Protein-Spots rechtfertigte eine Nutzung des kleineren pH-Bereiches in den folgenden Experimenten (ein Beispiel ist in Abb. 32 zu sehen).

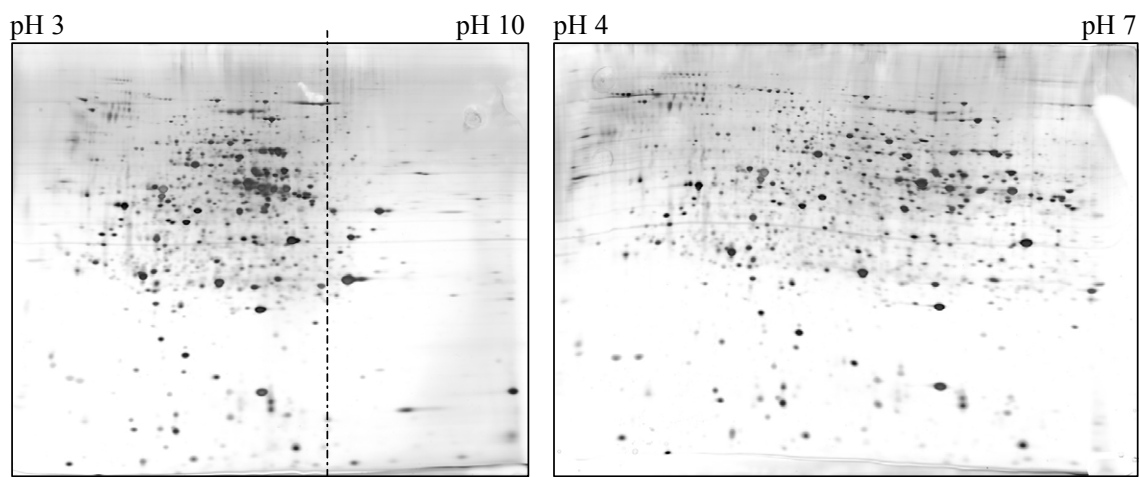


Abb. 32: Vergleich der isoelektrischen Fokussierung im pH-Bereich von 3-10 (links) und 4-7 (rechts). Proben aus einem Proteinextrakt wurden mit unterschiedlichen IPG-Streifen aufgetrennt. Die gestrichelte Linie links zeigt ungefähr den pH von 7, was bedeutet, dass alle Proteine, die links dieser Linie liegen auf dem rechten Gel zu finden sind. Die Proteine, die rechts der Linie liegen, lassen sich mit IPG-Streifen von pH 4-7 nicht auftrennen. Die deutlich bessere Auftrennung der Proteine mit dem pH 4-7er Streifen, und der eher geringe Verlust von Proteinen, die sich nicht in diesem pH-Bereich auftrennen lassen, rechtfertigt eine Nutzung der pH 4-7er Streifen. Es wurden jeweils 100 µg Protein aufgetrennt, die Detektion der Proteine erfolgte durch eine Silberfärbung. Die IPG-Streifen hatten eine Länge von 24 cm.

4.2 Analyse der Proteinmuster

Für die Analyse der Proteinmuster zu einem frühen und einem späten Stadium der sexuellen Entwicklung wurden die Stämme FGSC A4 (Wildtyp), SKV32 ($\Delta nosA$) und SKV49 ($\Delta nsdD$) jeweils auf einer MM Platte vorkultiviert und eine Sporensuspension in sterilem H_2O hergestellt. Die Anzahl der Sporen wurde mit Hilfe einer Helber-Zählkammer bestimmt, und eine Sporensuspension mit 10^6 Sporen/ml hergestellt. Die für die Kultivierung benötigten Mediumsplatten wurden mit Minimalmedium gefüllt, und auf den festen Agar wurde zweimal in H_2O gewaschene Einmachhaut gelegt. Auf dieser Einmachhaut wurden 100 μl der Sporensuspension mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Die Einmachhaut ermöglicht die Entfernung des Pilzmyzels auch nach mehrtägigem Wachstum vom Medium, und beeinträchtigt dabei nicht das Wachstum des Pilzes. Die inokulierten Platten wurden mit Klebeband geschlossen. Dies stimuliert die sexuelle Entwicklung, vermutlich durch die Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes. Die Platten wurden mit Aluminiumfolie umwickelt, um eine Inkubation in vollständiger Dunkelheit zu gewährleisten, und 48, bzw. 120 Stunden bei $37^\circ C$ inkubiert.

Das Pilzmaterial wurde nach dieser Zeit mit einem Spatel vorsichtig abgekratzt und sofort in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Der mechanische Aufschluss des Materials erfolgte in einer Kugelmühle. Das zerkleinerte Material wurde 1 zu 2 (Gewicht zu Volumen) mit TE-Puffer (10 mM pH 8) mit PMSF bei $4^\circ C$ eine Stunde schüttelnd gemischt. Durch eine schwache Zentrifugation (5000xg, 15 Min.) wurde der Hauptteil der Zelltrümmer vom Proteinextrakt getrennt. Eine zweite Zentrifugation (12000xg, 1 Std.) trennte den Rest der Zelltrümmer vom Proteinextrakt. Die Proteinextrakte wurden aliquotiert und bei $-80^\circ C$ gelagert. Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte unmittelbar vor der isoelektrischen Fokussierung mittels Bradfordtest (Bio-Rad, München).

Von den drei unterschiedlichen Stämmen wurden jeweils vier 2-D-Gele erstellt. Jeweils zwei der vier Gele wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff cy3 (Amersham, Freiburg), die anderen beiden mit cy5 gefärbt. Die Gele wurden mit Hilfe der Decodon Delta2D-Software (Decodon, Greifswald) „übereinander gelegt“, und fungierten dann als Mastergele. Nach einer automatischen Spot-Erkennung wurden die Proteinmuster der unterschiedlichen Stämme miteinander verglichen. In Abb. 33 ist das übereinandergelegte Master-Gel des $\Delta nosA$ -Stammes exemplarisch im Vergleich mit dem Master-Gel des Wildtypes zum Zeitpunkt 48 Stunden zu sehen. Auch wenn zu diesem Zeitpunkt morphologisch noch nicht viele Unterschiede zwischen beiden Stämmen ersichtlich sind (siehe Abb. 31), so erkennt man schon deutliche Unterschiede in den Proteinmustern. Bei morphologisch stärker

divergierenden Stadien gibt es jedoch wesentlich stärkere Unterschiede in den Proteinmustern.

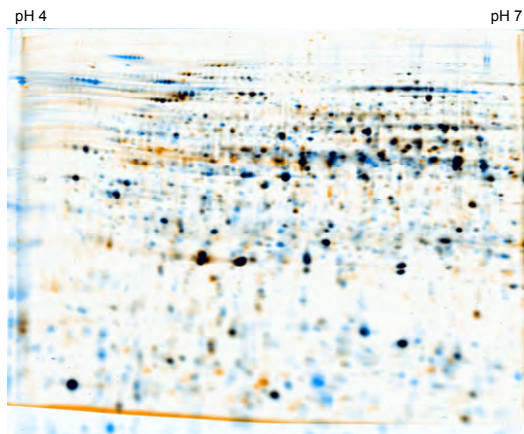


Abb. 33: Vergleich der Proteinmuster des Wildtypes mit einem $\Delta nosA$ -Stamm in der frühen sexuellen Entwicklung (48 Std.). Das aus vier Gelen erstellte Mastergel der Proteine des Wildtypes ist blau, das des $\Delta nosA$ -Stammes ist braun. Somit erscheinen Proteine, die im Wildtyp stärker vorhanden sind blau, Proteine, die in beiden Proben sind, schwarz und diejenigen, die nur in der Mutante zu finden sind, braun. Diese farbige Darstellung ist nicht verlässlich, da durch Kontrastverstärkungen auch in den Proteinmustern Verstärkungen auftreten. Deshalb gibt diese Abbildung nur einen groben Überblick.

Zur genauen Analyse der unterschiedlichen Proteinmuster wurde durch die benutzte Software die Intensität der Spots quantifiziert. Dabei wurden Durchschnittswerte von jeweils zwei identischen Gelen erstellt. So konnten die unterschiedlichen Stadien verlässlich miteinander verglichen werden. Es wurde immer der frühe Zeitpunkt der sexuellen Entwicklung mit dem späten Zeitpunkt eines Stammes verglichen. Als ein hochreguliertes Protein wurden Proteine bezeichnet, deren Spotintensität mindestens zweifach höher als auf den Gelen des zweiten Zeitpunktes der Analyse war. Nach Analyse der drei unterschiedlichen Stämme, kommt man zu folgenden Diagrammen (Abb. 34 und Abb. 35). Das Diagramm der Abbildung 34 zeigt die Proteine, die nach 48 Stunden Entwicklung eine erhöhte Expression im Vergleich mit dem Proteinmuster nach 120 Stunden zeigen. Die Zahl in den Kreisen gibt die Anzahl der Proteine wider, die Zahl in Klammern darunter die Anzahl der bereits mittels MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight) identifizierten Proteine (in Tab. 16 und 17). Im Wildtyp sind z.B. nach 48 Stunden Wachstum insgesamt 351 Proteine zweifach stärker exprimiert, als nach 120 Stunden. Fünfzehn dieser Proteine sind bereits identifiziert (Elf dieser Proteine sind nur im Wildtyp erhöht, drei sind ebenfalls im $\Delta nosA$ -Stamm, und eines im $\Delta nosA$ -Stamm und $\Delta nsdD$ -Stamm erhöht). Von den 351 Proteinen sind 63 Proteine auch in einem $\Delta nosA$ -Stamm nach 48 Stunden Wachstum in ihrer Expression erhöht, im Vergleich zum $\Delta nosA$ -Stamm nach 120 Stunden. Von diesen 63 Proteinen sind acht identifiziert.

Die identifizierten Proteine (Tab. 16 und 17) liegen mit ihrem theoretischen isoelektrischen Punkt (IP) in einem Bereich von pH 4,5 bis 6,8 (nur zwei theoretische Proteine fallen aus diesem Bereich heraus). Da bei der isoelektrischen Fokussierung ein

Bereich von pH 4 bis 7 benutzt wurde, passen diese Ergebnisse gut zusammen. Die theoretische Masse der Proteine liegt bei 25 bis 98 kDa (ein vermutlich falsch annotiertes Protein mit 5,7 kDa ist allerdings dazwischen). Auch dies passt sehr gut, denn kleinere Proteine sollten bereits aus dem Gel ausgetreten und größere Proteine sollten nicht eintreten können. Die Identifizierung scheint also gut zu funktionieren und auch die annotierte Genomdatenbank scheint für diese Zwecke gut geeignet zu sein.

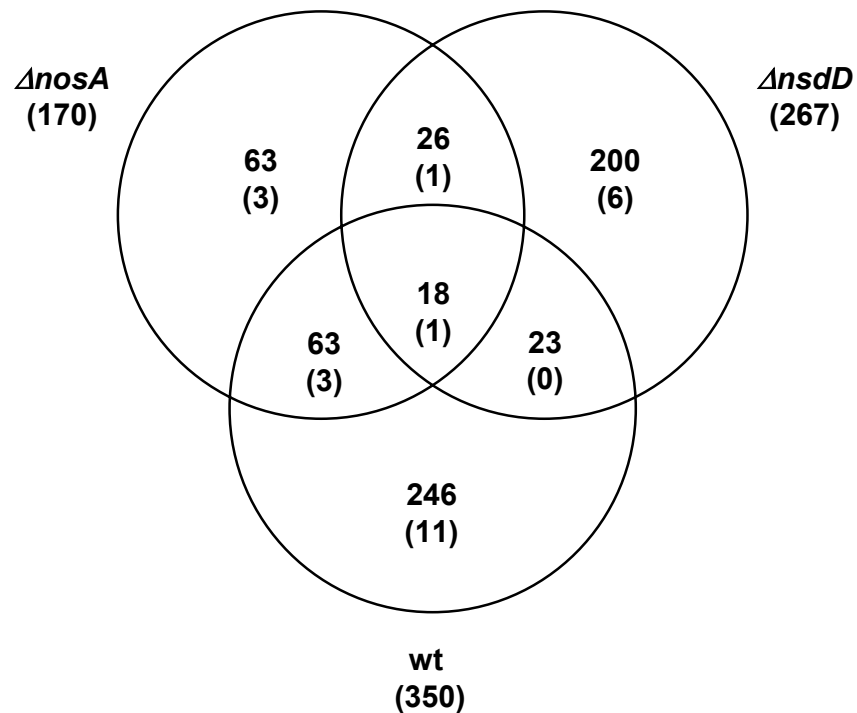


Abb. 34: Anzahl der Proteine, die nach 48 Stunden stärker als nach 120 Stunden exprimiert sind. Dargestellt sind die Proteine, die mindestens zweifach stärker exprimiert sind im Vergleich zum späteren Stadium. Die Zahl in den Kreisen gibt die gesamte Anzahl der Proteine wider, die Zahl in Klammern darunter die Zahl der bereits identifizierten Proteine (siehe Tab. 16). Proteine, die in allen drei Stämmen zum frühen Zeitpunkt der Entwicklung stärker exprimiert sind, haben vermutlich eine generelle und keine für die sexuelle Entwicklung spezifische Funktion.

