

Christian Albrechts-Universität zu Kiel
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Botanisches Institut
Abteilung für Botanische Genetik und Molekularbiologie

Diplomarbeit

Funktionsanalyse des *bem46*-Homologs bei
Neurospora crassa

Moritz Mercker

Kiel, 2006

Referent: Prof. Dr. F. Kempken

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Kempken danke ich herzlich für die interessante und vielseitige Themenstellung. Besonders bedanken möchte ich mich für die stetige Unterstützung und die vielen wissenschaftlichen Ratschläge beim Fortgang dieser Arbeit. Die Zeit der Diplomarbeit war für mich spannend und lehrreich.

Den Mitarbeitern der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie Nancy Weiland, Silke Alves, Ilka Braumann, Nina Bolle und Hanna Schmidt gilt mein besonderer Dank für das angenehme Arbeitsklima und die vielen wertvollen Ratschläge. Insbesondere möchte ich mich bei Silke Alves, Nancy Weiland und Ilka Braumann für ihre Geduld und ihren Beistand beim Verfassen meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für den Rückhalt und die Unterstützung während des gesamten Studiums sowie meiner Freundin für die vielen aufmunternden Worte.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
1. Einleitung	7
1.1 Die Bedeutung der Pilze	7
1.2 Der Modellorganismus <i>Neurospora crassa</i>	8
1.3 Das <i>bem46</i>-Gen und homologe Sequenzen	10
1.4 Die Funktionsanalyse von Genen in filamentösen Pilzen	14
1.4.1 Gen-Inaktivierung und RNA-silencing-Mechanismen	14
1.4.2 Überexpression	16
1.4.3 Intrazelluläre Lokalisation von Proteinen.....	16
1.5 Problemstellung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Organismen und Stämme	19
2.1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	19
2.1.1.2 <i>Neurospora crassa</i>	19
2.1.2 Oligonukleotide.....	19
2.1.3 Plasmide.....	21
2.1.4 Chemikalien.....	23
2.1.5 Radiochemikalie	24
2.1.6 Farbstoffe	24
2.1.7 Membranen und Filterpapiere	24
2.1.8 Kits	24
2.1.9 Enzyme	24
2.1.10 Lösungen und Puffer	24
2.1.11 Kulturmedien	25
2.1.11.1 Kulturmedien für <i>Escherichia coli</i>	25
2.1.11.2 Kulturmedien für <i>Neurospora crassa</i>	26
2.2 Methoden	29
2.2.1 Anzucht- und Kulturbedingungen.....	29
2.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.1.2 <i>Neurospora crassa</i>	29
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.2.1 Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	30

2.2.2.2 Transformation.....	31
2.2.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren.....	32
2.2.2.4 Hydrolyse von DNA.....	33
2.2.2.5 Ligation.....	33
2.2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.2.2.7 Gelelektrophorese.....	35
2.2.2.8 Reinigung und Gelelution von DNA.....	35
2.2.2.9 Blotten von Nukleinsäuren.....	36
2.2.2.10 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren.....	36
2.2.2.11 Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäure-Blots.....	36
2.2.3 Mikroskopie und Färbemethoden.....	37
2.2.3.1 Lichtmikroskopie.....	37
2.2.3.2 Konfokale Mikroskopie und Fluoreszenzfärbungen.....	37
2.2.4 Phänotypische Analyse von <i>Neurospora crassa</i>	38
2.2.4.1 Vegetatives Myzel.....	38
2.2.4.2 Wachstumsgeschwindigkeit des vegetativen Myzels.....	38
2.2.4.3 Ascosporenentwicklung.....	38
2.2.4.4 Ascosporenkeimung und Morphologie ausgekeimter Ascosporen.....	38
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Erstellung von <i>bem46</i>-RNAi-Transformanten.....	39
3.1.1 Klonierung eines <i>bem46</i> -RNAi-Konstruktes.....	39
3.1.2 Transformation und molekulare Charakterisierung.....	42
3.1.3 Charakterisierung der RNAi-Transformanten auf RNA-Ebene.....	44
3.2 Erstellung von <i>bem46</i>-Überexpressions-Tranformanten.....	47
3.2.1 Klonierung eines Überexpressions-Vektors.....	47
3.2.2 Transformation und molekulare Charakterisierung.....	49
3.2.3 Transkriptanalyse der <i>bem46</i> -Überexpressions-Tranformanten.....	51
3.3 Phänotypische Analyse und vergleichende Studien von Wildtyp, <i>bem46</i>-RNAi- und <i>bem46</i>-Überexpressions-Tranformanten.....	53
3.3.1 Morphologie des vegetatives Myzels.....	53
3.3.3 Wachstumsgeschwindigkeit des vegetativen Myzels.....	54
3.3.3 Ascosporenentwicklung.....	55
3.3.4 Ascosporenkeimung.....	56
3.3.5 Morphologie ausgekeimter Ascosporen.....	59

3.4 BEM46::eGFP-Fusion und Lokalisation	60
3.4.1 Klonierung eines <i>bem46::egfp</i> -Fusionskonstruktes.....	60
3.4.2 Transformation und molekulare Charakterisierung.....	62
3.4.3 Lokalisation und Detektion des rekombinanten eGFP.....	63
3.4.3.1 Lokalisation von eGFP in Makrokonidien	63
3.4.3.2 Lokalisation von eGFP in frühen Keimungsstadien der Makrokonidien	65
3.4.3.3 Lokalisation im vegetativen Myzel.....	66
3.4.3.4 Lokalisation von eGFP in Ascosporen.....	67
4. Diskussion	68
4.1 Änderung des <i>bem46</i>-Expressionsniveaus in <i>Neurospora crassa</i>	68
4.1.1 Destabilisierung des <i>bem46</i> -Transkripts	69
4.1.2 Überexpression des <i>bem46</i> -Gens	71
4.2 Die Expression von <i>egfp</i>-Fusionskonstrukten in <i>Neurospora crassa</i>	72
4.2.1 Die Expression mittels nativem Promotor und die Überexpression von <i>bem46::egfp</i>	73
4.2.2 BEM46::eGFP ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert	74
4.3 Die Funktion von Proteinen des Endoplasmatischen Retikulums (ER)	77
4.4 Übernimmt BEM46 aus <i>N. crassa</i> eine Funktion in der Ascosporenceimung und frühen Hyphenentwicklung?	80
4.5 Ausblick	85
5. Zusammenfassung	87
6. Literaturverzeichnis	89
7. Anhang	104
Erklärung	119

Abkürzungen

A	Adenin
<i>acu-5</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "acetyl coenzyme A synthetase ")
<i>amp</i>	Ampicillin
<i>arg-2</i>	Gen der Arginin-Biosynthese
AS	Aminosäure
<i>atp-1</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: " ATPase-1")
<i>bem1</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "bud emergence 1")
<i>bem46</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "bud emergence 46")
bp	Basenpaare
<i>bud5</i>	In die Knospung von Hefen involviertes Gen (engl.: "bud emergence 5")
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
<i>ccg1</i>	Glucose-reprimierbares Gen (engl.: "clock controlled gene")
<i>cdc24</i>	Gen für ein G-Protein der Hefe
cDNA	komplementäre DNA (engl.: "copy DNA")
<i>cfp</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "cellular filament polypeptide")
<i>col</i>	Bezeichnung einer funktionellen Genfamilie (engl.: "colonial")
<i>cpc-1</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "cross pathway control-1")
<i>cyb-3</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "cytochrome b-1")
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2´-Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat

Abkürzungen

dsRNA	doppelsträngige RNA
eGFP	verstärkt fluoreszierendes GFP (engl.: "enhanced GFP")
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>esr</i>	Bezeichnung einer funktionellen Genfamilie (engl.: "enhanced spermidin requirement")
FGSC	Fungal Genetics Stock Center
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: "Green Fluorescent Protein")
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HDEL	Aminosäuresequenz: Histidin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin
<i>his-3</i>	Gen der Histidin-Biosynthese
<i>ipa</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "it pokes along")
kb	bzgl. DNA: Kilobasenpaare; bzgl. RNA: Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDEL	Aminosäuresequenz: Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin
<i>le-1</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "lethal-1")
<i>lgd</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "laggard")
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: "messenger RNA")
NcT	<i>Neurospora crassa</i> Transformante
nt	Nukleotide
ORF	offener Leserahmen (engl.: "open reading frame")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: "polymerase chain reaction")

Abkürzungen

Prom.	Promotor
<i>qde-2</i>	Gen für eine mutmaßliche Komponente des RISC
<i>rhy-1</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "rhythm-1")
RIP	Gen-Inaktivierungs-Mechanismus (engl.: "Repeat-induced point mutation")
RISC	Proteinkomplex (engl.: "RNA-Induced-Silencing-Complex")
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz (engl.: "RNA-interference")
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: "rounds per minute")
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	PCR unter Verwendung des Enzyms "Reverse Transkriptase"
S	Svedberg-Einheit, Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	In Gen-Unterdrückung involviertes dsRNA-Molekül (engl.: "small interfering RNA")
T	Thymin
Term.	Terminator
<i>toxA</i>	Bezeichnung eines Gens (engl.: "toxin A")
U	Spezifische Enzymaktivität (1 μ mol Substratumsatz / Minute)
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
λ	Lambda-Phage

Allgemein gebräuchliche Maßeinheiten und Abkürzungen sind nicht gesondert aufgeführt.

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Pilze

Das Reich der Pilze umfasst eine große Gruppe eukaryotischer Organismen mit mehr als einer Million geschätzten Spezies, von denen rund 100.000 bekannt sind (Nakayashiki, 2005). Die meisten davon sind den filamentösen Pilzen zuzuordnen (Hawksworth *et al.*, 2001). Es finden sich aber auch einzellige Lebensformen darunter, wie die Hefen (Foster *et al.*, 2004). Der Einfluss von Pilzen auf die Ökosysteme ist enorm, da sie eine wichtige Rolle als primäre Zersetzer und in der Wiederverwertung von Nährstoffen einnehmen (Borkovich *et al.*, 2004).

Für den Menschen haben die Pilze unterschiedliche Bedeutungen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Produktion von fermentierten Nahrungs- und Genussmitteln, wie z.B. Wein und Brot (Nakayashiki, 2005), in der industriellen Produktion von Sekundärmetaboliten, Enzymen und Antikörpern (Papagianni 1995; Bergquist *et al.*, 2002; Joosten *et al.*, 2003) oder als Schädlinge und Pathogene, die durch parasitische Lebenszyklen der Grund zahlreicher Krankheiten bei Menschen, Tieren und vor allem bei Pflanzen sind (Latge, 1999; Agrios, 1997).

Einige Pilze sind bedeutende Modellorganismen für genetische Forschungen, da ihre zellulären Strukturen, Stoffwechsel-Mechanismen und ihre Gen-Organisation viele Ähnlichkeiten mit denen anderer höherer Eukaryoten aufweisen (Nakayashiki, 2005). In Kombination mit einfacher und kostengünstiger Handhabung und Haltung im Labor machte dies sie schon früh für die Verwendung als Modellorganismen attraktiv (Taylor *et al.*, 1993). So stellen heute die einzellige Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die filamentösen Schimmelpilze *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* intensiv studierte Modellorganismen aus dem Reich der Pilze dar (Davis, 2003).