Tabelle 16: Identifizierte Proteine, die nach 48 Stunden Wachstum mindestens zweifach stärker als nach 120 Stunden exprimiert sind.

Spot-Nummer (auf Gel)	Aspergillus ID-Nummer ¹	Höchste Ähnlichkeit	berechneter Isoelektrischer Punkt (IP)	berechnete Masse (kDa)	Faktor der verstärkten Expression (Spot-Volumen 48/ Spot Volumen 120)		
					im WT	im $\Delta nsdD$ -Stamm	im $\Delta nosA$ -Stamm

Nur im WT stärker exprimierte Proteine (11):

ID58642	AN0446.2	Hypothetisches Protein (<i>N. crassa</i>)	6,6	95	17,6		
ID57872	AN0554.2	Aldehyde Dehydrogenase (<i>A. niger</i>)	6,4	54	9,7		
ID57901	AN0932.2	Glutathione-disulfide Reduktase (<i>N. crassa</i>)	4,5	52	3,1		
ID57701	AN1047.2	Hitzeschock Protein Hsp88 (<i>A. fumigatus</i>)	5,0	81	2,0		
ID57865	AN2981.2	Glukose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase (<i>A. niger</i>)	6,5	59	9,5		
ID58163	AN4501.2	ArtA 14-3-3 like Protein (<i>A. nidulans</i>)	4,7	29	4,2		
ID58029	AN5129.2	Formamidase (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	4,9	70	3,4		
ID58131	AN5744.2	ArtA14-3-3 like Protein (<i>A. nidulans</i>)	4,8	30	3,1		
ID57932	AN6563.2	Translation Elongation Factor eEF-1, gamma chain (<i>N. crassa</i>)	6,4	46	6,7		
ID58621	AN7388.2	CpeA (<i>A. nidulans</i>)	6,1	82	2,8		
ID57732	AN8269.2	Hitzeschock Protein 80 (<i>N. crassa</i>)	4,9	80	4,6		

Nur im $\Delta nsdD$ -Stamm stärker exprimierte Proteine (6):

ID67336	AN0688.2	Transketolase (<i>A. fumigatus</i>)	6,1	76		2,1	
ID67278	AN1638.2	Aminopeptidase (<i>A. niger</i>)	5,2	98		2,9	
ID67621	AN5129.2	Hitzeschock Protein 70 (<i>A. fumigatus</i>)	4,9	70		2,8	
ID67496	AN5746.2	Enolase (<i>Penicillium citrinum</i>)	5,4	47		2,6	
ID68260	AN7895.2	Putative Zink-bindende Dehydrogenase (<i>Aeromonas punctata</i>)	5,1	33		2,1	
ID67772	AN9136.2	Keine Homologen, vermutlich falsch annotiert, da so klein (50As).	10	5,7		2,7	

Nur im $\Delta nosA$ -Stamm stärker exprimierte Proteine (3):

ID72310	AN1246.2	Adenosylhomocysteinase (<i>S. cerevisiae</i>)	6,6	45			2,1
ID73023	AN2867.2	Phosphoglukomutase (<i>A. nidulans</i>)	5,9	61			2,1
ID72453	AN3106.2	Vermutlich falsch annotiert, da drei unterschiedliche Proteine auftauchen	5,8	189			2,7

Im WT und $\Delta nsdD$ -Stamm stärker exprimierte Proteine (0):**Im WT und $\Delta nosA$ -Stamm stärker exprimierte Proteine (3):**

ID58330	AN0641.2	Translationell-kontrolliertes, Tumor-assoziiertes Protein P23fyp (<i>S. pombe</i>)	4,6	20	4,7		2,5
ID57688	AN7254.2	Cdc48p Homolog (<i>S. pombe</i>)	4,9	91	2,1		3,0
ID57712	AN9339.2	CatB Katalase B (<i>A. nidulans</i>)	4,8	79	13,6		3,6

Im $\Delta nosA$ und $\Delta nsdD$ -Stamm stärker exprimierte Proteine (1):

ID67543	AN4376.2	GdhA Glutamat-dehydrogenase A (<i>A. nidulans</i>)	6,3	50		2,5	2,4
---------	----------	--	-----	----	--	-----	-----

In allen drei Stämmen stärker exprimierte Proteine (1):

ID58036	AN7914.2	Putative Zink-bindende Dehydrogenase (<i>Aeromonas punctata</i>)	4,9	36	4,9	4,6	5,1
---------	----------	--	-----	----	-----	-----	-----

¹<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/index.html>

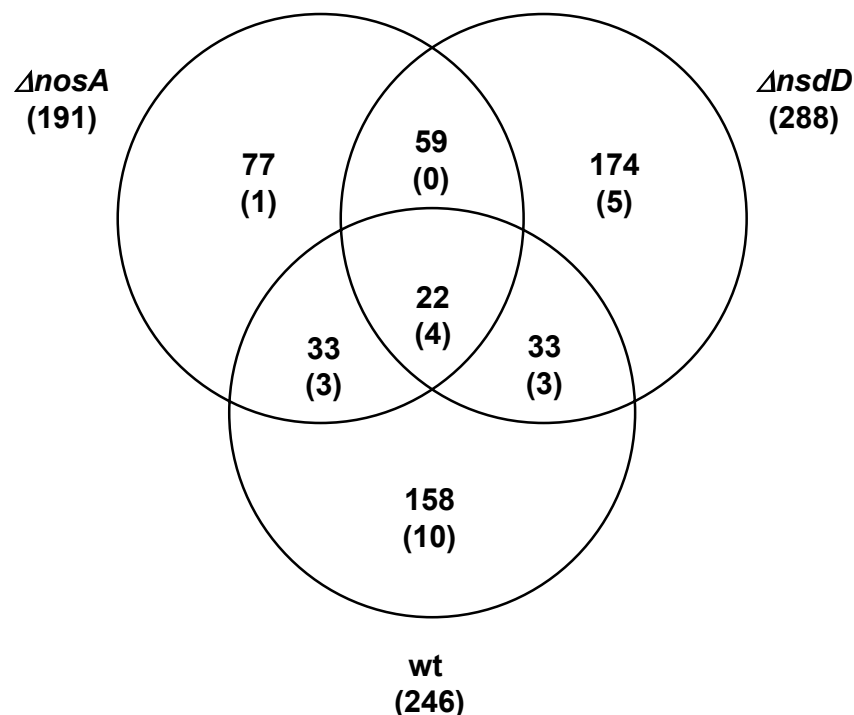


Abb. 35: Anzahl der Proteine, die nach 120 Stunden stärker als nach 48 Stunden exprimiert sind. Dargestellt sind die Proteine, die mindestens zweifach stärker exprimiert sind im Vergleich zum frühen Stadium. Die Zahl in den Kreisen gibt die gesamte Anzahl der Proteine wider, die Zahl in Klammern darunter die Zahl der bereits identifizierten Proteine (siehe Tab. 17). Proteine, die nur im WT und welche, die im WT und $\Delta nosA$ -Stamm erhöht sind, sind wahrscheinlich an der sexuellen Entwicklung beteiligt. Proteine, die nur im WT erhöht sind, können Ziele des Regulators NosA sein. Proteine, die in allen drei Stämmen erhöht sind, stehen möglicherweise mit Anpassungen an Hunger in Verbindung.

Tabelle 17: Identifizierte Proteine, die nach 120 Stunden Wachstum mindestens zweifach stärker als nach 48 Stunden exprimiert sind.

Spot- Nummer (auf Gel)	Aspergillus ID- Nummer ¹	Höchste Ähnlichkeit	berechneter Isoelektrischer Punkt (IP)	berechnete Masse (kDa)	Faktor der verstärkten Expression (Spot-Volumen 120 Std./ Spot Volumen 48)		
					im WT	im <i>ΔnsdD</i> - Stamm	im <i>ΔnosA</i> - Stamm

Nur im WT stärker exprimierte Proteine (10)

ID73965	AN0297.2	Y20 Protein (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	6,1	22	3,9		
ID73628	AN1638.2	Aminopeptidase (<i>Aspergillus niger</i>)	5,2	98	3,1		
ID73521	AN2903.2	Pepsinogen (<i>Aspergillus oryzae</i>)	4,7	43	2,5		
ID73430	AN3059.2	Phosphoglyceromutase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	5,4	57	14,9		
ID74252	AN3432.2	UDP-Glukose 4- Epimerase-like Protein (<i>Phytophthora sojae</i>)	5,4	37	3,9		
ID73375	AN4591.2	Phosphoglukomutase	6,1	67	7,8		
ID73520	AN5746.2	Enolase (<i>Penicillium citrinum</i>)	5,4	47	7,4		
ID73906	AN6024.2	Glutathione S- transferase, Gamma Klasse (<i>Cunninghamella elegans</i>)	6,0	25	2,0		
ID73609	AN6525.2	Mögliche Formate dehydrogenase (<i>A. nidulans</i>)	6,5	42	3,2		
ID73601	AN8107.2	Isoflavone Reduktase, (<i>A. fumigatus</i>)	6,8	84	2,5		

Nur im *ΔnsdD*-Stamm stärker exprimierte Proteine (5)

ID70249	AN0285.2	Glukosamine-6-Phosphat Isomerase	9,1	41		2,4	
ID70613	AN2829.2	Amidase-C (<i>A. nidulans</i>)	6,3	59		2,0	
ID70263	AN7590.2	NADP-abhängige Mannitol Dehydrogenase (<i>Cladosporium fulvum</i>)	6,6	28		2,0	
ID69741	AN8021.2	VmaA V/A-type ATP synthase (<i>A. nidulans</i>)	7,8	35		3,2	
ID70127	AN9194.2	Mögliche Nukleoside- diphosphat-Zucker epimerases (<i>Cytophaga hutchinsonii</i>)	6,5	36		5,7	

Nur im *ΔnosA*-Stamm stärker exprimierte Proteine (1)

ID75454	AN6004.2	Vip1, Funktion im cortikalen Aktincytoskelett (<i>S. pombe</i>)	5,7	29			2,2
---------	----------	---	-----	----	--	--	------------

Im WT und $\Delta nsdD$ -Stamm stärker exprimierte Proteine (3)

ID74263	AN2968.2	mögliche inorganische Pyrophosphatase (<i>Neurospora crassa</i>)	5,4	34	2,3	3,4	
ID73574	AN4871.2	ChiB Chitinase (<i>A. nidulans</i>)	5,3	44	6,3	2,4	
ID74243	AN6330.2	Elongationsfaktor 2 (EF-2) (<i>N. crassa</i>)	6,5	94	7,7	2,5	

Im WT und $\Delta nos4$ -Stamm stärker exprimierte Proteine (3)

ID74426	AN2828.2	β -D-glukosid Glukohydrolase (<i>Hypocrea jecorina</i>)	4,5	78	2,4		10,9
ID73950	AN3756.2	Proteasome Endopeptidase Komplex PRE3 (<i>S. cerevisiae</i>)	5,7	25	10,2		2,5
ID73361	AN6346.2	mögliche Dihydroxyacid-dehydratase (<i>N. crassa</i>)	6,7	65	8,9		2,5

Im $\Delta nos4$ und $\Delta nsdD$ -Stamm stärker exprimierte Proteine (0)**In allen drei Stämmen stärker exprimierte Proteine (4)**

ID73416	AN0812.2	β -Glucosidase 1 (<i>Talaromyces emersonii</i>)	5,7	94	2,5	10,5	2,4
ID73267	AN2227.2	β -Glucosidase (<i>S. pombe</i>)	5,7	92	9,1	6,3	2,3
ID73497	AN5123.2	Mögliche Dihydrodioldehydrogenase (<i>N. crassa</i>)	5,8	43	2,7	2,6	2,8
ID73531	AN8514.2	Dimethylallyltryptophan synthase [<i>Balansia obtecta</i>]	5,0	46	6,9	20,1	2,1

¹¹<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/index.html>

V. Diskussion

Die sexuelle Entwicklung in dem Ascomyzeten *A. nidulans* ist ein stark regulierter und komplexer Vorgang, wie alle eukaryotischen Differenzierungsprozesse. Die grundlegende Erforschung dieser Vorgänge ist in dem relativ simplen Pilz wesentlich einfacher und erfolgversprechender, als zum Vergleich die Erforschung der Regulierungsvorgänge in komplizierteren Eukaryoten, wie z.B. dem Menschen.

In dieser Arbeit wurden zwei putative Transkriptionsfaktoren, *rosA* und *nosA*, identifiziert und charakterisiert, die einen wesentlichen Einfluss auf die sexuelle Entwicklung in *A. nidulans* haben. Im Fall von *nosA* hat sich gezeigt, dass dieser Regulator für die funktionsfähige sexuelle Reproduktion essentiell ist. Der Regulator *rosA* fungiert als ein Repressor der sexuellen Entwicklung. Die beiden Regulatoren *rosA* und *nosA* zeigen starke Sequenzähnlichkeiten zu *pro1* aus *S. macrospora*. In den Genomen verschiedener Ascomyzeten findet sich ein *pro1*-ähnliches Gen, jedoch nur in der Gattung der *Aspergillen* gibt es zwei ähnliche Gene. In dieser Diskussion soll das interessante Auftreten der beiden Faktoren in den *Aspergillen* und ihre Funktion in *A. nidulans* beleuchtet werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine Proteom-Analyse verschiedener Entwicklungsstadien von *A. nidulans* durchgeführt. In dieser Analyse fanden sich viele unterschiedlich regulierte Proteine. Erst ein kleiner Teil dieser Proteine konnte identifiziert werden, und so soll ihre hypothetische Funktion in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien nur kurz erläutert werden.

Das Vorkommen und die Rolle der Pro1-ähnlichen Proteine innerhalb der Ascomyzeten

In *S. macrospora* wurde durch UV-Mutagenese ein Gen, *pro1*, identifiziert das in diesem Ascomyzeten für die Bildung von reifen Fruchtkörpern notwendig ist (Masloff et al., 1999). Das entsprechende Protein gehört zur Familie der Zn(II)₂Cys₆ binukleären Clusterproteine, welche als Regulatoren ausschließlich in den Pilzen fungieren (Todd & Andrianopoulos, 1997). Im Fall des Ascomyzeten *N. crassa* konnte anhand des annotierten Genoms die wichtige Rolle dieser Regulator-Familie gezeigt werden: 44% aller putativen

Transkriptionsfaktoren in diesem Organismus gehören dieser Gruppe an (Borkovich et al., 2004).

Durch eine Sequenzanalyse der frei zugänglichen Genome verschiedener Pilze hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass sich Pro1-ähnliche $Zn(II)_2Cys_6$ binukleäre Clusterproteine nur innerhalb der Ascomyzeten in den Gruppen der Sordariomycetes und Eurotiomycetes finden. Sowohl in den untersuchten Basidiomyceten, wie auch in den Gruppen der Hemiascomycetes und den Archaeascomycetes ist kein Pro1-ähnliches Protein zu finden. Interessanterweise fanden sich in den Genomen der drei untersuchten *Aspergillen*, und nur dort, zwei *pro1*-ähnliche $Zn(II)_2Cys_6$ Proteine. Diese Proteine weisen 35% bis 46% identische Aminosäuren zu Pro1 auf. Eine genaue Analyse der Proteinsequenzen der Pro1-ähnlichen Proteine aus den verschiedenen Ascomyzeten ergab ein interessantes Bild. Die phylogenetische Nähe der Organismen (auf Grundlage der 18S rRNA) bestätigt sich auch in der Proteinsequenz. D.h. die Lage der Organismen untereinander, findet sich sowohl in einem Stammbaum, der auf der 18S rRNA, als auch auf den Pro1-ähnlichen Proteinen beruht (siehe Abb. 7 und 8). Dabei bilden drei Proteine aus jeweils einem der drei *Aspergillen* eine eigene kleine Gruppe (Abb. 8). NosA und seine beiden ähnlichen Proteine aus *A. fumigatus* und *A. oryzae*, zeigen dabei eine größere Nähe zu Pro1 und sind sich auch untereinander sehr ähnlich (72% bzw. 73% identische Aminosäuren im Vergleich mit NosA). Diese größere Ähnlichkeit auf Sequenzebene bestätigte sich nach der molekularen Analyse von *nosA*, dessen Deletion einen sehr ähnlichen Effekt, wie die Deletion von *pro1* hat. Somit zeigte sich, dass NosA wahrscheinlich in *A. nidulans* das Homologe zu Pro1 aus *S. macrospora* ist. RosA und seine beiden ähnlichsten Proteine aus *A. oryzae* und *A. fumigatus* zeigen weniger Identität mit Pro1, und sind auch untereinander unterschiedlicher. Die Anzahl der identischen Aminosäuren von RosA zu den beiden Proteinen liegt bei 40%, bzw. 50%.

Ein Zusammenhang mit den Lebenszyklen der Organismen und des Auftretens der Pro1-Proteine lässt sich nicht herstellen. In der Gruppe der *Aspergillen* ist nur in *A. nidulans* ein sexueller Zyklus beschrieben, obwohl es im Genom von *A. fumigatus* Hinweise auf einen sexuellen Zyklus gibt (Dyer et al., 2003; Galagan et al., 2005). Alle drei Vertreter können sich asexuell durch Konidienbildung vermehren. In der Gruppe der Sordariomycetes vermehrt sich *S. macrospora* rein sexuell, *N. crassa* und *P. anserina* haben einen asexuellen und sexuellen Zyklus. Daraus ergibt sich die Frage, warum nur in den *Aspergillen* ein weiteres Protein existiert, das den anderen auf Sequenzebene sehr ähnlich ist und auch eine Funktion in der Kontrolle der sexuellen Entwicklung hat. Eine Möglichkeit ist eine Genduplikation von *nosA* in den *Aspergillen*, bzw. den Eurotiomycetes. Das daraus resultierende zweite Gen, *rosA*, könnte eine zeitlang funktionslos gewesen sein, so dass sich in den unterschiedlichen

Eurotiomyzeten dieses Gen ohne Nachteile für den Organismus verändern konnte, bis es wieder funktionell wurde (zumindest in *A. nidulans*). Die Expression, bzw. Funktion in den beiden anderen *Aspergillen* ist noch zu testen. Dies würde erklären, warum sich *rosA* und *nosA* so stark unterscheiden. Die Unterschiede dieser beiden sind jedoch im Zn(II)₂Cys₆ binukleären Cluster relativ gering. Dies ist die DNA-bindende Stelle des Proteins. Somit binden beide Proteine möglicherweise an ähnliche Promotor-Bereiche. Dies würde erklären, warum beide Proteine eine Rolle in der sexuellen Entwicklung haben, denn sie würden beide an den Promotoren, der in der sexuellen Entwicklung involvierten Gene, binden. Diese Hypothese wird sich klären lassen, wenn direkte Zielgene der beiden Regulatoren bekannt sind. Dann kann durch Analyse der Promotorbereiche der Zielgene überprüft werden, ob es dort Bindestellen für beide Regulatoren gibt.

Die Entstehung von *rosA* durch eine Genduplikation, könnte auch der Grund für die starke Varianz der *rosA*-ähnlichen Gene der anderen beiden *Aspergillen* sein. Die durch die Duplikation entstandenen Gene waren ohne Funktion und konnten so ohne selektiven Druck in jegliche Richtung mutieren. Eine weitere Erklärung dieses Phänomens könnte natürlich auch ein sekundärer Verlust der *rosA*-ähnlichen Gene in den Sordariomyzeten sein. Spannend ist die Frage, ab welchem phylogenetischen Zeitpunkt zwei dieser Proteine auftreten. Dafür sind weitere Untersuchungen in verschiedenen Pilzen (am besten nah mit den *Aspergillen* verwandt) nötig, oder aber ein öffentlicher Zugang auf die Genome bereits sequenzierter Pilze. Ein Beispiel dafür ist *Penicillium marneffeii*, welcher relativ nah mit den *Aspergillen* verwandt ist (siehe Abb. 7). Dieser Pilz ist bereits sequenziert, doch die Sequenz ist leider noch nicht öffentlich zugänglich. Weiterhin wäre eine Untersuchung der *rosA*-ähnlichen Gene in *A. oryzae* und *A. fumigatus* spannend, um zu überprüfen, ob diese Gene eine ähnliche Funktion in den beiden Pilzen haben. Da allerdings kein sexueller Zyklus bekannt ist, dürfte diese Arbeit schwierig werden.

Funktion von *rosA*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *rosA* als ein Repressor der sexuellen Entwicklung wirkt. Unter Bedingungen, wie Wachstum in Flüssigkultur oder auf Medium mit wenig Glukose, verhindert *rosA* die Einleitung der sexuellen Entwicklung. Interessanterweise waren die Effekte der Deletion von *rosA* teilweise von einem anderen Regulator, *veA*, abhängig. Die Bildung von Hüllezellen in Flüssigkultur war von *veA* unabhängig, während die Fruchtkörperbildung auf Medium mit wenig Glukose von einem funktionsfähigen *veA*-Gen

abhängig war. So scheinen bei Wachstum auf festem Medium mehr Komponenten an der Regulation beteiligt zu sein, als in Flüssigkulturen.

Das Auftreten der Hüllezellen in der Flüssigkultur eines $\Delta rosA$ -Stammes zeigt sich auf transkriptioneller Ebene in der Hochregulierung der Transkripte der Regulatoren *veA*, *nsdD*, *stuA* und auch *nosA*. Die Überexpression von *veA* und *nsdD* führt ebenfalls zu der Bildung von Hüllezellen in Flüssigkultur (Han et al., 2001; Kim et al., 2002). Der Effekt von RosA ist vermutlich die Repression dieser Regulatoren in Flüssigkultur. Fehlt dieser Repressor, so führt die deregulierte Expression von *veA* und *nsdD* zur Bildung der Hüllezellen. Der Befund, dass die Transkription von *nsdD* bei Wachstum auf Platten 10 Stunden nach der Einleitung der asexuellen Entwicklung stark herunter reguliert ist (Han, et al., 2001), während die Expression von *rosA* ungefähr zum selben Zeitpunkt ihr Maximum erreicht (siehe Abb. 16), korreliert sehr gut mit den Daten der Expression in Flüssigkultur. Allerdings fehlen noch experimentale Daten, die eine direkte Regulation von *nsdD* durch RosA zeigen.

Die Transkription von *rosA* war nach einer kurzen Phase des Hungers (3 Stunden Wachstum ohne Glukose) stark erhöht. Die sexuelle Entwicklung beginnt normalerweise, nachdem die Kohlenstoffquellen im Medium verbraucht sind, deshalb werden auch Reservestoffe für die Entwicklung benötigt (Wei et al., 2001). Möglicherweise wird RosA während kurzer Hungerphasen benötigt, um zu diesen Zeitpunkten eine Einleitung der sexuellen Entwicklung zu verhindern. Dies würde auch die starke Expression von *rosA* 12 Stunden nach der Einleitung der asexuellen Entwicklung erklären. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Aspergillus-Kolonie voller Konidiophore, die sich über das Substrat erheben. Durch ihre räumliche Trennung vom Substrat könnten die Konidiophore in ihrer Nährstoffversorgung limitiert sein.