1.2 Der Modellorganismus *Neurospora crassa*

Der Modellorganismus *Neurospora crassa* stammt aus der Abteilung der Schlauchpilze, den Ascomycota (Perkins und Turner, 1988). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Produkte der Meiose im Inneren eines Schlauches, dem Ascus, gebildet werden (Raju, 1980).

Das vegetative Erscheinungsbild von *N. crassa* besteht aus filamentösen Hyphen, die sich in regelmäßigen Abständen verzweigen (Trinci *et al.*, 1977; vgl. Abbildung 1 B). Das Wachstum der Hyphen beschränkt sich auf die Spitzenregion (Trinci, 1984). Konstitutiv exprimierte Karotinoidpigmente in den asexuell gebildeten Sporen sind verantwortlich für eine orange-rote Färbung (De Fabo *et al.*, 1976; siehe Abbildung 1 A), die dem Pilz den Namen „Orange-Roter Brotschimmel“ verdankt.



Abbildung 1: *Neurospora crassa*

A: Myzel und Konidienbildung des Wildtyps (WT) auf Nährmedium in einer Petrischale

B: Sich verzweigende vegetative Hyphe des WT

C: Elektronenmikroskopische Aufnahme von asexuell gebildeten Sporen, den Konidien.

Fotos: „A“, „B“: diese Arbeit, „C“: M. Springer (FGSC-Homepage, <http://www.fgsc.net/Neurospora/sectionB3.htm>).

N. crassa kommt natürlicherweise vor allem in den tropischen und subtropischen Regionen und vorwiegend auf verwesendem Pflanzenmaterial vor (Turner und Perkins, 2001). Sein Lebenszyklus ist in Abbildung 2 dargestellt und zeigt, dass *N. crassa* zwei Möglichkeiten der asexuellen Sporulation besitzt: die Bildung von mehrkernigen Makrokonidien (Springer *et al.*, 1989) und die der einkernigen Mikrokonidien (Maheswari, 1999). Ferner besitzt der Pilz die Möglichkeit, in den sexuellen Zyklus einzutreten (zitiert in Nelson, 1996). Voraussetzung für die sexuelle Reproduktion ist das Aufeinandertreffen der beiden Paarungstypen, die

mit „A“ und „a“ bezeichnet werden (Glass *et al.*, 1988). Der Eintritt in den sexuellen Zyklus beginnt mit der Bildung von Vorfruchtkörpern, den Protoperithezien. Aus diesen entwickeln sich nach einer Fertilisation spitze Fruchtkörper, die Perithezien, in deren Innerem die sexuell gebildeten Ascosporen reifen. Je acht Ascosporen befinden sich dabei in einem Keimschlauch, dem Ascus, und stellen das Produkt einer Meiose mit darauffolgender Mitose dar (Mishra, 1977). Die Makrokonidien und Hyphen von *N. crassa* sind vielkernig (Seiler, 1997). Die reifen Ascosporen, das vegetative Myzel und die asexuell gebildeten

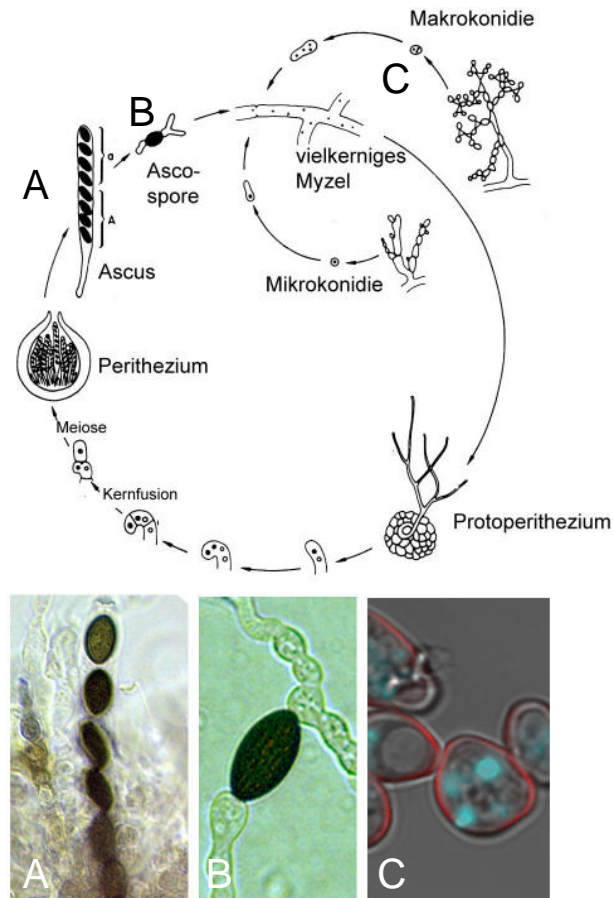


Abbildung 2: Lebeszyklus von *Neurospora crassa*

Abhängig von den äußeren Bedingungen kann das vegetative Myzel zwei Arten der asexuellen Sporulation vollführen und entweder die mehrkernigen Makrokonidien oder die einkernigen Mikrokonidien produzieren. Über Bildung von Vorfruchtkörpern, den Protoperithezien, kann nach einer Fertilisation in den sexuellen Zyklus eingetreten werden. In diesem reifen die Ascosporen als Produkte der Meiose in Fruchtkörpern, den Perithezien. Je acht Ascosporen befinden sich dabei in einem Keimschlauch, dem Ascus.

Lebenszyklus: FGSC-Homepage, <http://www.fgsc.net/Neurospora/sectionB2.htm>; Fotos: Diese Arbeit. A: Ascus, B: Ausgekeimte Ascospore, C: Makrokonidien mit angefärbter Plasmamembran (rot) und Zellkernen (cyan).

Konidien sind haploid (Dörfelt, 1989). Die haploide Lebensform von *N. crassa* begünstigte genetische Studien an diesem Organismus, deren Basis die Erkennung und Isolierung von Mutanten war (Davis und Perkins, 2002). So wurden von Tatum und Beadle durch Arbeiten mit *N. crassa*-Mutanten erste Zusammenhänge zwischen Genen und fundamentalen Lebensprozessen beschrieben, für die sie 1958 den Nobelpreis erhielten (Beadle und Tatum, 1941). Mittlerweile umfasst die Bandbreite des biologischen Wissens über *Neurospora crassa* diverse Fachgebiete der Biologie, von molekularen Wissenschaften bis hin zu Populationsstudien (Borkovich *et al.*, 2004). Über ein zunehmendes Verständnis von *Neurospora crassa* erhofft man sich auch weitere Erkenntnisse über andere Pilzspezies, wie z.B. pathogene Arten (Davis *et al.*, 2002).

Im Jahre 2003 wurde das etwa 43 Megabasen große und rund 10.000 Gene umfassende Genom von *N. crassa* als sequenziert veröffentlicht (Galagan *et al.*, 2003). Dies war die erste vollständige Sequenzierung des Genoms eines filamentösen Pilzes und es folgten ausführliche Analysen aus dem Bereich der Genomik (Borkovich *et al.*, 2004).

1.3 Das *bem46*-Gen und homologe Sequenzen

Die Veröffentlichung der Genomsequenz von *Neurospora crassa* ergab, dass dieser Organismus ein Homolog des in vielen Organismen stark konservierten *bem46*-Gens trägt (Kempken, persönliche Mitteilung). Zuvor war ein *bem46*-Homolog bei der Suche nach transposablen Elementen in *Ascobolus immersus* (Kempken, 2001) entdeckt worden. In beiden filamentösen Schimmelpilzen gab es keine Hinweise auf die Funktion dieses Gens. Die Verfügbarkeit der vollständigen *bem46*-Sequenz von *Neurospora crassa* machte weiterführende Analysen dieses Gens in diesem Organismus möglich. Seitdem wurden erste Erkenntnisse über *bem46* in *N. crassa* erlangt: Gen-Inaktivierungsstudien zeigten, dass dieses Gen in einem möglichen Zusammenhang mit der Auskeimung der Ascosporen steht (Hentschel, 2002). Eine grafische Übersicht der Sequenz des *bem46*-Homologs von *Neurospora crassa* befindet sich in Abbildung 3. Der offene Leserahmen (ORF) hat eine Länge von 1342 bp und besteht aus 4 Exonen und 3 Intronen. Das davon abgeleitete Protein hat eine Länge von 320 Aminosäuren und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 35 kDa.



Abbildung 3: Das *Neurospora crassa* bem46-Homolog

Das Gen setzt sich aus vier Exonen (E1-E4) und drei Intronen (I1-I3) zusammen.

Bem46-Homologe finden sich konserviert in vielen Organismen. Die entsprechenden Proteine dieser *bem46*-Genfamilie werden in der BEM46-Proteinfamilie zusammengefasst (Mochizuki *et al.*, 2005; siehe Abbildung 5). Diese Proteine besitzen stark konservierte Bereiche des α/β -Hydrolase-Motivs und gehören daher der α/β -Hydrolase-Superfamilie an. Eine schematische Darstellung des α/β -Hydrolase-Motivs ist in Abbildung 4 gezeigt. Die α/β -Hydrolase-Superfamilie umfasst Enzyme mit diversen katalytischen Funktionen und Substraten (Ollis *et al.*, 1992; Holmquist, 2000), so dass ein Rückschluss auf die molekulare Funktion der BEM46-Familie nicht möglich ist. Zu diesem Zeitpunkt ist über die Proteine der BEM46-Familie weder bekannt, ob sie Hydrolase-Aktivität besitzen, noch welches deren Substrate sind (Mochizuki *et al.*, 2005).

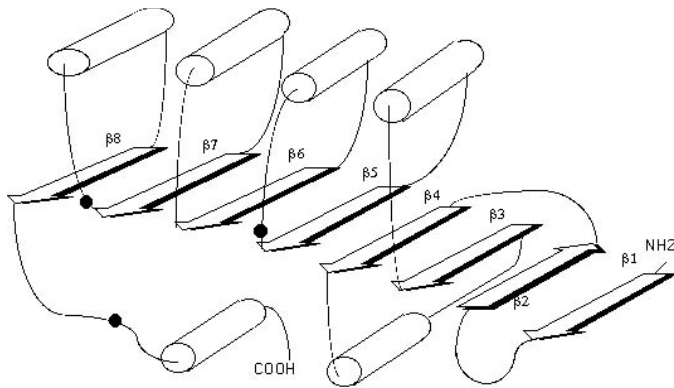


Abbildung 4: Das α/β -Hydrolase-Motiv

Der am stärksten konservierte Bereich des α/β -Hydrolase-Motivs ist eine katalytische Triade aus Aminosäuren, die einen nukleophilen-, einen Histidin- und einen Säurerest tragen (als schwarze Punkte dargestellt). Nach Ollis *et al.*, 1992.

Für einige Mitglieder der BEM46-Familie sind bereits Hinweise darüber bekannt, in welche Funktionen sie involviert sein können. So ist das *bem46*-Gen der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* ein temperatur-sensitiver Suppressor von *bem1/bud5* Doppelmутanten der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (EMBL: SP29892). Diese Mutanten zeigen Defekte in der Zellpolarisation und der gerichteten Knospung (Cabib *et al.*, 1998; Madden *et al.*, 1998). Daraus leitet sich auch der Name „bem“ für „bud emergence“ ab („das Auftreten von Knospen“). Über die genaue molekulare Funktion der BEM46-Proteine in beiden genannten Hefen ist bisher noch nichts bekannt. Hinweise darüber geben aber die Proteine BEM1 und BUD5 aus *Saccharomyces cerevisiae*, deren Verlust BEM46 supprimieren kann. BEM1 ist ein Gerüstprotein mit zwei Proteindomänen, die für Aktin-Interaktionen verantwortlich sind (Chenevert *et al.*, 1992). Neben Aktin interagiert es mit weiteren Molekülen; dazu gehören die G-Proteine BUD1 und CDC24 (Park *et al.*, 1997; Irazoqui *et al.*, 2003) und mehrere vermutliche GDP-GTP-Austauschfaktoren wie z.B. BUD5 (Chant *et al.*, 1991; Cabib *et al.*, 1998). Die *bem1*-Mutanten zeigen Temperatur-sensitive Störungen in der Zellpolarisation (Madden *et al.*, 1998). BUD5 ist wiederum ein GDP-GTP-Austauschfaktor für BEM1 und notwendig für die gerichtete Knospung (Chant *et al.*, 1991). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BEM46 in der Hefe an Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist, die sich möglicherweise auf die Aktinorganisation auswirken.

Neben den beschriebenen Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* gibt es noch weitere Organismen, bei denen es Hinweise auf die Funktion der entsprechenden *bem46*-Homologe gibt. So ergaben Protein-Interaktionsstudien an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dass wahrscheinlich eine Interaktion zwischen BEM46 und dem Protein RAPSINOID stattfindet (Giot *et al.*, 2003). RAPSINOID ist ein putativer GDP-GTP-Austauschfaktor für ein G α -Protein. Er ist an der Kontrolle asymmetrischer Zellteilungen larvaler Neuroblasten beteiligt (Parmentier *et al.*, 2000).

Des Weiteren wurde das BEM46-Protein aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* analysiert. Ausführliche Studien zeigen, dass es sich um ein vorwiegend in der Plasmamembran der Wurzeln lokalisiertes Protein handelt. Dieses fungiert als negativer Regulator für reizinduzierte Wurzelkrümmung, indem es die Wurzelspitzenrotation inhibiert (Mochizuki *et al.*, 2005). Sowohl in *A. thaliana* als auch in *S. pombe* und *S. cerevisiae* scheint es sich bei *bem46* um ein nicht essentielles

Einleitung

Gen zu handeln, da ein Verlust der *bem46*-Aktivität nicht letal ist (Mochizuki *et al.*, 2005; Madden *et al.*, 1998; Giaever *et al.*, 2002).

Ausgehend von den bisherigen Erkenntnissen über die Funktion verschiedener BEM46-Proteine ist anzunehmen, dass Proteine dieser Familie die Morphogenese im Bereich der Zelloberfläche beeinflussen (Mochizuki *et al.*, 2005). Dabei scheinen GDP-GTP-Austauschfaktoren und die Aktin-Organisation eine wichtige Rolle zu spielen. Wie der Übersicht in Abbildung 5 zu entnehmen ist, basieren diese Annahmen über die Funktion der BEM46-Familie auf der Analyse weniger *bem46*-Homologe. In keinem filamentösen Pilz wurde bisher die Funktion eines *bem46*-Homologs aufgeklärt (Kempken, persönliche Mitteilung).



Abbildung 5: Verschiedene Mitglieder der BEM46-Familie

Jedes BEM46-Protein ist relativ zu seiner molekularen Größe als Balken dargestellt. Die Vorhersage der subzellulären Lokalisation erfolgte mit Hilfe des Programms „WoLF PSORT“. Graue Balken zeigen mögliche Transmembrandomänen mit berechneter Wahrscheinlichkeit, grüne Balken zeigen konservierte Bereiche des α/β -Hydrolase-Motivs. Die Prozentangabe bezieht sich auf die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit dem *N. crassa*-BEM46-Protein. Rot umlegt sind diejenigen Proteine, für die Hinweise auf deren genaue Funktion vorliegen. Die Grafik wurde in Anlehnung an Mochizuki *et al.* (2005) mit Hilfe von Sequenzen aus der UniProt-Datenbank erstellt.

1.4 Die Funktionsanalyse von Genen in filamentösen Pilzen

Für die Funktionsanalyse von Genen in filamentösen Pilzen wurden bisher eine große Anzahl an Transformations- und Genmanipulationsstrategien entwickelt und für verschiedene Spezies erfolgreich angewandt (Weld *et al.*, 2006). Im Folgenden werden einige gebräuchliche Strategien im besonderen Hinblick auf die Anwendung auf *Neurospora crassa* beschrieben.

1.4.1 Gen-Inaktivierung und RNA-silencing-Mechanismen

Eine gängige Methode zur Funktionsanalyse eines Gens ist, die Expressionsstärke dieses Gens zu vermindern und dann die Auswirkungen auf den Organismus zu studieren (Bruce *et al.*, 2002). Um die Expression eines bestimmten Gens vollständig zu unterdrücken, wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden erfolgreich bei Pilzen angewandt (Davidson *et al.*, 2000; Hamer *et al.*, 2001). Ein Beispiel ist die Zerstörung eines Gens durch homologe Rekombination (Bird *et al.*, 1997). Ein Nachteil dieser Methoden besteht jedoch in der oft sehr geringen Effizienz (Weld *et al.*, 2006). Auch die Analyse essentieller Gene ist mit Hilfe dieser Techniken nur begrenzt möglich (Barbato *et al.*, 1996). Aus diesen Gründen wurden Methoden entwickelt, die auf RNA-Ebene eine kontrollierte Verminderung der Expression bewirken (Mouyna *et al.*, 2004). Als Basis dienen hierfür die in vielen Eukaryoten stark konservierten RNA-silencing-Mechanismen (Nakayashiki, 2005). Darunter versteht man Mechanismen, bei denen kleine RNA-Moleküle die Repression homologer Sequenzen bewirken (Almeida *et al.*, 2005). So wurde zum Beispiel im Jahre 1992 das sog. „Quelling“ als Gen-Inaktivierungsphänomen in *Neurospora crassa* beschrieben (Romano *et al.*, 1992). Später wurde gezeigt, dass beim „Quelling“ kleine RNA-Moleküle bei der Repression der Zielsequenz eine wichtige Rolle spielen (Catalanotto *et al.*, 2002). Diese RNA-silencing-Mechanismen scheinen im Zusammenhang mit der Genregulation, dem Schutz gegen die Vermehrung transponierbarer Elemente und Viren und der Modifizierung der Chromatin-Struktur zu stehen (Almeida *et al.*, 2005). Von besonderem Interesse sind diese Mechanismen bei der sequenzspezifischen Unterdrückung der Genexpression. Nachdem erstmals in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* gezeigt wurde, dass mit Hilfe doppelsträngiger RNA gezielt die Expression eines Gens unterdrückt werden kann (Fire *et al.*, 1998), wurde diese Methode mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi)-Vektoren etabliert. RNAi-Vektoren verfügen über Exon-Sequenzen des Zielgens in invers repetitiver Anordnung. So kann das von diesen Vektoren abgelesene Transkript

eine doppelsträngige Form annehmen, indem es sich zu einer Stammschlaufenstruktur faltet (Hannon, 2002; vgl. Abbildung 6). Es wurde gezeigt, dass die Effektivität durch ein spleißbares Intron in der Schlaufenregion noch gesteigert werden kann (Smith *et al.*, 2000). In den letzten Jahren wurde die RNAi-Methode bei filamentösen Pilzen erfolgreich eingesetzt (Goldoni *et al.*, 2004; Fitzgerald *et al.*, 2004; McDonald *et al.*, 2005; Takeno *et al.*, 2005).

Viele Schritte und beteiligte Enzyme der RNA-silencing-Mechanismen höherer Eukaryoten sind mittlerweile gut charakterisiert (Meister *et al.*, 2004). In *Neurospora crassa* gibt es ebenfalls Hinweise auf beteiligte Proteine und diesbezügliche Modellvorstellungen (Nakayashiki, 2005), die in vereinfachter Form in Abbildung 6 dargestellt sind. Demzufolge wird die dsRNA von dem Protein Bcl-2 in kleine Fragmente zerlegt, die „small interfering RNAs“ (siRNAs) (Catalanotto *et al.*, 2004). Diese siRNAs vermitteln den Abbau der verwandten mRNA, indem sie von dem „RNA-Induced-Silencing-Complex“ (RISC) inkorporiert werden, zu dessen Komponenten vermutlich das Protein Qde-2 gehört (Lee *et al.*, 2003).

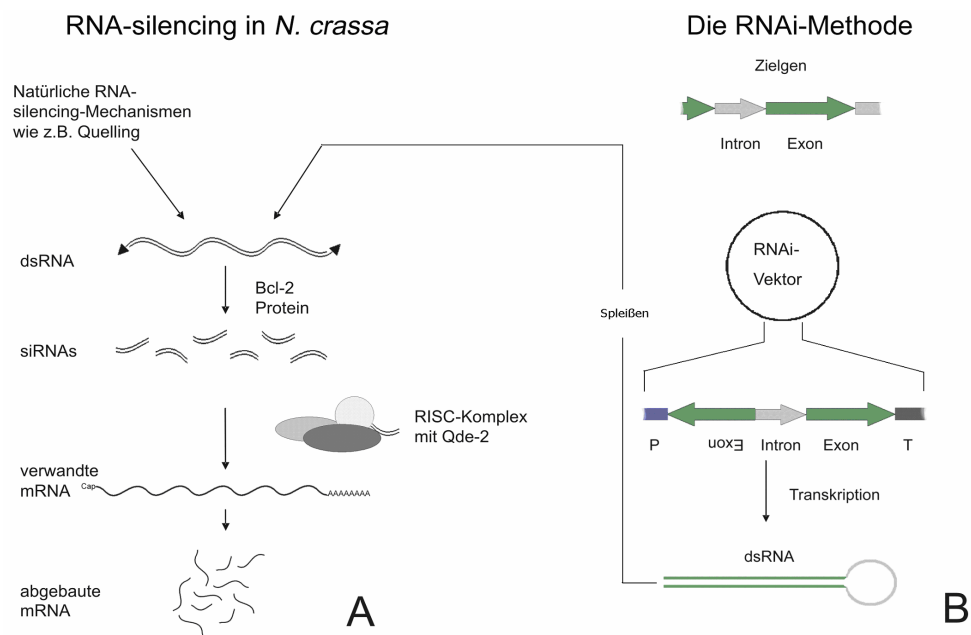


Abbildung 6: Modellvorstellung des RNA-silencing-Mechanismus bei *Neurospora crassa* und die RNAi-Methode

A: Nach der Bildung der doppelsträngigen RNA (dsRNA) durch natürliche Mechanismen wie Quelling oder dem gezielten Einsatz eines RNAi-Konstrukts wird die dsRNA durch das Protein Bcl-2 in kleine Fragmente, die siRNAs, zerlegt. Diese sorgen nach Inkorporation in einen RNA-Induced-Silencing-Complex (RISC) für einen Abbau von verwandter mRNA. Vereinfacht nach Nakayashiki, 2005. **B:** Schematische Darstellung der RNAi-Methode. P = Promotor, T = Terminator; In Anlehnung an Smith *et al.*, 2000.

1.4.2 Überexpression

Die Überexpression von Genen bietet eine weitere Möglichkeit, Informationen über die Funktion von Genen zu erlangen, bei denen eine Verminderung oder Unterbindung der Expression keine oder nur unzureichende Informationen liefert (Staudt *et al.*, 2005).