Die Überexpression von *rosA* hat einen drastischen Einfluss auf den Pilz. Es findet keine Differenzierung in einer Kolonie statt, so dass weder asexuelle noch sexuelle Strukturen gebildet werden. Nur vegetativ wachsende Hyphen sind zu erkennen, und die Wachstumsgeschwindigkeit ist stark reduziert. Warum die Überexpression von *rosA*, das als Repressor der sexuellen Entwicklung dient, auch die asexuelle Entwicklung und das Hyphenwachstum einschränkt, ist schwer zu erklären. Es gibt einige Hinweise, dass sowohl sexuelle, als auch asexuelle Entwicklung mit dem Hyphenwachstum gekoppelt sind. So ist das Wachstum der Hyphen in der *fluG*-Mutante, in der keine asexuelle Entwicklung stattfindet (Lee & Adams, 1994), verstärkt. Auch die Deletion des G-Protein gekoppelten Rezeptors *gprD* zeigt einen Zusammenhang zwischen Wachstum und Entwicklung, in diesem Fall der Sexuellen (Han et al., 2004). Möglicherweise bewirkt die Expression von *rosA* nach dem Verbrauch der Kohlenstoffe im Medium ein reduziertes Wachstum. In dieser Phase passt sich der Metabolismus den neuen Gegebenheiten an. Eine weitere Erklärung für den drastischen

Phänotyp der *rosA*-Überexpression kann auch eine Missregulation verschiedenener morphogenetischer und metabolischer Pfade sein, da RosA an ähnliche DNA-Binde Motive anderer $Zn(II)_2Cys_6$ binukleärer Clusterproteine binden könnte, wenn es in großen Mengen frei in der Zelle vorliegt. Da das *rosA*-Transkript meist nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommt, was sich im schwierigen Nachweis des Transkriptes zeigte - teilweise sogar nur mittels RT-PCR (siehe Abb. 17) - ist diese Überlegung nicht zu vernachlässigen.

Die strikte Regulierung von RosA setzt sich auch außerhalb der Transkription fort. So finden sich in der Protein-Sequenz von RosA zwei putative PEST-Regionen. Diese sind für eine schnelle Deaktivierung eines Proteins durch das 26S-Proteasom notwendig (Rechsteiner & Rogers, 1996). Durch Phosphorylierung in der PEST-Region werden Proteine für die Ubiquitinierung aktiviert, was zur Folge hat, dass ein Ubiquitinrest kovalent mit der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysinrests des Zielproteins verbunden wird. An dieses Ubiquitin werden dann im Regelfall weitere Ubiquitinreste kovalent gebunden, so dass eine Kette aus mehreren Ubiquitineinheiten an das Zielprotein gebunden wird. Dies ist ein Erkennungssignal für das 26S-Proteasom, das aus mehreren Untereinheiten von Proteasen besteht und das markierte Protein abbaut (Hartmann-Petersen & Gordon, 2004). Die regulatorische Bedeutung des Proteinabbaus durch das 26S Proteasom wurde erst kürzlich durch Untersuchungen des COP9-Signalsoms in *A. nidulans* gezeigt. Dieser Multiproteinkomplex ist indirekt für die Ubiquitinierung der Zielproteine des 26S Proteasoms verantwortlich (Busch et al., 2003). Im Fall von RosA wurde die Funktionalität der PEST-Sequenzen allerdings nicht experimentell bestätigt.

Außer der theoretischen postranskriptionellen Regulierung mittels Ubiquitinierung von RosA gibt es noch experimentelle Hinweise auf eine Regulation der Funktion des Proteins. So zeigte das mit GFP fusionierte RosA eine Lokalisierung im Zytoplasma und im Zellkern. Nur wenn das Protein stark verkürzt wurde (<294 Aminosäuren), lokalisierte es hauptsächlich im Zellkern. Die Fusion der Region von As 294-449 an die NLS eines anderen Transkriptionsfaktors reichte aus, um den Kerneintritt zu erschweren (allerdings nicht, um ihn komplett zu verhindern). Dabei ist zu beachten, dass alle GFP-Konstrukte unter Kontrolle des *alcA*-Promotors stehen, und deshalb stärker als in der natürlichen Situation exprimiert werden. Die Hinweise lassen den Schluss zu, dass RosA stark reguliert ist. Sowohl die Transkription, die Proteinstabilität und die Lokalisierung des Proteins sind durch diese Regulation betroffen. Dass die verschiedenen Regulationen von RosA eine wichtige Bedeutung haben, zeigt sich durch den drastischen Effekt, der durch die Überexpression von *rosA* hervorgerufen wird.

Insgesamt lässt sich aus den in dieser Arbeit gewonnen Daten Folgendes schließen. *rosA* ist ein Regulator, der die Einleitung der sexuellen Entwicklung unter bestimmten Bedingungen verhindert. Es wird selber sehr stark reguliert, sowohl transkriptionell, wie auch

posttranslational. Im natürlichen Habitat ist es für den Pilz essentiell, die zeit- und energieaufwendige sexuelle Entwicklung nur unter Bedingungen einzuleiten, die eine erfolgreiche Beendigung auch zulassen. Deshalb scheint es nur natürlich, dass Regulatoren diesen Prozess genau koordinieren. RosA ist anscheinend einer dieser Regulatoren.

Funktion von *nosA*

Die molekulare Analyse des zweiten Zn(II)₂Cys₆ binukleären Clusterproteins, NosA, zeigte Folgendes. NosA ist für eine richtig funktionierende sexuelle Entwicklung notwendig. Die Einleitung der sexuellen Entwicklung funktioniert noch normal, doch die Entwicklung stoppt nach der Bildung von Primordien, den ersten Anlagen der Fruchtkörper. Es bilden sich nur vereinzelt „Mikrokleistothezien“, die nur ein Zehntel der Größe reifer Kleistothezien haben. Interessanterweise finden sich in diesen „Mikrokleistothezien“ reife Ascosporen. Möglicherweise wird in diesen „Mikrokleistothezien“ der Punkt des Stopps in der Entwicklung irgendwie überbrückt und somit die eingeleitete sexuelle Entwicklung weitergeführt. Dass dies nicht besonders gut funktioniert, zeigt sich in der reduzierten Größe der Fruchtkörper. Für diese Hypothese spricht die geringe Anzahl dieser Mikrokleistothezien, nur ca. 1/100 der Menge an reifen Kleistothezien wie man sie im Wildtyp findet. In einem Stamm mit der *veA1*-Mutation, durch welche die sexuelle Fruchtkörperbildung bereits reduziert ist, finden sich nach der Deletion von *nosA* gar keine Fruchtkörper mehr. Die Mutation von *pro1* in *S. macrospora* weist einen dem *nosA* sehr ähnlichen Phänotyp auf. Auch in diesem Ascomyzeten stoppt die Fruchtkörperentwicklung zu einem sehr frühen Stadium (Masloff, et al., 1999). Im Gegensatz zu *nosA* in *A. nidulans* ist der Stopp in der Entwicklung 100%ig. Es finden sich keine Minifruchtkörper, bzw. Ascosporen. Möglicherweise gibt es in *A. nidulans* einen Faktor, der die Funktion von *nosA* in einem sehr begrenzten Rahmen übernehmen kann.

Sowohl die Proteinsequenzanalyse, wie auch die molekulare Analyse weisen auf dieselbe Funktion von *nosA* in *A. nidulans* und *pro1* in *S. macrospora* hin. Um zu klären, ob diese beiden Faktoren Homologe sind, ist der Versuch einer Komplementation in beiden Organismen mit jeweils dem Gen des anderen Organismus, notwendig. Erst danach lässt sich diese Frage eindeutig klären.

Eine endgültige Antwort auf die Frage nach der Funktion kann noch nicht gegeben werden. Es gibt aber mehrere Möglichkeiten, wie der Entwicklungsstopp bei Fehlen von NosA zustande kommen könnte. Diese werden im Einzelnen hier diskutiert.

Das Expressionsprofil von *nosA* ist nicht spezifisch für die frühe sexuelle Entwicklung. Dies ist jedoch das Stadium, in dem die Deletion am stärksten zum Ausdruck kommt. Das *nosA* Transkript findet sich in allen Differenzierungsstadien, am stärksten findet die Transkription jedoch in der späten asexuellen Entwicklung und unter Hungerbedingungen statt. Schon für die beiden Regulatoren *nsdD* und *veA* wurde eine konstitutive Expression in allen Entwicklungsstadien mit wenigen Schwankungen gezeigt, obwohl beide nur für die sexuelle Entwicklung essentiell sind (Han, et al., 2001; Kim, et al., 2002). Die Regulierung der sexuellen Entwicklung über diese Faktoren, sowie *nosA*, könnte also auf post-transkriptionelle Weise erfolgen. *nosA* unterscheidet sich von *nsdD* und *veA* aber durch eine starke Hochregulierung des Transkriptes unter Hungerbedingungen und in der späten asexuellen Entwicklung. Der Zusammenhang von Stress im Allgemeinen und Hungerstress im Speziellen mit der sexuellen Entwicklung ist bereits mehrfach diskutiert worden. So fand sich z.B. in einer cDNA-Klonbank, die spezifisch für die sexuelle Entwicklung ist, ein hoher Anteil von Sequenzen, die aufgrund ihrer Homologien eine Funktion der korrespondierenden Gene in der Anpassung an Stressbedingungen nahe legen (Scherer, 2001). Es ist möglich, dass Gene, die spezifisch in der sexuellen Entwicklung benötigt werden, auch spezifisch unter Hungerbedingungen induziert sind.

Zwei Beispiele dafür sind der Hexostransporter HxtA (Wei et al., 2004) und die Katalase/Peroxidase CpeA (Scherer et al., 2002). Beide Gene werden während der sexuellen Entwicklung und unter Hungerbedingungen stark exprimiert. Durch Northern-Blot-Experimente und Untersuchungen mit dem *in vivo* Fluoreszenzprotein GFP konnte ein Zusammenhang zwischen *nosA* und den beiden Zielgenen der sexuellen Entwicklung, *hxtA* und *cpeA*, hergestellt werden. In einem $\Delta nosA$ -Stamm war keine Expression von *hxtA* und *cpeA* unter Hungerbedingungen induzierbar. Diese beiden Gene werden von *nosA* reguliert. Die Funktion von *nosA* könnte also die Aktivierung von Zielgenen der sexuellen Entwicklung sein. Werden diese Gene nicht mehr aktiviert, stoppt die Entwicklung der Fruchtkörper zu einem sehr frühen Zeitpunkt, da z.B. die Versorgung mit Nährstoffen nicht gewährleistet ist. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wäre es interessant, eine Überexpression von *nosA* auf die Transkription von *hxtA* und *cpeA* zu untersuchen.

Neben einer spezifischen Funktion von NosA im sexuellen Zyklus und der Regulation von entwicklungsspezifischen Genen ist es auch denkbar, dass der Defekt in der sexuellen Entwicklung des $\Delta nosA$ -Stammes nicht spezifisch, sondern durch die Missregulierung des Metabolismus ausgelöst wird. Es ist seit langem bekannt, dass Stämme mit Aminosäure-Auxotrophien in *A. nidulans* die Kleistothozienentwicklung nicht beenden, auch wenn sie auf

Medien kultiviert werden, die mit der entsprechenden Aminosäure supplementiert sind (Käfer, 1977). Der Entwicklungsstopp erfolgt dabei vor der Meiose. Dieser Entwicklungsstopp lässt sich jedoch durch eine erhöhte Konzentration der Aminosäure überwinden (Busch et al., 2001; Eckert et al., 1999). In der *nosA*-Mutante erfolgte dieser Stopp jedoch früher, bzw. in den „Mikrokleistothezien“ gar nicht, und eine erhöhte Aminosäure-Konzentration im Medium führte zu keiner Veränderung. Außerdem hatten einige der untersuchten $\Delta nosA$ -Stämme keine Auxotrophie.

Besteht jedoch ein Mangel an einer einzelnen Aminosäure, z. B. Histidin oder Tryptophan, so wird in Ascomyzeten ein transkriptionelles Netzwerk von Genen verschiedener Aminosäure-Biosynthesewege aktiviert, das als „cross pathway control“ bezeichnet wird. Dieses Netzwerk wird in *A. nidulans* unter Mangelbedingungen durch den Transkriptionsfaktor CpcA aktiviert und bei ausreichender Versorgung mit Aminosäuren durch CpcB reprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein regulatorischer Zusammenhang zwischen der Kleistothezienbildung und dem „cross pathway control“ Netzwerk existiert, da die Überexpression von CpcA, unabhängig von der Aminosäureversorgung, sowohl die Aktivierung der Aminosäure-Biosynthesewege als auch den Abbruch der sexuellen Entwicklung zur Folge hat (Hoffmann et al., 2000). So könnten verschiedene metabolische Wege durch das Fehlen von NosA gestört sein, was zu einer Aktivierung des „cross pathway control“ Netzwerkes und somit zu einem Stopp der sexuellen Entwicklung in einem frühen Stadium führt. Für diese Hypothese spricht die Beobachtung, dass bei einer Überexpression von *cpcA* die sexuelle Entwicklung nach der Bildung von Primordien abbricht. Dagegen spricht allerdings, dass bei der Überexpression von *cpcA* keine „Mikrokleistothezien“ mit reifen Ascosporen gefunden wurden (Hoffmann, et al., 2000). Eine Untersuchung der *cpcA*-Transkription in der *nosA* Deletionsmutante sollte diese Frage klären. Falls NosA tatsächlich eine Rolle in der „cross pathway control“ hat, würde dies auch das Vorhandensein von Homologen von NosA in den beiden asexuellen *Aspergillen* erklären.

Eine Möglichkeit, wie *nosA* spezifisch mit der sexuellen Differenzierung zusammenhängen kann, ergibt sich bei der Betrachtung der Einleitung der sexuellen Entwicklung durch ein Pheromonsystem. In *S. cerevisiae* ist ein solches System bereits gut beschrieben (Bardwell, 2004). *S. cerevisiae* ist nicht homothallisch und benötigt für die sexuelle Entwicklung zwei Kreuzungspartner mit unterschiedlichen Kreuzungstypen. Die Erkennung zweier Hefezellen unterschiedlichen Kreuzungstyps untereinander erfolgt durch die Detektion von Peptid-Pheromonen. Jeder der beiden Kreuzungspartner gibt ein Pheromon ab, das der andere Partner mittels eines spezifischen Rezeptors detektieren kann. Die Rezeptoren, Ste2p und Ste3p, sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Durch das

gegenseitige Erkennen wird die Einleitung der sexuellen Entwicklung möglich. In *A. nidulans* finden sich beide GPCRs, *gprA* und *gprB* genannt, in einem Organismus (Seo et al., 2004). Dies erscheint bei der homothallischen Entwicklung des Pilzes einleuchtend. Wird einer dieser beiden Rezeptoren deletiert, findet sich ein ähnlicher Phänotyp, wie bei der Deletion von *nosA*. Die sexuelle Entwicklung ist gestört und es werden nur noch wenige „Mikrokleistothezien“ mit reduzierter Ascosporenzahl gebildet. Es werden leider keine genauen Angaben über die Anzahl der „Mikrokleistothezien“ gemacht, oder über die Stadien, in dem die Entwicklung abbricht. Aber allein durch die Ähnlichkeit der Phänotypen erscheint ein Verlauf der Signalweiterleitung des Pheromonsystems über *nosA* möglich. Spannend ist die Entdeckung, dass eine Überexpression von *nsdD* den Effekt der Deletion von *gprA*, bzw. *gprB* teilweise ausgleichen kann, also wieder große Kleistothezien gebildet werden (Seo, et al., 2004). In der *nosA*-Deletionsmutante ist dies durch Überexpression von *nsdD* nicht möglich. Hypothetisch läuft die Signalweiterleitung der Pheromonantwort über *nsdD* zu *nosA* und dann zu den Zielgenen der sexuellen Entwicklung.

Einordnung von RosA und NosA in das bisher bekannte Bild

Unter den bisher bekannten Proteinen mit Einfluss auf die sexuelle Entwicklung sind sehr wenige Zusammenhänge gezeigt. Wie lassen sich die beiden in dieser Arbeit charakterisierten putativen Transkriptionsfaktoren in das Bild der bisher beschriebenen Faktoren einbringen? RosA wirkt als ein Repressor der sexuellen Entwicklung unter für die sexuelle Entwicklung unpassenden Bedingungen, wie Flüssigkulturen, niedrigen Glukosekonzentrationen, hohen Salzkonzentrationen, und unzureichenden Stickstoffquellen. Dazu reprimiert RosA die Transkription der Regulatoren *veA*, *nsdD*, *stuA* und *nosA*, was für eine Flüssigkultur gezeigt wurde. Die Lichtregulation, die für einen Wechsel zwischen sexueller und asexueller Entwicklung notwendig ist, ist von RosA unabhängig.

Die Funktion von NosA liegt nach der Einleitung der sexuellen Entwicklung. Im Gegensatz zu den bekannten Regulatoren VeA und NsdD wird die sexuelle Entwicklung in der *nosA* Deletionsmutante noch eingeleitet und stoppt nach der Bildung von Hüllezellnestern mit Primordien. In Flüssigkultur wird die Transkription von *nosA* durch *rosA* reprimiert. Die Einleitung der sexuellen Entwicklung auf festem Medium kann durch ein ähnliches Pheromonsystem eingeleitet werden, wie dem aus *S. cerevisiae* Bekannten. Die Detektion der Pheromone erfolgt über die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren *gprA* und *gprB*. Die Weiterleitung der Signale läuft unter anderem auch über *nsdD*. Allerdings kann die verstärkte Expression von *nsdD* den Effekt der *nosA* Deletion nicht überbrücken, somit liegt *nsdD* in der

Regulationskaskade entweder vor *nosA*, oder es gibt zwei parallele Wege, die sich untereinander hindern. Der „cross pathway control“-Weg könnte ein solcher sein. Wenn das Signal bei NosA ankommt, reguliert NosA die Expression von Zielgenen der sexuellen Entwicklung, wie z.B. *cpeA* und *hxtA*. Es kommt zur Bildung von reifen Fruchtkörpern.

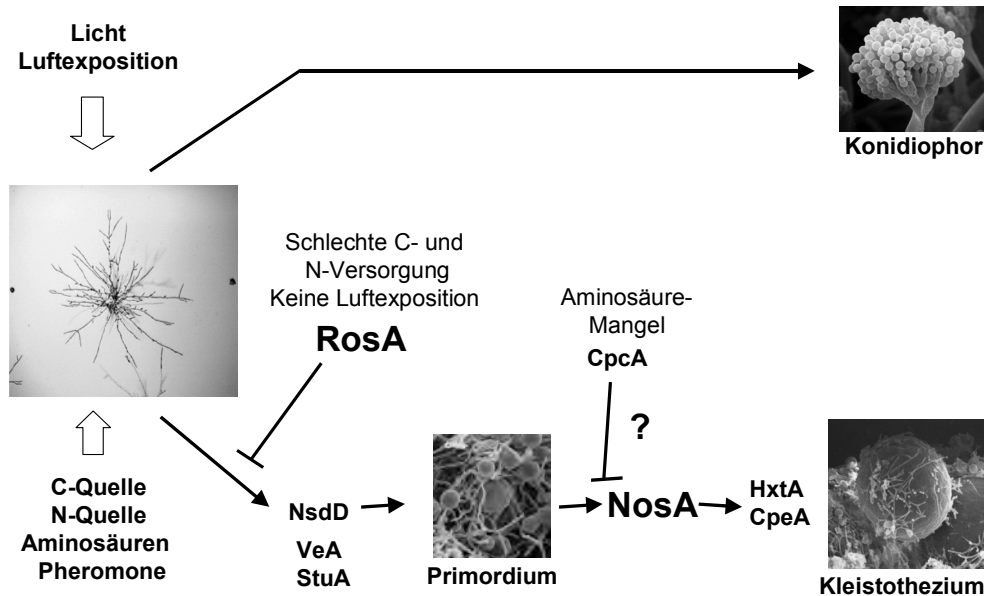


Abb. 36: Einfaches Schema zur möglichen Funktion von NosA und RosA in der sexuellen Entwicklung von *A. nidulans*. Die auf das vegetativ wachsende Myzel wirkenden Faktoren, wie Licht oder Pheromone, bewirken eine asexuelle oder sexuelle Differenzierung des Myzels, oder einen Verbleib im vegetativen Wachstum. RosA verhindert die Einleitung der sexuellen Entwicklung, unter anderem bei schlechter Versorgung mit Kohlenhydraten oder bei fehlender Luftexposition. Dies geschieht durch Reprimierung der Transkription von Regulatoren, wie NsdD, VeA und StuA. Diese drei Regulatoren werden für die Entstehung von Primordien benötigt. NosA ist für Bildung reifer Kleistothezien notwendig. Es kontrolliert die Expression von *hxtA* und *cpeA*, zwei Zielgenen der sexuellen Entwicklung. Der Stopp der Entwicklung zum gleichen Zeitpunkt, an dem CpeA unter Aminosäuremangel die Fruchtkörperbildung stoppt, lässt Vermutungen über eine gemeinsame Funktion zu. Da eine Überexpression von *nsdD* die Deletion von *nosA* nicht ausgleichen kann, muss *nsdD* in der Entwicklungskaskade vor *nosA* liegen, oder einen parallelen Weg folgen.

Proteomanalyse

In der Proteomanalyse wurden verschiedene Entwicklungsstadien von *A. nidulans* untersucht und miteinander verglichen. Dies geschah unter Zuhilfenahme von Mutanten, die einen Defekt in der Entwicklung haben. Somit ergab sich gleichzeitig zur Analyse der Proteinmuster in den verschiedenen Entwicklungsstadien die Möglichkeit Zielgene der Regulatoren, die in den verwendeten Mutanten defekt sind, zu finden. Durch den Vergleich der verschiedenen Stämme zu einem frühen und einem späten Stadium konnte zwischen Proteinen, die z.B. unter Hungerbedingungen stärker exprimiert werden oder spezifisch für die sexuelle Entwicklung sind, unterschieden werden. Es konnten sehr viele differenziell exprimierte Proteine gefunden werden, wobei die Identifikation und Charakterisierung dieser Proteine bisher erst für einige Kandidaten gelang.

Trotzdem finden sich bereits unter den bisher identifizierten Proteinen einige interessante neue Faktoren, aber auch ein paar bereits beschriebene Proteine. So findet sich zum frühen Zeitpunkt der Entwicklung im Wildtyp z.B. die bereits mehrfach erwähnte Katalase/Peroxidase CpeA als hochreguliertes Protein (AN7388.2). Die Proteinmenge von CpeA ist nach 48 Stunden Wachstum 2,8fach höher als nach 120 Stunden. Im $\Delta nosA$ und im $\Delta nsdD$ -Stamm sind keine Unterschiede in der Expression von CpeA erkennbar. Im bereits beschriebenen RNA-Expressionsprofil von *cpeA* beginnt die Expression nach ca. 40 Stunden und bleibt bis 160 Stunden ungefähr auf dem gleichen Stand (Scherer, et al., 2002). Dieses Ergebnis ist leicht kontrovers, doch die RNA-Mengen müssen nicht immer mit den Proteinmengen übereinstimmen. Die Stabilität der mRNA, posttranskriptionelle Kontrollen und der Proteinturnover einer Zelle beeinflussen die Menge an Protein. Interessant ist die Feststellung, dass eine weitere Katalase, CatB (AN9339.2), zu diesem Zeitpunkt auch stärker exprimiert wird. Beide Proteine sind für den Abbau von reaktiven Sauerstoffverbindungen notwendig. Da die Hypothese besteht, dass reaktive Sauerstoffverbindungen („reactive oxygen species“, ROS) als Signalstoffe an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind, passt die Expression von Proteinen, die diese ROS wieder abbauen, bevor sie dem Pilz schaden können, sehr gut ins Bild. Die alte Idee von ROS als Signalstoffen bekam aus Untersuchungen mit einer NADPH-Oxygenase wieder Aktualität. Diese Oxygenase, *noxA*, ist in *A. nidulans* für die Bildung von ROS verantwortlich. Eine Deletion von *noxA* verhindert die Bildung von reifen Fruchtkörpern (Lara-Ortiz, 2004).

Die bisher beschriebene Expression von CatB findet hauptsächlich in wachsenden Hyphen und unter oxidativem Stress, durch Zusatz von H_2O_2 hervorgerufen, statt (Kawasaki et al., 1997). Allerdings wurden bisher keine Kulturen untersucht, in denen die sexuelle Entwicklung induziert ist. So ist möglicherweise auch eine Funktion von *catB* in der frühen sexuellen Entwicklung zu finden. CatB wird im Gegensatz zu CpeA sowohl im Wildtyp, als auch im $\Delta nosA$ -Stamm zum frühen Zeitpunkt der Entwicklung stärker als nach 120 Stunden exprimiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Transkription von *cpeA* von *nosA* abhängig ist. So erklärt sich, warum *cpeA* im $\Delta nosA$ -Stamm nicht differenziell exprimiert wird. Da *catB* auch noch im $\Delta nosA$ -Stamm differenzielle Expression zeigt, ist die Regulation von *catB* entweder unabhängig von *nosA*, oder die Regulation erfolgt über weitere Faktoren.