Um das Expressionsniveau eines bestimmten Gens zu erhöhen, bedient man sich in der Regel sogenannter Überexpressions-Vektoren, die das entsprechende Gen unter der Kontrolle eines starken Promotors tragen (Nelson *et al.*, 2001). Als starke Promotoren sind solche definiert, die eine hohe Transkriptionsgeschwindigkeit bewirken (Brown, 1996). Integrationen von Überexpressions-Vektoren in das Genom eines Wirtes führen zu einer deutlich erhöhten Transkription des entsprechenden Gens. Diese Methode wurde in verschiedenen Organismen wie auch in filamentösen Pilzen erfolgreich angewandt (Rørth *et al.*, 1998; Juvvadi *et al.*, 2003; Hisada *et al.*, 2005; Rocha-Ramirez *et al.*, 2002).

1.4.3 Intrazelluläre Lokalisation von Proteinen

Die intrazelluläre Lokalisation spielt eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung eines Genproduktes (Ding *et al.*, 2000). Diese Lokalisation kann über die Verwendung von Reporter genen erfolgen (Miller *et al.*, 2000). Als Reporter gene bezeichnet man Markergene, deren Genprodukte leicht durch einfache biochemische, histochemische, mikroskopische oder photometrische Methoden nachweisbar sind (Kempken *et al.*, 2004). Beispiele für häufig genutzte Reporter gene sind die Gene der β -Glucuronidase (Jefferson *et al.*, 1987), der Luziferase (Gallie *et al.*, 1989) und das des grün fluoreszierende Proteins GFP („Green Fluorescent Protein“) (Chalfie, 1994). Ein Vorteil des GFPs gegenüber den Genprodukten der anderen Reporter gene besteht darin, dass es in lebenden Zellen mikroskopisch nachgewiesen werden kann und außer UV-Licht keine weiteren extrinsischen Faktoren benötigt (Fernández-Ábalos, 1998). Ursprünglich stammt GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* und wurde im Jahre 1994 erstmals heterolog in anderen Organismen exprimiert (Chalfie, 1994). Seitdem wurde GFP für Studien an diversen Prozessen in unterschiedlichen Lebewesen angepasst (Tsien, 1998; Zimmer, 2002) und auch in verschiedenen Pilz-Spezies verwendet (Lorang *et al.*, 2001). Bei der Expression in *Neurospora crassa* bewährte sich der Gebrauch eines GFP-Derivats, des „enhanced GFP“ (eGFP) (Freitag *et al.*, 2001; Freitag *et al.*, 2004). Dieses eGFP besitzt gegenüber dem GFP eine Aminosäuresubstitution, die in einer verstärkten Fluoreszenz resultiert, sowie einen GC-reicheren

Kodongebrauch (Heim *et al.*, 1995; Borkovich *et al.*, 2004). Um ein Protein mit Hilfe von GFP zu lokalisieren, wird das entsprechende Gen mit der *gfp*-Sequenz fusioniert (Chalfie, 1994; siehe Abbildung 7). Dadurch können fluoreszierende Fusionsproteine gebildet werden, die mit Hilfe mikroskopischer Studien Rückschlüsse auf die subzelluläre Lokalisation des untersuchten Proteins erlauben (Ding *et al.*, 2000).



Abbildung 7: Beispielhafter Aufbau eines *gfp*-Fusionskonstruktes (nach Chalfie, 1994)

1.5 Problemstellung

In den letzten 60 Jahren leisteten Forschungen an dem Modellorganismus *Neurospora crassa* einen großen Beitrag zum Verständnis vieler biologischer Prozesse höherer Eukaryoten (Davis *et al.*, 2002). Die Funktionsanalyse von Genen liefert dabei einen wichtigen Beitrag, weitere Erkenntnisse über Prozesse wie die Genexpression in *Neurospora* zu erlangen (Perkins, persönliche Mitteilung). Da es sich bei *N. crassa* um einen biologisch relativ wenig spezialisierten Pilz handelt (Davis *et al.*, 2002), erhofft man sich über Forschungen an *N. crassa* auch Einblicke in biologische Funktionsweisen anderer Pilze (Braun *et al.*, 2004).

Auf der Suche nach transponierbaren Elementen wurde ein Mitglied der *bem46*-Genfamilie in dem filamentösen Schimmelpilz *Ascobolus immersus* entdeckt (Kempken, persönliche Mitteilung). Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, finden sich in Lebewesen aus allen Reichen konservierte Vertreter dieser Genfamilie. In den meisten Fällen ist über die Funktion dieser Gene nichts oder nur wenig bekannt, so auch in *Neurospora crassa*. Die Veröffentlichung der Genomsequenz von *N. crassa* stellte die vollständige *bem46*-Sequenz zur Verfügung und machte weitere Analysen an diesem Gen möglich. Bisher weisen Gen-Inaktivierungsstudien an Ascosporen darauf hin, dass *bem46* in *N. crassa* eine Funktion in der Sporenkeimung übernimmt oder ein essentielles Gen ist (Hentschel, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion und die subzelluläre Lokalisation von BEM46 in *Neurospora crassa* zu untersuchen. Um Hinweise auf die Funktion von BEM46 zu erlangen, war es vorgesehen, Transformanten mit einer gegenüber dem Wildtyp veränderten *bem46*-Expressionsstärke zu erstellen. Die Verminde-

Die Erhöhung der Expression sollte mit Hilfe eines RNAi-Konstruktes und die Erhöhung der Expression durch ein Überexpressions-Konstrukt erfolgen (siehe Kapitel 1.4). Dafür waren entsprechende Vektoren zu erstellen und in *N. crassa* zu transformieren. Anschließende Analysen der Transformanten auf RNA-Ebene sollten Aufschluss darüber geben, ob eine veränderte *bem46*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp vorliegt. Anschließend waren vergleichende Studien zwischen den Transformanten und dem Wildtyp vorgesehen, um Rückschlüsse auf die Funktion von *bem46* in *Neurospora crassa* zu ziehen. Die vergleichenden Studien sollten morphologisch ausgerichtet sein, da die bereits charakterisierten Mitglieder der BEM46-Familie Einfluss auf die Morphogenese ihres Organismus ausüben (Mochizuki *et al.*, 2005).

Um Hinweise auf eine subzelluläre Lokalisation des BEM46-Proteins in *Neurospora crassa* zu erlangen, sollten *bem46::egfp*-Fusionskonstrukte erstellt und in *N. crassa* transformiert werden. Mikroskopische Analysen verschiedener Entwicklungsstadien der Transformanten sollten Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation von BEM46 geben.

Die Abbildung 8 fasst die geplante Vorgehensweise dieser Arbeit in einem Fließschema zusammen.

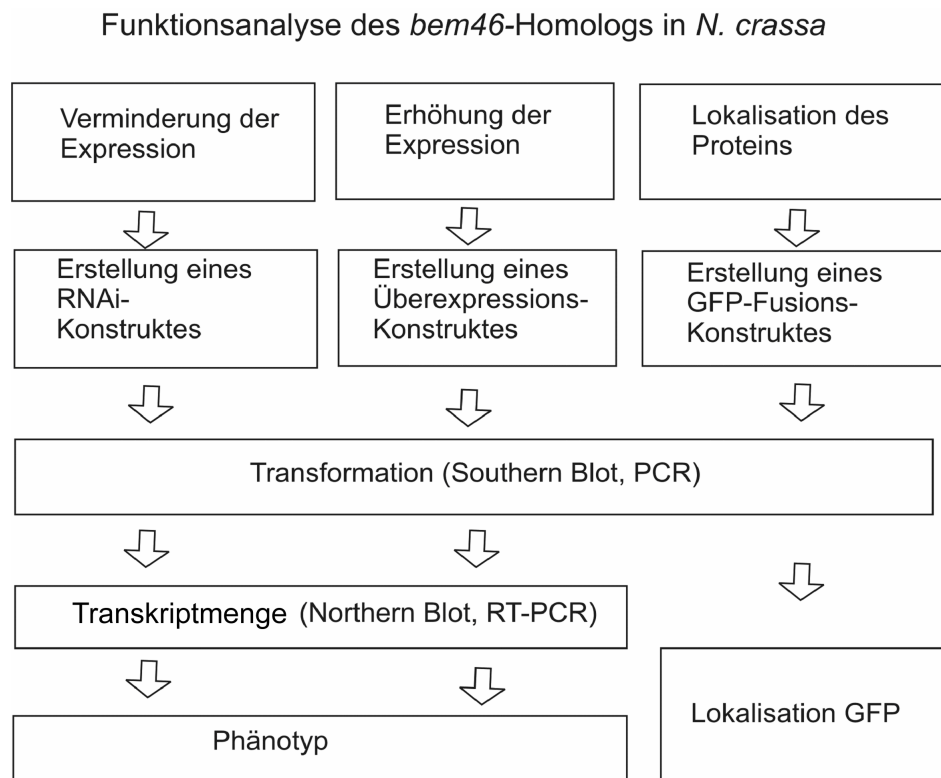


Abbildung 8: Fließschema dieser Arbeit

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen und Stämme

2.1.1.1 *Escherichia coli*

XL1-Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [*F'proAB lac^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]) (Bullock *et al.*, 1987; Stratagene, Heidelberg):

Dieser Stamm diente zur Vermehrung von Plasmid-DNA.

SURE (*e14⁻, (McrA⁻), D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5, (Kan^r), uvrC, [F' proAB lac^fZDM15 Tn10 (Tet^r)*]) (Stratagene, Heidelberg):

Diesem Stamm fehlen Komponenten zur Beseitigung von DNA-Sekundärstrukturen wie Stammschlaufen. Er diente zur Vermehrung von RNAi-Vektoren.

2.1.1.2 *Neurospora crassa*

Stamm FGSC#6103 (*his-3, (Y234M723)*, Paarungstyp A (Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, USA)),

Stamm FGSC#9716 (*his-3, (1-234-723)*, Paarungstyp a (Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, USA)):

Diese Stämme zeigen eine Störung in der Histidin-Biosynthese infolge eines funktionsunfähigen Gens der Histidinol-Dehydrogenase.

2.1.2 Oligonukleotide

Die in Tabelle 1 dargestellten Oligonukleotide wurden für die Amplifikation spezifischer Nukleinsäurefragmente mittels PCR (siehe Kapitel 2.2.2.6) verwendet. Sie wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Die Positionen für *bem46* sind gemäß contig 7.9 des Broad-Institutes angegeben. Zusätzlich eingebrachte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Plasmid/ Position	Gen
FK430	GGGA <u>AAGCTT</u> TTTTCTTTTCGGGGTCTCCTGAG	162188- 162214	<i>bem46</i> ²
FK431	GGGA <u>AAGCTT</u> GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	pMF272 5017-5037	<i>egfp</i> ¹
FK651	<u>GAGGTCCT</u> GTGAGCAAGGGCGAGGAG	pMF272 5017-5034	<i>egfp</i> ¹
FK652	<u>GATTTAAATT</u> ACTTGTACAGCTCGTCCAT	pMF272 5731-5712	<i>egfp</i> ¹
FK701	GGCAAGCATGTCATCTCCATC	163538- 163518	<i>bem46</i> ²
FK702	ATGTTGAGCCCAGATTCGTC	162792- 162811	<i>bem46</i> ²
FK703	GG <u>TTAATTAATT</u> GGACTCCCCTTTGTTGAC	164318- 164299	<i>bem46</i> - Promotor
FK790	GGACGACATGGAGAAGATTTGG	576208- 576187	Aktin ³
FK791	GAGCGGACCTAGCCTATACTGC	575501- 575521	Aktin ³
FK813	<u>GGGATCCG</u> TATGTGGTCCCCAATCTGA	163185- 163166	<i>bem46</i> ²
FK814	<u>GATTTAAATG</u> ATCAAGGTGTCGGTAGCC	162536- 162554	<i>bem46</i> ²
FK815	<u>GGGCGCGCCG</u> ATCAAGGTGTCGGTAGCC	162533- 162554	<i>bem46</i> ²
FK816	<u>GGGATCCAG</u> CCCTAATCTATCCCTCTCA	163115- 163095	<i>bem46</i> ²
FK832	<u>GGGCGCGCC</u> ATGTCATCTCCATCTGTCAC	163532- 163512	<i>bem46</i> ²

Fortführung der Tabelle 1 von Seite 20

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Plasmid/ Position	Gen
FK833	<u>GATTTAAATCTATTTCTTTTCGGGGTCTC</u>	162190- 162209	<i>bem46</i> ²

Angaben zu den Ursprungsplasmiden bzw. Datenbankeinträgen der aufgeführten Gene: ¹ GenBank-Eintrag Nummer: AY598428; Freitag *et al.*, 2004. ² GenBank-Eintrag Nummer XM330711; Galagan *et al.*, 2003. ³ GenBank-Eintrag Nummer U78026; Tinsley *et al.*, 1998.

2.1.3 Plasmide

Die in der Tabelle 2 dargestellten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet bzw. erstellt. Alle Plasmide tragen neben den in der folgenden Tabelle aufgeführten Komponenten zusätzlich ein deletiertes *his-3*-Gen für die Selektion transgener Sporen (Legerton und Yanofsky, 1985; vgl. Kapitel 2.2.2.2).

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten bzw. klonierten Plasmide (vgl. Anhang)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAS365	Derivat des pUC19-Klonierungsvektors (Q-Biogene, Heidelberg) mit <i>acu-5</i> -Promotor ¹ und <i>arg2</i> -Terminator ²	Silke Alves (persönliche Mitteilung)
pAS428	Derivat des pUC19-Klonierungsvektors (Q-Biogene, Heidelberg) mit <i>trpC</i> -Promotor ³ , <i>egfp</i> ⁴ mit Sekretionssignalsequenz und <i>arg2</i> -Terminator ²	Silke Alves (persönliche Mitteilung)
pAS479	Derivat des pUC19-Klonierungsvektors (Q-Biogene, Heidelberg) mit <i>cfp</i> -Promotor ⁵ , boviner <i>RNase A</i> ⁶ und <i>arg2</i> -Terminator ²	Silke Alves (persönliche Mitteilung)
pAS480	Derivat des pUC19-Klonierungsvektors (Q-Biogene, Heidelberg) mit <i>taa</i> -Promotor ⁷ , boviner <i>RNase A</i> und <i>arg2</i> -Terminator ²	Silke Alves (persönliche Mitteilung)
pMF272	Derivat des pUC19-Klonierungsvektors (Q-Biogene, Heidelberg) mit <i>ccg1</i> -Promotor ⁸ und <i>egfp</i> ⁴	Freitag <i>et al.</i> , 2004

Fortführung der Tabelle 2 von Seite 21

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pNW521	Derivat des pUC19-Klonierungsvektors (Q-Biogene, Heidelberg) mit <i>ccg1</i> -Promotor ⁸ , boviner <i>RNase A</i> und <i>arg2</i> -Terminator ²	Nancy Weiland (persönliche Mitteilung)
pBluescript II/SK+	Phagemid, Klonierungsvektor	Short <i>et al.</i> , 1988
pMon	Derivat des pBluescript II/SK+, Klonierungsvektor	Borovkov und Rivkin, 1997
pMM508	Intron+Exon-Sequenzen des <i>bem46</i> -Gens in pMon	diese Arbeit
pMM509	Exon-Sequenz des <i>bem46</i> -Gens in pMon	diese Arbeit
pMM510	<i>bem46</i> -RNAi-Konstrukt: <i>bem46</i> -Sequenz aus pMM508 in Leserichtung stromaufwärts des <i>arg2</i> -Terminators ² - sowie <i>bem46</i> -Sequenz aus pMM509 invers komplementär stromabwärts des <i>acu-5</i> -Promotors ¹ in pAS365.	diese Arbeit
pMM526	<i>bem46</i> -Genfragment mit endogenem Promotor ohne Stopp-Kodon in pBluescript II/SK+	diese Arbeit
pMM527	<i>bem46</i> -ORF in pBluescript II/SK+	diese Arbeit
pMM528	<i>bem46</i> -ORF aus pMM527 in pAS480	diese Arbeit
pMM529	<i>bem46</i> -ORF aus pMM527 in pAS479	diese Arbeit
pMM530	<i>egfp</i> ⁴ ohne Start-Kodon aus pAS428 in pBluescript II/SK+	diese Arbeit
pMM531	<i>bem46::egfp</i> ⁴ Fusionskonstrukt mit <i>bem46</i> -Promotor	diese Arbeit
pMM532	<i>bem46</i> -RNAi-Konstrukt: <i>acu-5</i> -Promotor ¹ aus pMM510 ausgetauscht gegen <i>cfp</i> -Promotor ⁵	diese Arbeit
pMM534	<i>egfp</i> ⁴ ohne Start-Kodon aus pMF272 in pBluescript II/SK+	diese Arbeit
pMM535	<i>bem46</i> -ORF ohne Stopp-Kodon in pBluescript II/SK+	diese Arbeit

Fortführung der Tabelle 2 von Seite 22

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMM536	<i>bem46::egfp</i> ⁴ -Fusionskonstrukt mit <i>ccg1</i> -Promotor ⁸	diese Arbeit

¹Collins *et al.*, 1991

²Orbach *et al.*, 1990

³Mullaney *et al.*, 1985

⁴Fernández-Ábalos *et al.*, 1998

⁵Temporini *et al.*, 2004

⁶Klink *et al.*, 2000

⁷Galagan *et al.*, 2003

⁸McNally *et al.*, 1988

2.1.4 Chemikalien

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen genannt:

Agar-Agar (Roth, Karlsruhe), Agarose (Roth, Karlsruhe), Ammoniumnitrat (Merck, Darmstadt), Ampicillin (Sigma, Steinheim), Biotin (Sigma, Steinheim), Borsäure (Roth, Karlsruhe), Kalziumchlorid (Merck, Darmstadt), Chloroform (Roth, Karlsruhe), Eisenammoniumsulfat (Merck, Darmstadt), Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz („EDTA“) (Roth, Karlsruhe), Essigsäure (Roth, Karlsruhe), Ethanol (Roth, Karlsruhe), Ethidumbromid (Roth, Karlsruhe), Formaldehyd (Roth, Karlsruhe), Formamid (Roth, Karlsruhe), D-Fructose (Roth, Karlsruhe), α -D(+)-Glucose (Roth, Karlsruhe), Glycerin (Roth, Karlsruhe), L-Histidin (Sigma, Steinheim), Isoamylalkohol (Merck, Darmstadt), Isopropanol (Roth, Karlsruhe), Kaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt), Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (Merck, Darmstadt), Kaliumnitrat (Merck, Darmstadt), Kupfersulfat (Merck, Darmstadt), Lithiumchlorid (Merck, Darmstadt), Magnesiumsulfat (Merck, Darmstadt), Mangansulfat (Merck, Darmstadt), MOPS (Roth, Karlsruhe), Natriumacetat (Merck, Darmstadt), Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe), Natriumcitrat (Merck, Darmstadt), Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt), Natriumdodecylsulfat („SDS“) (Merck, Darmstadt), Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt), Natriummolybdat (Merck, Darmstadt), D(+)-Saccharose (Roth, Karlsruhe), Phenol (Roth, Karlsruhe), Salzsäure (Roth, Karlsruhe), Sorbit (Roth, Karlsruhe), L-Sorbose (Roth, Karlsruhe), Tetrazyklin (Sigma, Steinheim), Tris (Roth, Karlsruhe), Tween20 (Roth, Karlsruhe), Zinksulfat (Merck, Darmstadt), Zitronensäure (Merck, Darmstadt)

2.1.5 Radiochemikalie

[α^{32} -P]-dCTP, spezifische Aktivität 3000 Ci/mMol (Hartmann Analytic, Braunschweig)

2.1.6 Farbstoffe

N-(3-Triethylammoniopropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridiniumdibromid („SynaptoRed“) (Sigma-Aldrich, Steinheim), 4',6-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride („DAPI“) (Sigma-Aldrich, Steinheim).

2.1.7 Membranen und Filterpapiere

Nitrocellulose Rundfilter (Millipore, Schwalbach), Transfermembran „GeneScreen Hybridization Transfer Membrane“ (Perkin Elmer, Boston (USA)), Whatman Filterpapier (VWR, Hamburg).

2.1.8 Kits

DECAprime (Ambion, Austin (USA)), OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden), PCR-Kit *Taq*-Polymerase (Eppendorf, Hamburg), NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren), NucleoSpin Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel, Düren).

2.1.9 Enzyme

Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Beverley, (USA); Q-BIOgene, Heidelberg), DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot), T4-DNA-Ligase (Q-BIOgene, Heidelberg), *Taq*-DNA-Polymerase (Eppendorf, Hamburg), Exonuklease-freies Klenow-Fragment (Fermentas, St. Leon-Rot; Ambion, Austin (USA))

2.1.10 Lösungen und Puffer

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit häufig verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt.

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

Material und Methoden

Neutralisierungspuffer	2 M NaCl 1 M Tris pH 5,5
50x Denhardts	1 % (w/v) Rinderserumalbumin 1 % (w/v) Ficoll 400 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon
20x SSPE	3,6 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 20 mM EDTA pH 7,4
10x MOPS	0,2 M MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0
10x TBE	1 M Borsäure 1 M Tris-HCl pH 8,3 20 mM EDTA

2.1.11 Kulturmedien

2.1.11.1 Kulturmedien für *Escherichia coli*

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit für *Escherichia coli* häufig verwendeten Kulturmedien aufgeführt.

LB-Medium + Ampicillin	1 % (w/v) Trypton 0,05 % (w/v) Ampicillin 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,5
------------------------	---

SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	2,5 mM KCl
	10 mM MgSO ₄
	10 M Lactose
	pH 7,5

2.1.11.2 Kulturmedien für *Neurospora crassa*

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit für *Neurospora crassa* verwendeten Kulturmedien aufgeführt. Für die Stämme FGSC#6103 sowie FGSC#9716 wurde zusätzlich Histidin (0,2 g/l) in die Medien gegeben, da eine Störung in dem Gen für die Histidinol-Dehydrogenase die Histidin-Biosynthese verhindert (Ahmed *et al.*, 1964).