Zum frühen Zeitpunkt der sexuellen Entwicklung finden sich auch potentielle Regulatoren, wie z.B. zwei Proteine der sogenannten 14-3-3 Familie (AN4501.2 und AN5744.2). Die Familie der 14-3-3 Proteine besteht aus kleinen, sauren Proteinen, die in allen Eukaryoten zu finden sind (van Hemert et al., 2001). Sie sind an einer Vielzahl von zellulären

Prozessen beteiligt, wobei die Annahme besteht, dass die 14-3-3 Proteine als eine Art Adapter an Zielproteinen hängen, und somit unter anderem spezifische Protein-Interaktionen ermöglichen (Yaffe, 2002). Im Genom von *A. nidulans* finden sich zwei putative 14-3-3 Proteine. Beide sind in der frühen sexuellen Entwicklung hochreguliert. Eines der beiden Proteine (AN4501.2) wurde bereits in *A. nidulans* als ArtA beschrieben (Kraus et al., 2002). Eine Überexpression von *artA* hat eine reduzierte Auskeimungsrate von Konidien zur Folge. Bei Wachstum auf Agarplatten und ständiger Überexpression sind die Kolonien wesentlich kleiner und kompakter und bilden keine asexuellen Sporenträger. Leider wurden die ArtA-Überexpressionstämme nicht auf den Beginn der sexuellen Entwicklung untersucht. Eine Funktion von ArtA in der sexuellen Entwicklung ist aber denkbar. Zum einen wird während der Fruchtkörperbildung die asexuelle Sporulation verhindert, was genau der Befund der Expression von ArtA ist. Zum anderen ist das Wachstum gehemmt, ein Effekt der bereits in anderen Mutanten mit verstärkter sexueller Entwicklung beschrieben ist (Han, et al., 2004). Über das zweite 14-3-3 Protein ist noch nichts bekannt. Da es keine verstärkte Expression dieser beiden Proteine im $\Delta nosA$ -Stamm gibt, sind beide Gene möglicherweise von *nosA* reguliert.

Auch wenn der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der sexuellen Entwicklung liegt, soll hier kurz ein Protein erwähnt werden, das zum späten Zeitpunkt der asexuellen Entwicklung stärker exprimiert wird. Im $\Delta nsdD$ -Stamm nach 120 Stunden findet sich unter den stärker exprimierten Proteinen eine bereits in *A. nidulans* charakterisierte vakuoläre ATPase (AN8021.2), Vma1 genannt (Melin et al., 2004). Eine Deletion dieser vakuolären ATPase beeinträchtigt den Pilz stark im Wachstum und verhindert komplett die Bildung asexueller Sporen. Welche Funktion diese vakuoläre ATPase zu diesem Zeitpunkt nach der abgeschlossenen Konidienbildung hat, bleibt zu klären.

Zum Zeitpunkt der späten sexuellen Entwicklung findet sich im Wildtyp, sowie im $\Delta nosA$ -Stamm ein stärker exprimiertes Protein (AN3756.2), das Ähnlichkeit zu Pre3p aus *S. cerevisiae* hat. Pre3p ist eine Untereinheit des 20S Proteasom Endopeptidase Komplexes (Enekel et al., 1994). In *A. nidulans* gibt es bereits indirekte Hinweise auf die wichtige Funktion des gezielten Proteinabbaus während der sexuellen Entwicklung durch das Proteasom. Diese Hinweise kommen durch Untersuchungen am COP9 Signalosom (Busch, et al., 2003).

Eine endgültige Antwort auf die Funktion der Proteine in der Zelle kann jedoch nur durch eine genaue molekulare Analyse erfolgen. Dafür ist eine Deletion des jeweiligen Gens unerlässlich. Meist ist die Herstellung einer Deletionsmutante der zeitaufwendigste Schritt bei der Charakterisierung eines Gens. Eine kürzlich gemachte Entdeckung in dem filamentösen Ascomyzeten *N. crassa* kann diesen Prozess allerdings extrem beschleunigen, so dass auch viele Gene innerhalb von kurzer Zeit deletiert werden können. Wird in diesem Pilz eins der beiden Gene ausgeschaltet, die an der nicht-homologen Rekombination beteiligt sind (*mus-51*, bzw. *mus-52*), erfolgt in diesem Stamm die homologe Rekombination wesentlich häufiger. Es wird von einer Quote von ungefähr 95% berichtet, wenn die homologen, flankierenden Regionen ca. 500 Basenpaare lang sind (Ninomiya et al., 2004). In *A. nidulans* wurde eines der entsprechenden Gene ebenfalls deletiert, und auch hier ist dieser Effekt zu beobachten (persönliche Mitteilung, S. Osmani). Mit Hilfe dieses Stammes, der jetzt in unserem Labor vorliegt, vereinfacht sich die Suche nach Deletionsmutanten enorm. Eine Suche nach Mutanten mit einem Defekt in der sexuellen Entwicklung aus den vielen potentiellen Kandidaten des Proteom-Vergleiches, erscheint somit realistisch und durchführbar.

VI. Literatur

Adams, T. H., Boylan, M. T. & Timberlake, W. E. (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**, 353-62.

Adams, T. H., Deising, H. & Timberlake, W. E. (1990). *brlA* requires both zinc fingers to induce development. *Mol Cell Biol* **10**, 1815-7.

Adams, T. H., Hide, W. A., Yager, L. N. & Lee, B. N. (1992). Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **12**, 3827-33.

Adams, T. H. & Timberlake, W. E. (1990). Upstream elements repress premature expression of an *Aspergillus* developmental regulatory gene. *Mol Cell Biol* **10**, 4912-9.

Adams, T. H., Wieser, J. K. & Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 35-54.

Andrianopoulos, A. & Timberlake, W. E. (1991). ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* **3**, 747-8.

Andrianopoulos, A. & Timberlake, W. E. (1994). The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**, 2503-15.

Aramayo, R., Adams, T. H. & Timberlake, W. E. (1989). A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **122**, 65-71.

Aramayo, R. & Timberlake, W. E. (1993). The *Aspergillus nidulans yA* gene is regulated by *abaA*. *Embo J* **12**, 2039-48.

Axelrod, D. E., Gealt, M. & Pastushok, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **34**, 9-15.

Bardwell, L. (2004). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **25**, 1465-76.

Bechet, J., Greenon, M. & Wiame, J. (1970). Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **12**, 31-9.

Benjamin, C. R. (1955). Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia* **47**, 669-687.

Bennet, J. W. & Kilch, M. A. (1992). *Aspergillus*. *Biology and industrial applications*.

Berman, D. M., Kozasa, T. & Gilman, A. G. (1996). The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J Biol Chem* **271**, 27209-12.

Birse, C. E. & Clutterbuck, A. J. (1991). Isolation and developmentally regulated expression of an *Aspergillus nidulans* phenol oxidase-encoding gene, *ivoB*. *Gene* **98**, 69-76.

- Blumenstein, A. (2004).** Identifizierung und Charakterisierung des Phytochroms PhsA als Rotlicht-Sensor in *Aspergillus nidulans*. Marburg: Philipps-Universität.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., Loros, J. J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E. U., Sachs, M. S., Marzluf, G. A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D. J., Zelter, A., Kalkman, E. R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W. & Pratt, R. (2004).** Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 1-108, table of contents.
- Bowdish, K. S., Yuan, H. E. & Mitchell, A. P. (1995).** Positive control of yeast meiotic genes by the negative regulator UME6. *Mol Cell Biol* **15**, 2955-61.
- Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., Zimmerman, C. R. & Timberlake, W. E. (1987).** Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**, 3113-8.
- Braus, G. H., Krappmann, S. & Eckert, S. E. (2002).** *Sexual development in ascomycetes: Fruit body formation of Aspergillus nidulans*. New York:: Marcel Decker, Inc.
- Burglin, T. R. (1991).** The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* **66**, 11-2.
- Busch, S., Eckert, S. E., Krappmann, S. & Braus, G. H. (2003).** The COP9 signalosome is an essential regulator of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **49**, 717-30.
- Busch, S., Hoffmann, B., Valerius, O., Starke, K., Duvel, K. & Braus, G. H. (2001).** Regulation of the *Aspergillus nidulans* *hisB* gene by histidine starvation. *Curr Genet* **38**, 314-22.
- Champe, S. P. & el-Zayat, A. A. (1989).** Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **171**, 3982-8.
- Champe, S. P., Rao, P. & Chang, A. (1987).** An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **133**, 1383-7.
- Champe, S. P. & Simon, L. D. (1992).** Cellular differentiation and tissue formation. In *Morphogenesis: an analysis of the development of biological form.*, pp. 63-91. Edited by E. F. Rossomando & S. Alexander. New York: Marcel Dekker.
- Clutterbuck, A. J. (1969).** A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**, 317-27.
- Clutterbuck, A. J. (1994).** Mutants of *Aspergillus nidulans* deficient in nuclear migration during hyphal growth and conidiation. *Microbiology* **140**, 1169-1174.
- Creppy, E. E. (2002).** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* **127**, 19-28.

- Dietzel, C. & Kurjan, J. (1987).** The yeast SCG1 gene: a G alpha-like protein implicated in the a- and alpha-factor response pathway. *Cell* **50**, 1001-10.
- Dutton, J. R., Johns, S. & Miller, B. L. (1997).** StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **16**, 5710-21.
- Dyer, P. S., Paoletti, M. & Archer, D. B. (2003).** Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* **149**, 2301-3.
- Eckert, S. E., Hoffmann, B., Wanke, C. & Braus, G. H. (1999).** Sexual development of *Aspergillus nidulans* in tryptophan auxotrophic strains. *Arch Microbiol* **172**, 157-66.
- Endo, H., Kajiwara, S., Tsunoka, O. & Shishido, K. (1994).** A novel cDNA, *priBc*, encoding a protein with a Zn(II)₂Cys₆ zinc cluster DNA-binding motif, derived from the basidiomycete *Lentinus edodes*. *Gene* **139**, 117-21.
- Enenkel, C., Lehmann, H., Kipper, J., Guckel, R., Hilt, W. & Wolf, D. H. (1994).** PRE3, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked LMP2 (RING12) gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity. *FEBS Lett* **341**, 193-6.
- Esser, K. & Straub, J. (1958).** Genetische Untersuchungen an *Sordaria macrospora* Auersw.: Kompensation und Induktion bei genbedingten Entwicklungsdefekten. *Zur Vererbungslehre* **89**, 729-746.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L., Wortman, J., Batzoglou, S., Brudno, M., Lee, S., Bastürkmen, M., Spevak, C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Caddick, M., Braus, G., D'Enfert, C., Griffiths-Jones, D., Vienken, K., Pain, A., Selker, E., Archer, D., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Machida, M., Nierman, B., Denning, D., Hynes, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M., Morris, R., Osmani, S. & Birren, B.** Comparative Analysis of *Aspergillus nidulans*. *Nature in revision*.
- Gardner, K. H., Pan, T., Narula, S., Rivera, E. & Coleman, J. E. (1991).** Structure of the binuclear metal-binding site in the GAL4 transcription factor. *Biochemistry* **30**, 11292-302.
- Gimeno, C. J. & Fink, G. R. (1994).** Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* **14**, 2100-12.
- Gurr, S. J., Unkles, S. E. & Kinghorn, J. R. (1987).** The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In *Gene structure in eukaryotic microbes*, pp. 93-138. Edited by J. R. Kinghorn. Oxford - Washington DC: IRL PRESS.
- Hagen, D. C., McCaffrey, G. & Sprague, G. F., Jr. (1986).** Evidence the yeast STE3 gene encodes a receptor for the peptide pheromone a factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1418-22.
- Han, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y. & Han, D. M. (2001).** The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**, 299-309.