Spurenelementlösung [SEL]	5 % (w/v) Zitronensäure
	5 % (w/v) ZnSO ₄ •7H ₂ O
	1 % (w/v) Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ •6H ₂ O
	0,25 % (w/v) CuSO ₄ •5H ₂ O
	0,05 % (w/v) MnSO ₄ •H ₂ O
	0,05 % (w/v) H ₃ BO ₃
	0,05 % (w/v) Na ₂ Mo ₄ •2H ₂ O
	0,2 % (v/v) Chloroform

50x Vogelsstammlösung [50x VSL]	15 % (w/v) Natriumcitrat
	10 % (w/v) NH ₄ NO ₃
	25 % (w/v) KH ₂ PO ₄
	1 % (w/v) MgSO ₄ •7H ₂ O
	0,5 % (v/v) Spurenelementlösung
	0,5 % (w/v) CaCl ₂ •2H ₂ O
	0,0025 % (w/v) Biotin
	0,2 % (v/v) Chloroform

Material und Methoden

Vogelsminimalmedium mit Saccharose [VMM+S]	2 % (v/v) 50x VSL 2 % (w/v) Saccharose für Festmedium zusätzlich 2% (w/v) Agar-Agar
Vogelsminimalmedium mit Glucose [VMM+G]	2 % (v/v) 50x VSL 2 % (w/v) Glucose für Festmedium zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar
Vogelsminimalmedium mit Acetat [VMM+A]	2 % (v/v) 50x VSL 40 mM Natriumacetat für Festmedium zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar
Vogelsminimalmedium mit Glucose und Ethanol [VMM+G+E]	2 % (v/v) 50x VSL 1 % (w/v) Ethanol 1 % (w/v) Glucose für Festmedium zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar
Vogelsminimalmedium mit Saccharose und Ethanol [VMM+S+E]	2 % (v/v) 50x VSL 1 % (w/v) Ethanol 1 % (w/v) Saccharose für Festmedium zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar
Vogelsminimalmedium mit Ethanol [VMM+E]	2 % (v/v) 50x VSL 2 % (w/v) Ethanol für Festmedium zusätzlich 2% (w/v) Agar-Agar
20x SGF-Stammlösung [20x SGF]	20 % (w/v) Sorbose 0,5 % (w/v) Fructose 0,5 % (w/v) Glucose
20x SGE-Stammlösung [20x SGE]	20 % (w/v) Sorbose 0,5 % (w/v) Ethanol 0,5 % (w/v) Glucose

Material und Methoden

Vogelsminimalmedium mit SGF [VMM+SGF]	2 % (v/v) 50x VSL 5 % (v/v) 20x SGF 2 % (w/v) Agar-Agar
Vogelsminimalmedium mit SGE [VMM+SGE]	2 % (v/v) 50x VSL 2 % (w/v) 20x SGE 2 % (w/v) Agar-Agar
Topagar	2 % (v/v) 50x VSL 5 % (v/v) 20x SGF 1 % (w/v) Agarose
4x Westergaard Stammlösung	0,4 % (w/v) KNO_3 0,4 % (w/v) KH_2PO_4 0,41 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04 % (w/v) NaCl 0,04 % (v/v) Spurenelementlösung 0,1 % (v/v) Biotin-Lösung 0,2 % (v/v) Chloroform
Westergaard Kreuzungsmedium [WKM]	25 % (v/v) Westergaard 4x Stammlösung 2 % (w/v) Saccharose pH 6,5

2.2 Methoden

2.2.1 Anzuchs- und Kulturbedingungen

2.2.1.1 *Escherichia coli*

Die Anzucht der Stämme XL1-Blue und SURE für die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte in 2,5 ml LB-Medium mit Zusatz von Ampicillin. Soweit nicht anders angegeben, fand die Anzucht bei 37 °C und 280 rpm im Minitron HT Infors-Schüttler über Nacht statt.

Für die Kolonisierung wurde LB-Festmedium mit Ampicillin (50 mg/l) verwendet. Zur Blau-Weiß-Selektion wurde diesem Festmedium 12,5 mg/l Tetrazyklin, 0,2 mM IPTG sowie 40 mg/l X-Gal zugesetzt.

2.2.1.2 *Neurospora crassa*

Die Konidienbildung der Stämme FGSC #6103 sowie FCSG #9716 erfolgte für 10-21 Tage bei 25 °C und Dauerlicht in 250 ml Erlenmeyerkolben mit VMM+S+Histidin-Festmedium.

Im Folgenden sind die Begriffe „reprimierende Bedingungen“ und „induzierende Bedingungen“ auf die Aktivität des Promotors des im Einzelfall transformierten Konstruktes bezogen. In der Tabelle 3 wird die Aktivität der verwendeten Promotoren in Abhängigkeit zu verschiedenen Kohlenstoffquellen gezeigt.

Tabelle 3: Aktivität verwendeter Promotoren in Abhängigkeit zu verschiedenen Kohlenstoffquellen

Promotor	induziert	reprimiert	Quellenangabe
<i>cfp</i>	Glucose Saccharose	Ethanol Ethanol+Glucose	Temporini <i>et al.</i> , 2004
<i>acu-5</i>	Acetat	Saccharose	Collins <i>et al.</i> , 1991
<i>ccg1</i>	Saccharose Licht	Glucose	McNally <i>et al.</i> , 1988
<i>taa</i>	Saccharose		Silke Alves (persönliche Mitteilung)

Die Selektion putativer Transformanten erfolgte unter reprimierenden Bedingungen auf VMM+SGF- bzw. VMM+SGE-Festmedium für 2-3 Tage bei 25 °C und Dauerlicht. Anschließend wurden die Kolonien für die Konidienbildung unter reprimierenden Bedingungen für mehrere Tage auf VMM+S bzw. VMM+S+E-Schrägagarröhrchen inkubiert.

Die Anzucht für die Nukleinsäureisolierung fand unter reprimierenden Bedingungen in VMM+S bzw. VMM+G+E-Flüssigkulturen bei 25 °C für 2 - 3 Tage unter Schütteln bei 180 rpm statt. Für die RNA-Isolierung schloss sich eine Induktionsphase in VMM+G-Flüssigmedium für 18 Stunden bei 180 rpm an.

Die Anzucht für die Kreuzungen fand unter induzierenden Bedingungen in 100 ml-Erlenmeyerkolben bei 25 °C und Licht statt. Der erste Kreuzungspartner (maternales Elter) wurde auf gefaltetes, mit Westergaard Kreuzungsmedium getränktes Whatmanpapier angeimpft. Nach 5 Tagen wurde der zweite Kreuzungspartner (paternales Elter) überimpft.

Soweit nicht anders angegeben, fand die Anzucht für die Lichtmikroskopie und die phänotypische Analyse von *N. crassa* auf VMM+S, VMM+G bzw. VMM+G+E-Festmedium statt, welches auf Glas-Objektträger aufgebracht war. Das Wachstum erfolgte für 10-18 Stunden bei 25 °C und Licht. Die Anzucht für die Konfokale Mikroskopie wurde nach der „inverted-Agar-Block-Methode“ (Hickey *et al.*, 2002) für 12-18 Stunden bei 25 °C und Licht durchgeführt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben erfolgten die molekularbiologischen Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989).

2.2.2.1 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli* –Zellen

Mit einer Vorkultur des *Escherichia coli*-Stamms XL1-Blue bzw. SURE wurde 1 l LB-Medium (mit 12,5 mg/l Tetrazyklin) 1%ig angeimpft. Es schloss sich eine Inkubation bei 37 °C und 280 rpm bis zu einer Optischen Dichte von 0,5 - 0,6 bei 595 nm an, dem eine Lagerung von 30 Minuten auf Eis folgte. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 4500 rpm (GSA-Zentrifugenröhrchen, Beckmann Coulter Avanti J-20 XP-Zentrifuge) wurde das Präzipitat in 1 l kaltem H₂O resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Nach Aufnahme des Präzipitats in 20 ml kaltem 10 %igem Glycerin folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 5500 rpm (SS34-Zentrifugenröhrchen) und anschließend die Resuspension in 3 ml

10%igem Glycerin. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots von je 40 µl bei – 80 °C gelagert.

2.2.2.2 Transformation

Escherichia coli

Die Elektroporation von *Escherichia coli*-Zellen wurde mit Hilfe des Elektroporationsgerätes Gene Pulser™ der Firma BioRad (München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde 30 Sekunden zusammen mit den Zellen auf Eis inkubiert und anschließend bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm in Küvetten (Gene Pulser Cuvette, BioRad, München; 20 mm Spaltbreite) elektroporiert. Danach wurde 1 ml SOC-Medium hinzugegeben und nach 10 Minuten Inkubation je 40 - 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert.

Neurospora crassa

Die Elektroporation von *Neurospora crassa*-Konidien erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Margolin *et al.* (1997). Hierfür wurden die Konidien von *N. crassa* mit Hilfe von 40 ml 1 M Sorbitol mit 0,1 ml Tween20 im Erlenmeyerkolben abgeschwemmt. Nach steriler Filtration durch Mull wurde die Konidien suspension 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert (Beckmann Coulter Avanti J-20 XP-Zentrifuge) und anschließend in 50 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden die sedimentierten Konidien in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und die Konidienkonzentration mittels Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von $2,5 \cdot 10^9$ Konidien/ml eingestellt. Für den Elektroporationsvorgang wurden je 40 µl der Konidien suspension mit 3 µl dialysierter DNA vermischt und 5 Minuten auf Eis gelagert. Die Elektroporation fand in vorgekühlten 20 mm Elektroporationsküvetten bei einer Spannung von 1,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 600 Ohm statt. Direkt im Anschluss wurde 1 ml 1 M Sorbitol hinzugegeben. Jeweils 200 µl des Transformationsansatzes wurden mit 10 ml 45 °C warmem Top-Agar vermischt und auf je eine VMM+SGF- bzw. VMM+SGE-Platte (vgl. Kapitel 2.2.1.2) gegeben.

2.2.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

DNA-Isolation aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurde mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aus 2,5 ml Flüssigkultur durchgeführt.

DNA-Isolation aus *Neurospora crassa*

Die Isolierung genomischer DNA aus *Neurospora crassa*-Konidien für die PCR-Analyse fand nach Yeadon und Catcheside (1996) statt. Hierfür wurde der Pilz in Schrägagarröhrchen für 5 bis 10 Tage angezogen. Um die Konidien vom Myzel abzulösen, wurden 2 ml 1x TE-Puffer in die Röhrchen gegeben, kräftig geschüttelt und die Suspension anschließend in Sarstedt-Röhrchen überführt. Nach 10-minütigem Erhitzen bei 100 °C schloss sich eine 10-minütige Inkubation auf Eis an. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 13.000 rpm (CS-15R Zentrifuge, Beckmann Coulter) wurden 2-6 µl des Überstandes für eine PCR-Reaktion (siehe Kapitel 2.2.2.6) eingesetzt.