- Han, K. H., Seo, J. A. & Yu, J. H. (2004).** A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **51**, 1333-45.
- Hartmann-Petersen, R. & Gordon, C. (2004).** Protein degradation: recognition of ubiquitinated substrates. *Curr Biol* **14**, R754-6.
- Hicks, J. K., Yu, J. H., Keller, N. P. & Adams, T. H. (1997).** *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *Embo J* **16**, 4916-23.
- Hoffmann, B., Wanke, C., Lapaglia, S. K. & Braus, G. H. (2000).** c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **37**, 28-41.
- Johnson, A. D. (1995).** Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 552-8.
- Käfer, E. (1977).** The anthranilate synthetase enzyme complex and the trifunctional *trpC* gene of *Aspergillus*. *Can J Genet Cytol* **19**, 723-38.
- Käfer, E. (1977).** Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* **19**, 33-131.
- Kämper, J. (2004).** A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-10.
- Kapelari, B., Bech-Otschir, D., Hegerl, R., Schade, R., Dumdey, R. & Dubiel, W. (2000).** Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J Mol Biol* **300**, 1169-78.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K. & Aguirre, J. (2002).** SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**, 1153-63.
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R. & Aguirre, J. (1997).** Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**, 3284-92.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K. & Chae, K. (2002).** The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**, 72-80.
- Klopotowski, T. & Wiater, A. (1965).** Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Arch Biochem Biophys* **112**, 562-6.
- Klose, J. (1975).** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-43.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W., Donaton, M. C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J. H. & Thevelein, J. M. (1999).** A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**, 1002-12.

- Kraus, P. R., Hofmann, A. F. & Harris, S. D. (2002).** Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. *FEMS Microbiol Lett* **210**, 61-6.
- Kupfer, D. M., Drabenstot, S. D., Buchanan, K. L., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D. W., Roe, B. A. & Murphy, J. W. (2004).** Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot Cell* **3**, 1088-100.
- Kurihara, L. J., Stewart, B. G., Gammie, A. E. & Rose, M. D. (1996).** Kar4p, a karyogamy-specific component of the yeast pheromone response pathway. *Mol Cell Biol* **16**, 3990-4002.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H. & Aguirre, J. (2003).** Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **50**, 1241-55.
- Latge, J. P. (2001).** The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **9**, 382-9.
- Lee, B. N. & Adams, T. H. (1994).** The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**, 641-51.
- Lee, B. N. & Adams, T. H. (1994).** Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol* **14**, 323-34.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lusmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K. H. (2004).** ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**, 1363-71.
- Makimura, K., Hanazawa, R., Takatori, K., Tamura, Y., Fujisaki, R., Nishiyama, Y., Abe, S., Uchida, K., Kawamura, Y., Ezaki, T. & Yamaguchi, H. (2001).** Fungal flora on board the Mir-Space Station, identification by morphological features and ribosomal DNA sequences. *Microbiol Immunol* **45**, 357-63.
- Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M. & Harrison, S. C. (1992).** DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* **356**, 408-14.
- Marshall, M. A. & Timberlake, W. E. (1991).** *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**, 55-62.
- Martinelli, S. D. (1979).** Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **114**, 277-87.
- Martinelli, S. D. & Clutterbuck, A. J. (1971).** A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **69**, 261-8.
- Masloff, S., Poggeler, S. & Kuck, U. (1999).** The *proI*⁺ gene from *Sordaria macrospora* encodes a C₆ zinc finger transcription factor required for fruiting body development. *Genetics* **152**, 191-9.

- Mayorga, M. E. & Timberlake, W. E. (1990).** Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *wA* gene. *Genetics* **126**, 73-9.
- Melin, P., Schnurer, J. & Wagner, E. G. (2004).** Disruption of the gene encoding the V-ATPase subunit A results in inhibition of normal growth and abolished sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **150**, 743-8.
- Messenguy, F., Dubois, E. & Descamps, F. (1986).** Nucleotide sequence of the ARGRII regulatory gene and amino acid sequence homologies between ARGRII PPRI and GAL4 regulatory proteins. *Eur J Biochem* **157**, 77-81.
- Miller, K. Y., Toennis, T. M., Adams, T. H. & Miller, B. L. (1991).** Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol Gen Genet* **227**, 285-92.
- Miller, K. Y., Wu, J. & Miller, B. L. (1992).** StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev* **6**, 1770-82.
- Mingot, J. M., Espeso, E. A., Diez, E. & Penalva, M. A. (2001).** Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol Cell Biol* **21**, 1688-99.
- Mirabito, P. M., Adams, T. H. & Timberlake, W. E. (1989).** Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**, 859-68.
- Mooney, J. L. & Yager, L. N. (1990).** Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**, 1473-82.
- Morris, N. R. (1976).** Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genet Res.* **26**, 237-254.
- Mösch, H. U., Scheier, B., Lahti, R., Mantsala, P. & Braus, G. H. (1991).** Transcriptional activation of yeast nucleotide biosynthetic gene ADE4 by GCN4. *J Biol Chem* **266**, 20453-6.
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G. & Marton, M. J. (2001).** Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**, 4347-68.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C. & Inoue, H. (2004).** Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12248-53.
- Nowrousian, M., Masloff, S., Poggeler, S. & Kuck, U. (1999).** Cell differentiation during sexual development of the fungus *Sordaria macrospora* requires ATP citrate lyase activity. *Mol Cell Biol* **19**, 450-60.
- O'Farrell, P. H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-21.
- Pan, T. & Coleman, J. E. (1990).** GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2077-81.

- Pan, T. & Coleman, J. E. (1991).** Sequential assignments of the ^1H NMR resonances of $\text{Zn}(\text{II})_2$ and $^{113}\text{Cd}(\text{II})_2$ derivatives of the DNA-binding domain of the GAL4 transcription factor reveal a novel structural motif for specific DNA recognition. *Biochemistry* **30**, 4212-22.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. & Bufton, A. W. J. (1953).** The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141-238.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S. W. (1996).** PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-71.
- Reed, R. & Maniatis, T. (1988).** The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **2**, 1268-76.
- Richardson, M. D. & Kokki, M. H. (1999).** New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections. *Ann Med* **31**, 327-35.
- Ron, D., Chen, C. H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. & Mochly-Rosen, D. (1994).** Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 839-43.
- Roncal, T., Cordobes, S., Sterner, O. & Ugalde, U. (2002).** Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. *Eukaryot Cell* **1**, 823-9.
- Rubin-Bejerano, I., Mandel, S., Robzyk, K. & Kassir, Y. (1996).** Induction of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on conversion of the transcriptional repressor Ume6 to a positive regulator by its regulated association with the transcriptional activator Ime1. *Mol Cell Biol* **16**, 2518-26.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, R. A. (1992).** Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. *Biotechnologie* **23**, 355-90.
- Scherer, M. (2001).** Molekulare Analyse der sexuellen Entwicklung von *Aspergillus nidulans*. Marburg: Philipps-Universität.
- Scherer, M., Wei, H., Liese, R. & Fischer, R. (2002).** *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. *Eukaryot Cell* **1**, 725-35.
- Schwechheimer, C. (2004).** The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 45-54.
- Seo, J. A., Han, K. H. & Yu, J. H. (2004).** The *gprA* and *gprB* genes encode putative G protein-coupled receptors required for self-fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **53**, 1611-23.
- Sewall, T. C., Mims, C. W. & Timberlake, W. E. (1990).** *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **2**, 731-9.
- Sewall, T. C., Mims, C. W. & Timberlake, W. E. (1990).** Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Dev Biol* **138**, 499-508.

- Sievers, N., Krüger, M. & Fischer, R. (1997).** Kreuzung von *Aspergillus nidulans*. *Biol. Unserer Zeit* **6**, 383-388.
- Skromne, I., Sanchez, O. & Aguirre, J. (1995).** Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141** (Pt 1), 21-8.
- Strich, R., Surosky, R. T., Steber, C., Dubois, E., Messenguy, F. & Esposito, R. E. (1994).** UME6 is a key regulator of nitrogen repression and meiotic development. *Genes Dev* **8**, 796-810.
- Stringer, M. A., Dean, R. A., Sewall, T. C. & Timberlake, W. E. (1991).** Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev* **5**, 1161-71.
- Stringer, M. A. & Timberlake, W. E. (1995).** *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol Microbiol* **16**, 33-44.
- Suelmann, R., Sievers, N. & Fischer, R. (1997).** Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **25**, 757-69.
- Sze, J. Y., Remboutsika, E. & Kohlhaw, G. B. (1993).** Transcriptional regulator Leu3 of *Saccharomyces cerevisiae*: separation of activator and repressor functions. *Mol Cell Biol* **13**, 5702-9.
- Sze, J. Y., Woontner, M., Jaehning, J. A. & Kohlhaw, G. B. (1992).** In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate. *Science* **258**, 1143-5.
- Timberlake, W. E. (1990).** Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu Rev Genet* **24**, 5-36.
- Timberlake, W. E. (1991).** Temporal and spatial controls of *Aspergillus* development. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 351-7.
- Todd, R. B. & Andrianopoulos, A. (1997).** Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* **21**, 388-405.
- Toews, M. W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., Vinuesa, C., Wei, H. & Fischer, R. (2004).** Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in vitro (GATEWAY). *Curr Genet* **45**, 383-9.
- Tsitsigiannis, D. I., Zarnowski, R. & Keller, N. P. (2004).** The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **279**, 11344-53.
- Vallim, M. A., Miller, K. Y. & Miller, B. L. (2000).** *Aspergillus* SteA (sterile12-like) is a homeodomain-C2/H2-Zn⁺² finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol Microbiol* **36**, 290-301.
- van Hemert, M. J., Steensma, H. Y. & van Heusden, G. P. (2001).** 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**, 936-46.

- Ward, M. (1991).** *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. In *Modern microbial genetics*, pp. 455-496: Wiley-Liss, Inc.
- Waring, R. B., May, G. S. & Morris, N. R. (1989).** Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**, 119-30.
- Wei, H., Requena, N. & Fischer, R. (2003).** The MAPKK kinase SteC regulates conidiophore morphology and is essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **47**, 1577-88.
- Wei, H., Scherer, M., Singh, A., Liese, R. & Fischer, R. (2001).** *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (mutanase), *mutA*, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. *Fungal Genet Biol* **34**, 217-27.
- Wei, H., Vienken, K., Weber, R., Bunting, S., Requena, N. & Fischer, R. (2004).** A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genet Biol* **41**, 148-56.
- Wieser, J., Lee, B. N., Fondon, J., 3rd & Adams, T. H. (1994).** Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**, 62-9.
- Wieser, J., Yu, J. H. & Adams, T. H. (1997).** Dominant mutations affecting both sporulation and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **32**, 218-24.
- Wolf, D. A., Zhou, C. & Wee, S. (2003).** The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol* **5**, 1029-33.
- Wu, J. & Miller, B. L. (1997).** *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. *Mol Cell Biol* **17**, 6191-201.
- Xu, X., Zeng, W., Popov, S., Berman, D. M., Davignon, I., Yu, K., Yowe, D., Offermanns, S., Muallem, S. & Wilkie, T. M. (1999).** RGS proteins determine signaling specificity of Gq-coupled receptors. *J Biol Chem* **274**, 3549-56.
- Yaffe, M. B. (2002).** How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* **513**, 53-7.
- Yu, J. H., Wieser, J. & Adams, T. H. (1996).** The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *Embo J* **15**, 5184-90.
- Zonneveld, B. J. M. (1977).** Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*. In *Genetics and Physiology of Aspergillus*, pp. 58-80. Edited by J. E. Smith & J. A. Pateman. London: Academic Press.

Genetics, 169(2) (2005):619-630

**The Zn(II)₂Cys₆ Putative *Aspergillus nidulans* Transcription Factor RosA
(Repressor of Sexual Development) Inhibits Sexual Development Under
Low-Carbon Conditions and in Submersed Culture**

Kay Vienken, Mario Scherer and Reinhard Fischer

Here we have characterized the putative Zn(II)₂Cys₆ transcription factor RosA from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. The *rosA* gene encodes a protein of 713 aa, which shares 38% sequence similarity to Pro1 from *Sordaria macrospora*. In contrast to Pro1, which promotes the transition from protoperithecia to perithecia, RosA is a negative regulator of sexual development in *A. nidulans*. Transcript levels of *rosA* were usually very low and were only transiently upregulated upon carbon starvation and at 12 hr of asexual development. Deletion of *rosA* only slightly induced fruiting-body formation under standard culture conditions, but enabled sexual development under low-glucose and high-osmolarity conditions and the production of Hülle cells under submersed growth conditions. Stimulation of fruiting-body formation on agar surfaces was dependent on *veA*. In Δ *rosA* strains, transcript levels of the sexual developmental regulators *nsdD*, *veA*, and *stuA* were increased. Overexpression of *rosA* led to a reduction of hyphal growth and to a *fluffy* phenotype. Post-transcriptional regulation of RosA, with a regulated accumulation in the nucleus, was shown using a RosA-GFP fusion protein. We propose that RosA represses sexual development upon integration of several environmental signals.

Fungal Genetics and Biology 41 (2004) 148–156

A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation

Huijun Wei, Kay Vienken, Robert Weber, Sam Bunting, Natalia Requena,
and Reinhard Fischer

Abstract. Fungi employ different carbohydrate uptake systems to adapt to certain environmental conditions and to different carbon source concentrations. The hydrolysis of polymeric carbohydrates and the subsequent uptake of monomeric forms may also play a role in development. *Aspergillus nidulans* accumulates cell wall components during vegetative growth and degrades them during sexual development. We have identified the *hxtA* (high affinity hexose transporter) gene in a differential library, which was enriched for sexual-specific genes. The *hxtA* gene is disrupted by 6 introns and predicted to encode a 531 amino acid protein with high similarity to major facilitator superfamily members including the high affinity hexose transporter Gtt1 from *Trichoderma harzianum*. *A. nidulans* HxtA contains the 12 predicted transmembrane domains characteristic for this family. Deletion of *hxtA* did not impair growth of *A. nidulans* on a variety of carbon sources nor did it inhibit sexual development suggesting redundant sugar uptake systems. We found at least 17 putative hexose transporters in the genome of *A. nidulans*. Despite the high similarity of HxtA to fungal high affinity glucose transporters, the *hxtA* gene did not restore growth on glucose of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant, in which all hexose transporters were deleted. Northern blot analysis revealed that the *A. nidulans hxtA* gene was repressed under high glucose conditions and expressed in vegetative hyphae upon carbon starvation and during sexual development. We found *hxtA(p)::sgfp* expression in developing cleistothecia specifically in ascogenous hyphae and propose that HxtA is a high affinity glucose transporter involved in sugar metabolism during sexual development.

Current Genetics, (2004), 45:883-889

Establishment of mRFP1 as fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination *in vitro* (GATEWAY)

W. M. Toews, J. Warmbold, S. Konzack, P. E. Rischitor, D. Veith,
K. Vienken, C. Vinuesa, H. Wei, and R. Fischer

Abstract. The advent of fluorescent proteins as vital dyes had a major impact in many research fields. Different GFP variants have been established in pro- and eukaryotic organisms within the past ten years as well as other fluorescent proteins discovered and applied. We expressed the red fluorescent protein, DsRed (T4), the improved version mRFP1 (monomeric red fluorescent protein) and the blue fluorescent protein, BFP, in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Whereas DsRed requires tetramer formation for fluorescence, mRFP1 functions as monomer. We have used sGFP, DsRed (T4), mRFP1 and BFP for nuclear and/or mitochondrial labelling. To facilitate gene tagging, we established a number of cloning vectors for efficient, simultaneous fusion of any protein with mRFP1, BFP (blue fluorescent protein) and sGFP (green fluorescent protein) or the hemagglutinin epitope 3xHA. A PCR-amplified gene of interest can be inserted into the expression vectors without cloning but using homologous recombination *in vitro* (GATEWAY). The vectors contain the *argB* gene as selection marker for *A. nidulans*, and the inducible *alcA* promoter for control of expression. The system allows labelling of a protein with several tags in one recombination reaction. The nutritional marker gene as well as the promoter, are frequently used in other fungi, suggesting that this set of expression vectors will be very useful tools for gene analyses in a genome-wide scale.

Nature, *in revision*

Sequencing and Comparative Analysis of *Aspergillus nidulans*

James E. Galagan, Sarah E. Calvo, Christina Cuomo, Li-Jun Ma, Jennifer Wortman, Serafim Batzoglou, Su-In Lee, Meray Bastürkmen, Christina C. Spevak, John Clutterbuck, Vladimir Kapitonov, Jerzy Jurka, Claudio Scazzocchio, Mark Farman, Jonathan Butler, Seth Purcell, Steve Harris, Gerhard H. Braus, Oliver Draht, Silke Busch, Christophe D'Enfert, Christiane Bouchier, Gustavo H. Goldman, Deborah Bell-Pedersen, Sam Griffiths-Jones, Kay Vienken, Arnab Pain, Michael Freitag, Eric U. Selker, David B. Archer, Miguel Á. Peñalva, Berl R. Oakley, Michelle Momany, Toshihiro Tanaka, Toshitaka Kumagai, Kiyoshi Asai, Masayuki Machida, William C. Nierman, David W. Denning, Mark Caddick, Michael Hynes, Mathieu Paoletti, Reinhard Fischer, Bruce Miller, Paul Dyer, Matthew S. Sachs, Stephen A. Osmani, & Bruce Birren

Abstract. The *Aspergilli* comprise a diverse group of filamentous fungi spanning over 200 million years of evolution. We report here the genome sequence of the model organism *Aspergillus nidulans*, and a comparative study with *Aspergillus fumigatus*, a serious human pathogen, and *Aspergillus oryzae*, used in the production of sake, miso and soy sauce. Our analysis of genome structure provides a quantitative evaluation of forces driving long-term eukaryotic genome evolution. It also led to an experimentally validated model of mating-type locus evolution, suggesting the potential for sexual reproduction in *A. fumigatus* and *A. oryzae*. Our analysis of sequence conservation reveals over 5000 non-coding regions actively conserved across all three species. Within these regions, we identified potential functional elements including a previously uncharacterized TPP riboswitch and motifs suggesting regulation in filamentous fungi by PUF family genes. We further obtained comparative and experimental evidence indicating widespread translational regulation by upstream open reading frames. These results enhance our understanding of these widely studied fungi as well as provide new insight into eukaryotic genome evolution and gene regulation.

submitted

**A phytochrome controls development in the filamentous fungus *Aspergillus*
*nidulans***

Anne Blumenstein⁺, Kay Vienken⁺, Ronja Tasler, Daniel Veith, Nicole Frankenberg-Dinkel
and Reinhard Fischer*

⁺ these authors contributed equally to the paper.

Abstract. Phytochromes are photoreceptors that sense red and far-red light through photo-interconversion between two stable conformations. This distinct feature is mediated by a linear tetrapyrrole chromophore. Phytochromes were thought to be confined to photosynthetic organisms including cyanobacteria, but have been recently discovered in heterotrophic bacteria and in fungi, where little is known about their functions. Here we show that the fungal phytochrome, PhsA, from *Aspergillus nidulans* acts as red-light sensor and represses sexual development under red-light conditions. PhsA-GFP was excluded from nuclei, suggesting that red-light perception occurs in the cytoplasm, in contrast to blue-light perception through the nuclear flavoprotein WC-1 in *Neurospora crassa*. PhsA and orthologues from other fungi share chromophore-binding regions, which are phylogenetically closer related to bacteria than to plants, pointing to their evolution from a common bacterial ancestor. In support of that, all fungal phytochromes are multifunctional proteins, where the phytochrome region and histidine kinase domain are combined in a single protein with a C-terminal response regulator domain. This is the first phytochrome experimentally characterized outside the plant and bacterial kingdoms.

submitted

Laccase as a novel, versatile reporter gene for filamentous fungi

Gerd Mander, Huaming Wang, Elizabeth Bodie, Jens Wagner, Kay Vienken, Claudia Vinuesa, Caroline Foster, Abigail C. Leeder, Gethin Allen, Valerie Hamill, Giselle G. Janssen, Nigel Dunn-Coleman, Geoffrey Turner, Bernhard Nüsslein and Reinhard Fischer

Abstract. Laccases are copper-containing enzymes, which oxidize phenolic substrates. Many filamentous fungi harbour several laccase-encoding genes, but their roles are mostly not well understood. Besides *yA*, which is required for pigment biosynthesis in the conidiospores, *A. nidulans* contains five laccase-encoding genes. We expressed three of them, *lccB*, *lccC*, and *lccD* in *A. nidulans* under the control of an inducible promoter (*alcA(p)*) and tested their substrate specificity. Whereas LccC reacts with ABTS (2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolinsulfonat) and DMA/ADBP (3,5-dimethylaniline/4-amino-2,6-dibromophenol), LccD only reacts with the latter compounds. The colour change of the substrates upon oxidation can be easily followed and quantified spectrophotometrically and thus laccases can be used as reporter genes. Because ABTS can be added to agar medium, and because LccC is an exoenzyme, the enzyme can be used for high-throughput screenings in microtitre plates. To obtain an intracellular reporter system for efficient quantification of e.g. promoter activities, we engineered an active protein lacking the secretion signal at the N-terminus. The use of laccase as a versatile reporter was further shown by heterologous expression of a laccase of the ascomycete *Stachybotrys chartarum* in *A. nidulans*.

Curriculum vitae

Kay Vienken
Gutenbergstr. 10
35037 Marburg

06.03.1976 geboren in Düsseldorf, NRW

Familienstand ledig

Schulbildung

09/82 – 06/86 Grundschule Bachschule Detmold

06/86 – 06/95 Gymnasium Leopoldinum Detmold

Wehrdienst/Ersatzdienst

10/95 – 11/96 Zivildienst im Sonderkindergarten Vahlhausen

Studium

10/96 – 04/99 Biologiestudium an der Westfälischen-Willhelms Universität Münster

04/99 – 02/02 Biologiestudium an der Philipps Universität Marburg

05/01 – 02/02 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe PD Dr. R. Fischer; Abteilung Biochemie, Prof. Dr. R.K. Thauer

05/02 – 04/05 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Fischer; Abteilung Biochemie, Prof. Dr. R.K. Thauer

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich zuallererst ganz besonders bei Reinhard Fischer bedanken. Seine sehr gute Betreuung und die sehr angenehme Zusammenarbeit während der Promotion haben meine Arbeit erleichtert.

Ein riesengroßer Dank geht an alle „Fischerlinge“, sowohl die Aktiven, wie auch im ganz besonderen die „Ehemaligen“. **DANKE, DANKE, DANKE!!!!** Die Arbeit in diesem Team hat mir viel Spaß gemacht.

Mindestens ein ebenso großer Dank geht an die sehr wechselhaften Mitbewohner des 2. Stockwerkes. Erst Frankens, dann Nadicom und nun die Jakobsens und Möschs. Nicht zu vergessen die beiden Konstanten von A2, Hanne und Reinhard. Es ist immer ein gutes Gefühl, nette Menschen um sich zu haben.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. R.K. Thauer, der Max-Planck-Gesellschaft und dem Sonderforschungsbereich 395, durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde.

Bei den Nadicömlern möchte ich mich noch mal extra bedanken für die Integration während meiner „Isolationszeit“. Ich freue mich auf gemeinsame Karlsruher Zeiten! Und noch ein extra Dank an Bernhard, meinem offizieller Chef der letzten Monate in Marburg für seine Teilnahme.

Die gemeinsamen Seminare mit der AG Bölker empfand ich immer als sehr hilfreich und angenehm, vielen Dank an Alle!

Meinen Helfern auf dem Weg der Proteine möchte ich auch ganz besonders danken. Julius für viele Ratschläge und aufbauende Worte; Leif und Prof. Völker für die Hilfe und die gute Zusammenarbeit in Greifswald.

Mein größter Dank geht an meine Familie und meine Freundin Steffi, auf deren Unterstützung und Verständnis in sämtlicher Hinsicht und in allen Bereichen ich mich immer verlassen konnte. Und ohne Steffi wäre ich entweder verhungert oder wahnsinnig geworden.

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorliegende Dissertation

Die Rolle zweier $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ binukleärer Clusterproteine in der sexuellen Entwicklung von *Aspergillus nidulans*

in Bibliotheken allgemein zugänglich gemacht wird. Dazu gehört, dass sie

- von der Bibliothek der Einrichtung, in der ich meine Arbeit angefertigt habe, zur Benutzung in ihren Räumen bereit gehalten wird;
- in konventionellen und maschinenlesbaren Katalogen, Verzeichnissen und Datenbanken verzeichnet wird;
- der Universitätsbibliothek für die lokale Nutzung und für Fernausleihezwecke zur Verfügung steht;
- im Rahmen der urheberrechtlichen Bestimmungen für Kopierzwecke genutzt werden kann.

Marburg, den

Unterschrift des Autors

Unterschrift des betreuenden Hochschullehrers