Die Isolierung von genomischer DNA aus *Neurospora crassa*-Myzel erfolgte verändert nach Borges *et al.* (1990). Nach Anzucht des Pilzes (vgl. Kapitel 2.2.1.2) wurde das Myzel aus der Flüssigkultur entnommen, durch zwei Lagen Mull gegossen und anschließend in flüssigem Stickstoff zerrieben. Nach Zugabe von 2,5 ml DNA-Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % SDS) und 2,5 ml Phenol, wurde 15 Minuten bei 4800 rpm zentrifugiert (Allegra 21R-Zentrifuge, Beckmann Coulter). Der Überstand wurde anschließend zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Einer einstündigen Inkubation mit 20 mg/ml boviner RNase A (Sigma, Steinheim) bei 37 °C folgte eine erneute Phenolextraktion. Der Überstand wurde mit 2 Volumen Ethanol absolut und 1/10 Volumen 8 M Ammoniumacetat gemischt und 30 Minuten bei – 80 °C inkubiert. Danach wurde das Präzipitat nach 15-minütiger Zentrifugation mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mittels BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

RNA-Isolation aus *Neurospora crassa*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *Neurospora crassa* erfolgte nach Anzucht des Pilzes in Flüssigkultur (siehe Kapitel 2.2.1.2) und anschließendem Zerreiben

des Myzels unter flüssigem Stickstoff. Nach Zugabe von kochendem RNA-Lysepuffer (0,2 M Borsäure, 30 mM EDTA, 1 % SDS, pH 9,0), sowie 2 ml 60 °C warmem Phenol wurde die Probe 10 Minuten bei 4800 rpm zentrifugiert (GS-15R Zentrifuge, Beckmann) und die Phenolisierung des Überstands mehrfach wiederholt. Anschließend wurde der Überstand mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und erneut zentrifugiert. Der Schritt wurde mit gleicher Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Nach 30minütiger Inkubation bei - 80 °C mit 1/10 Volumen 8 M Ammoniumacetat sowie 2 Volumen Ethanol wurden die Nukleinsäuren gefällt. Nach einer Zentrifugation von 15 Minuten wurde das Präzipitat mit 10 ml 70%igem Ethanol übergossen und erneut 15 Minuten zentrifugiert. Das angetrocknete Präzipitat wurde nach dem Resuspendieren in 5 ml sterilem Wasser durch die Zugabe von 5 ml 4 M Lithiumchlorid über Nacht bei 4 °C gefällt. Es folgte eine erneute 15-minütige Zentrifugation, bevor das Präzipitat mit 10 ml 70 %igem Ethanol gewaschen wurde. Nach Aufnahme des angetrockneten Präzipitats in 100 µl sterilem Wasser wurde die RNA-Konzentration mittels BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.2.4 Hydrolyse von DNA

Für die Hydrolyse von DNA wurde der für die jeweilige Restriktionsendonuklease vom Hersteller empfohlene Puffer benutzt. Die Restriktion von DNA-Mengen <1 µg erfolgte für 2-3 Stunden, die Hydrolyse von DNA-Mengen >1 µg erfolgte über Nacht.

2.2.2.5 Ligation

Für die Ligation von DNA nach Sambrook *et al.* (1989) wurde der für die verwendete Ligase vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet.

2.2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR

Die in dieser Arbeit durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen für den Nachweis und die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden verändert nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Dabei wurden 0,1-1 ng Plasmid-DNA bzw. 60 ng genomische DNA je Reaktionsansatz eingesetzt. Zusätzlich enthielten die Reaktionsansätze die vom Hersteller empfohlenen Mengen an Reaktionspuffer, 5 mM dNTP-Mix (Q-BIOgene, Heidelberg) sowie je 5 pMol/µl der jeweiligen Oligonukle-

otide bei Verwendung der *Taq*-Polymerase, bzw. 10 pMol/ μ l bei Verwendung der *iProof*-Polymerase. Bei einem Endvolumen von 50 μ l wurde je 1 U DNA-Polymerase eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die *Taq*-Polymerase für Nachweisreaktionen angewandt, wohingegen die *iProof*-Polymerase bei der Amplifikation von Fragmenten eingesetzt wurde, die für Klonierungen verwendet wurden.

Die PCR-Reaktion fand im „Mastercycler gradient“ (Eppendorf, Hamburg) oder dem „MiniCycler“ (MJ Research Inc., Hess. Oldendorf) statt. Die genutzten Programme waren wie folgt strukturiert: Bei der Verwendung der *Taq*-Polymerase folgten einer Anfangsdenaturierung (2 Minuten bei 95 °C) 43 Zyklen, die sich jeweils aus Denaturierung (1 Minute bei 95 °C), Hybridisierung (1 Minute bei einer Hybridisierungstemperatur, welche in Abhängigkeit zu den Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotide stand) und Elongation (1 Minute/1000 bp bei 72 °C) zusammensetzten. Bei der Verwendung der *iProof*-Polymerase folgten einer Anfangsdenaturierung (2 Minuten bei 98 °C) 43 Zyklen, die sich jeweils aus Denaturierung (10 Sekunden bei 98 °C), Hybridisierung (1 Minute Hybridisierungstemperatur, welche in Abhängigkeit zu den Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotide stand) und Elongation (0,5 Minuten/1000 bp bei 72 °C) zusammensetzten. In beiden Fällen schlossen sich 5 Minuten Endelongation bei 72 °C an.

OneStep-RT-PCR

Für die in dieser Arbeit durchgeführten RT-Polymerase-Kettenreaktionen zum Nachweis und zur Quantifizierung von RNA-Fragmenten wurde das OneStep-RT-PCR-Kit von Qiagen verwendet (vgl. Kapitel 2.1.8). Hierfür wurde die eingesetzte RNA zuvor 30 Minuten bei 37 °C mit RNase-freier DNaseI-behandelt (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Anschließend wurde die Probe mittels Standard-PCR (s.o.) auf DNA-Kontamination überprüft. Die RNA-Konzentration wurde am BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Für die RT-PCR wurden je Reaktionsansatz 200 ng RNA eingesetzt. Das Endvolumen von 50 μ l enthielt neben der vom Hersteller empfohlenen Menge des OneStep-RT-PCR-Puffers 10 mM dNTP-Mix (Q-BIOgene, Heidelberg), 5 pMol/ μ l der eingesetzten Oligonukleotide, sowie 1 μ l des OneStep RT-PCR Enzymgemisches. Die Amplifikation fand im „Mastercycler gradient“ (Eppendorf, Hamburg) oder dem „MiniCycler“ (MJ Research Inc., Hess. Oldendorf) statt. Die verwendeten Programme waren wie folgt strukturiert: Für die Synthese von cDNA aus RNA wurde für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert, gefolgt von 15 Minuten Denaturierung

bei 95 °C. Anschließend folgten 45 Zyklen, die sich jeweils aus Denaturierung (1 Minute bei 94 °C), Hybridisierung (1 Minute bei einer Hybridisierungstemperatur, welche in Abhängigkeit zu den Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotide stand) und Elongation (1,5 Minuten bei 72 °C) zusammensetzten. Bei semi-quantitativen Analysen wurden dem Reaktionsansatz nach 30, 33 und 36 Zyklen jeweils in der Elongationsphase 5 µl entnommen. Dies wurde durchgeführt, um die optimale Zyklen-Anzahl für einen quantitativen Vergleich herauszufinden. Ein quantitativer Vergleich ist nur möglich, solange noch nicht die Sättigungsphase der Amplifikation erreicht ist (Mülhardt, 2003). Nach Ablauf von 45 Zyklen schloss sich eine Endelongation von 10 Minuten bei 72 °C an.

2.2.2.7 Gelelektrophorese

DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Gelelektrophorese in Abhängigkeit zu ihrer Molekulargröße in 1 - 2%igen (w/v) Agarosegelen in 1x TBE-Puffer. Die Gele wurden mit 0,001 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt, um die DNA nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar zu machen. Als Größenstandard diente mit *Hind*III hydrolysierte λ-DNA (MBBL, Bielefeld) sowie ein 100-5000 bp Größenstandard (MBBL, Bielefeld). Die DNA-Proben wurden mit 15-20 % DNA-Ladepuffer (40 % (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 0,001 % Bromphenolblau) versetzt.

Bei der Gelelektrophorese für Blot-Analysen (vgl. Kapitel 2.2.2.9) wurden 0,5 ng hydrolysierte Plasmid-DNA als Positivkontrolle und 25 µg der zu untersuchenden, hydrolysierten genomischen DNA eingesetzt.

RNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA erfolgte mittels Gelelektrophorese in 1%igen (w/v) Formaldehyd-Agarosegelen in 1x MOPS-Puffer. Die Denaturierung der RNA resultierte aus einer Inkubation mit 12,5 µl Formamid, 4,2 µl Formaldehyd sowie 1,2 µl 10x MOPS-Puffer bei 65 °C für 10 Minuten. Für das Blotting von RNA (vgl. Kapitel 2.2.2.9) wurden 30 µg Gesamt-DNA verwendet.

2.2.2.8 Reinigung und Gelelution von DNA

Die Reinigung von Ligationsansätzen, hydrolysierten DNA und PCR-Amplifikaten erfolgte entweder mit Hilfe des NucleoSpin Extract II-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben oder über eine Filterblattdialyse mit Nitrocellulose

Rundfiltern (Millipore, Schwalbach). Für die Weiterverarbeitung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der entsprechende Bereich aus dem Gel herausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA anschließend mit Hilfe des NucleoSpin Extract II-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.2.2.9 Blotten von Nukleinsäuren

Vor dem Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Perkin Elmer, Boston) nach Southern (1975) wurden die DNA-Gele 45 Minuten in Denaturierungspuffer denaturiert. Es folgte eine 45-minütige Neutralisierung in Neutralisierungspuffer. RNA wurde direkt nach der Gelelektrophorese transferiert.

Eine kovalente Bindung der Nukleinsäuren an die Membran fand durch UV-Quervernetzung mit Hilfe des „UV-Stratalinkers“ (Stratagene, Heidelberg) statt.

2.2.2.10 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Als Matritze für das Erstellen radioaktiv markierter Sonden zum Nachweis spezifischer Nukleinsäurefragmente dienten entweder PCR-Fragmente oder durch Hydrolyse von Plasmiden erhaltene DNA-Fragmente. Mit Hilfe des „DECAprime II“-Kits (Ambion, Austin) und unter Verwendung von [α^{32} -P]-dCTP fand die radioaktive Markierung und Synthese der Sonden nach Herstellerangaben statt. Für die Reaktion wurden 25 ng DNA verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt neben Decamer-Lösung und 3 μ l [α^{32} -P]-dCTP den vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer (-dCTP) sowie 1 μ l Exonuklease-freies Klenow-Fragment. Die Synthese erfolgte für 10 Minuten bei 37 °C. Radioaktive Nukleotide wurden anschließend mit Hilfe einer „Microspin G-25“-Sephadex-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg) entfernt.

2.2.2.11 Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäure-Blots

Die Vorhybridisierung der Nylonmembran erfolgte mit Hybridisierungspuffer (50 % (v/v) Formamid, 25 % (v/v) 20 x SSPE, 0,2 % (v/v) SDS, 10 % 50x Denhardts, pH 7,0-7,5) für 4-8 Stunden bei 37 °C. Ihr folgte die Hybridisierung bei 37 °C über Nacht durch Zugabe der radioaktiven Sonde (vgl. Kapitel 2.2.2.10) in den Hybridisierungspuffer. Durch Schwenken der Membran in Waschpuffer (5x SSPE, 1,2 % (v/v) SDS) bei Temperaturen von 55 °C bis 70 °C wurden unspezifisch gebundene Sonden entfernt. Anschließend erfolgte eine 10-stündige bis mehrtägige

Exposition von Fuji-Ray RX Röntgenfilmen mit der Membran in Expositionskassetten („Quanta Fast Detail“, Dupont, Wilmington) bei – 80 °C.

2.2.3 Mikroskopie und Färbemethoden

2.2.3.1 Lichtmikroskopie

Für lichtmikroskopische Aufnahmen wurde ein Zeiss AuxioPhot-Mikroskop mit einer SONY 3CCD-Digitalkamera und Plan-Neofluor Objektiven der Vergrößerungen 2,5x, 10x sowie 20x eingesetzt. Die Anzucht der Pilze erfolgte auf Glasobjektträgern (siehe Kapitel 2.2.1.2).

2.2.3.2 Konfokale Mikroskopie und Fluoreszenzfärbungen

Für konfokale Fluoreszenz-Aufnahmen wurde das Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP1 von Leica mit den Leica HC Apo-Objektiven der Vergrößerungen 10x, 20x sowie 40x verwendet. Die Anzucht der Pilze erfolgte nach der „inverted-Agar-Block-Methode“ (siehe Kapitel 2.2.1.2). Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern, wurden die Laser mit etwa 5 % der maximalen Aktivität genutzt.

Bei Aufnahmen mit dem Membran-färbenden Farbstoff SynaptoRed wurde direkt vor der mikroskopischen Analyse ein Tropfen einer 6,4 µM SynaptoRed-Lösung auf das Myzel oder die Konidien gegeben. Die Anregung mit einem Helium-Neon-Laser erfolgte bei 514 nm, die Detektion der Fluoreszenz fand bei >550 nm statt (nach Fischer-Parton *et al.*, 2000).

Bei Aufnahmen mit dem DNA-färbenden Farbstoff DAPI wurde direkt vor der mikroskopischen Analyse ein Tropfen DAPI-Lösung (1 µg/ml) auf die Konidien pipettiert. Die Anregung mit dem UV-Laser erfolgte bei 358 nm, die Fluoreszenz wurde bei >460 nm detektiert.

Bei Aufnahmen von fluoreszierendem eGFP erfolgte die Anregung mit dem Helium-Neon-Laser bei 488 nm, die Detektion der Fluoreszenz fand bei >510 nm statt.

Um bei der Detektion mehrerer fluoreszierender Stoffe eine gegenseitige Beeinflussung durch Überschneidungsbereiche in Absorption und Emission zu vermeiden, wurden die entsprechenden Aufnahmen getrennt angefertigt und im Nachhinein mit Hilfe des Programms „Adobe Photoshop“ übereinandergelegt.

2.2.4 Phänotypische Analyse von *Neurospora crassa*

2.2.4.1 Vegetatives Myzel

Für die Analyse des vegetativen Myzels wurden Objektträgerkulturen angelegt (siehe Kapitel 2.2.1.2). Vor der mikroskopischen Analyse wurde auf den zu untersuchenden Myzelbereich ein Tropfen Nährmedium und ein Deckgläschen gegeben. Dies erfolgte mehrere Stunden vor der mikroskopischen Studie, um Wachstums- und Strömungsartefakte zu vermeiden.

2.2.4.2 Wachstumsgeschwindigkeit des vegetativen Myzels

Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde in abgeänderter Form nach Davis *et al.* (1970) untersucht. Hierfür wurden sterile, 40 cm lange Glasröhren mit einem Innendurchmesser von 1,5 cm mit 10 ml VMM+G-Festmedium gefüllt. Nach dem Animpfen mit Konidien wurden sie luftdurchlässig verschlossen und bei 25 °C und Licht gelagert. Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde ermittelt, indem in 24 Stunden-Abständen an der Wachstumsfront des Myzels eine Markierung vorgenommen wurde. So konnten vergleichende Studien bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen verschiedenen Pilzen durchgeführt werden.

2.2.4.3 Ascosporenentwicklung

Um die Entwicklung der Ascosporen zu untersuchen, wurden Perithezien unterschiedlicher Entwicklungsstadien aus Kreuzungen (siehe Kapitel 2.2.1.2) isoliert, in einem Tropfen Wasser auf einen Glasobjektträger gegeben und mit Hilfe des Deckgläschens vorsichtig gequetscht. Anschließend wurden Ascosporen unterschiedlicher Reifestadien mikroskopisch analysiert.

2.2.4.4 Ascosporenkeimung und Morphologie ausgekeimter Ascosporen

Um die Keimungsrate und die frühen Stadien ausgekeimter Ascosporen zu untersuchen, wurden zunächst ausgeschleuderte Ascosporen mit Hilfe einer Impfloße aus den Kreuzungskolben (siehe Kapitel 2.2.1.2) in 500 µl steriles Wasser gegeben. Nach einer 1,5-stündigen Hitzeaktivierung bei 60 °C wurde mittels Thoma-Zählkammer die Konzentration reifer Sporen bestimmt und auf $4 \cdot 10^3$ Sporen/ml eingestellt. Anschließend wurden 50 µl der Suspension auf dünn gegossenen Petrischalen mit festem Nährmedium in einem definierten Quadrat ausplattiert und nach 9-40 Stunden bezüglich der Auskeimungsrate und -morphologie analysiert.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, Aufschlüsse über die Funktion des *bem46*-Gens in *Neurospora crassa* zu erlangen und das BEM46-Protein subzellulär zu lokalisieren. Dazu wurden *N. crassa* Transformanten erstellt, die im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte bzw. verstärkte *bem46*-Expression zeigen. Die Verminderung der Expression wurde über die RNAi-Technik und die Verstärkung über eine Überexpression erreicht. Die Lokalisation von BEM46 wurde mit Hilfe eines *bem46::egfp*-Fusionskonstruktes ermittelt.

3.1 Erstellung von *bem46*-RNAi-Transformanten

Die Verwendung von RNAi-Vektoren bietet in vielen Eukaryoten die Möglichkeit der sequenzspezifischen Degradation eines Transkripts (Calderon *et al.*, 2005). Auch in zahlreichen filamentösen Pilzen wurde diese Technik bereits erfolgreich eingesetzt und etabliert (Weld *et al.*, 2006), so auch in *Neurospora crassa* (Goldoni *et al.*, 2004).

Um Aufschluss darüber zu bekommen, welche Auswirkungen ein vermindertes *bem46*-Expressionsniveau auf *N. crassa* hat, wurden in dieser Arbeit *bem46*-RNAi-Transformanten analysiert. Ihre Erstellung und molekulare Charakterisierung wird im Folgenden dargestellt.

3.1.1 Klonierung eines *bem46*-RNAi-Konstruktes

RNAi-Konstrukte enthalten in einer Expressionskassette Teilsequenzen aus dem Gen, dessen Expression vermindert werden soll. Die Sequenzen werden dabei so gewählt, dass sich nach ihrer Transkription die RNA zu einer Stammschlaufenstruktur faltet (Calderon *et al.*, 2005). Die gepaarten Bereiche der Stammschlaufe bestehen aus Exon-Sequenzen des Zielgens, während ein zusätzliches Intron in der Schlaufenregion die Effizienz der Degradation des Zieltranskripts steigern kann (Smith *et al.*, 2000). Die molekularen Mechanismen, die zu einer Unterdrückung des Zielgens führen, sind in Kapitel 1.4.1 näher erläutert.

Die Konstruktion des *bem46*-RNAi-Konstruktes folgte entsprechend der Arbeiten von Goldoni *et al.* (2004). Dazu werden Fragmente des Zielgens in invers repetitiver Anordnung in eine Expressionskassette integriert. Hierfür werden zwei PCR-Amplifikate mit identischen Sequenzabfolgen in entgegengesetzter Orientierung miteinander ligiert. Für den Bereich der Schlaufenregion ist eines der beiden Amplifikate zusätzlich um die Sequenz eines Introns ergänzt.

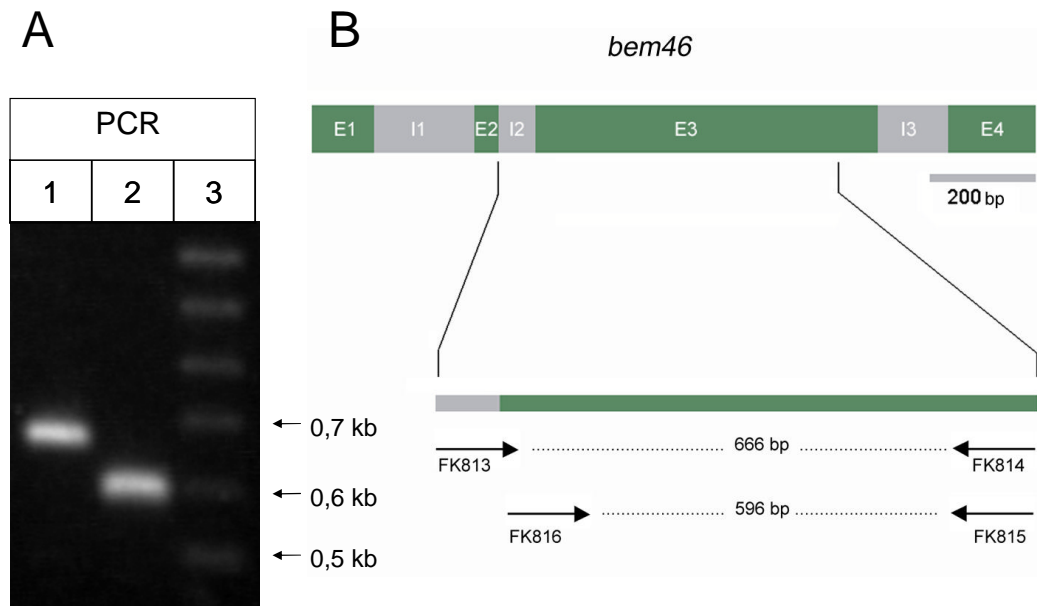


Abbildung 9: PCR-Amplifikate aus *bem46* für die Erstellung eines RNAi-Konstruktes

A: Spur 1: 596 bp-Amplifikat (Exon-3); Spur 2: 666 bp-Amplifikat (Intron-2 + Exon-3); Spur 3: 100-5000 bp Größenstandard (MBBL, Bielefeld)

B: Übersicht über die Lage der verwendeten Oligonukleotide im *bem46*-Gen aus *N. crassa*; E = Exon, I = Intron

Für die Erstellung eines *bem46*-RNAi-Konstruktes wurden zunächst zwei Sequenzabschnitte des *bem46*-Gens amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Fragmente und die Lage der verwendeten Oligonukleotide im *bem46*-Gen sind in Abbildung 9 gezeigt. Bei dem Fragment mit der Größe von 596 bp handelt es sich um Sequenzbereiche des Exon-3, amplifiziert mit den Oligonukleotiden FK815 und FK816 (vgl. Tabelle 1). Bei dem Fragment mit der Größe von 666 bp ist dieser Sequenzbereich aus dem Exon-3 um das Intron-2 ergänzt. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden FK813 und FK814 (vgl. Tabelle 1). Beide Fragmente wurden anschließend jeweils in den mit *XcmI* hydrolysierten Klonierungsvektor pMon (Borovkov und Rivkin, 1997) inseriert. Daraus resultierten die Vektoren pMM508 und pMM509 (siehe Anhang), deren inserierte Fragmente mittels Sequenzierung (MWG-Biotech (Ebersberg)) überprüft wurden. pMM508 enthält das 596-bp große und pMM509 das 666 bp große Fragment aus *bem46*. Für die Erstellung des RNAi-Konstruktes wurden die Vektoren pMM508 und pMM509 mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und die geluuierten *bem46*-Fragmente in einen Expressionsvektor integriert. Als Expressionsvektor dienten dabei die Vektoren pAS479 und pAS365, die sich in ihren

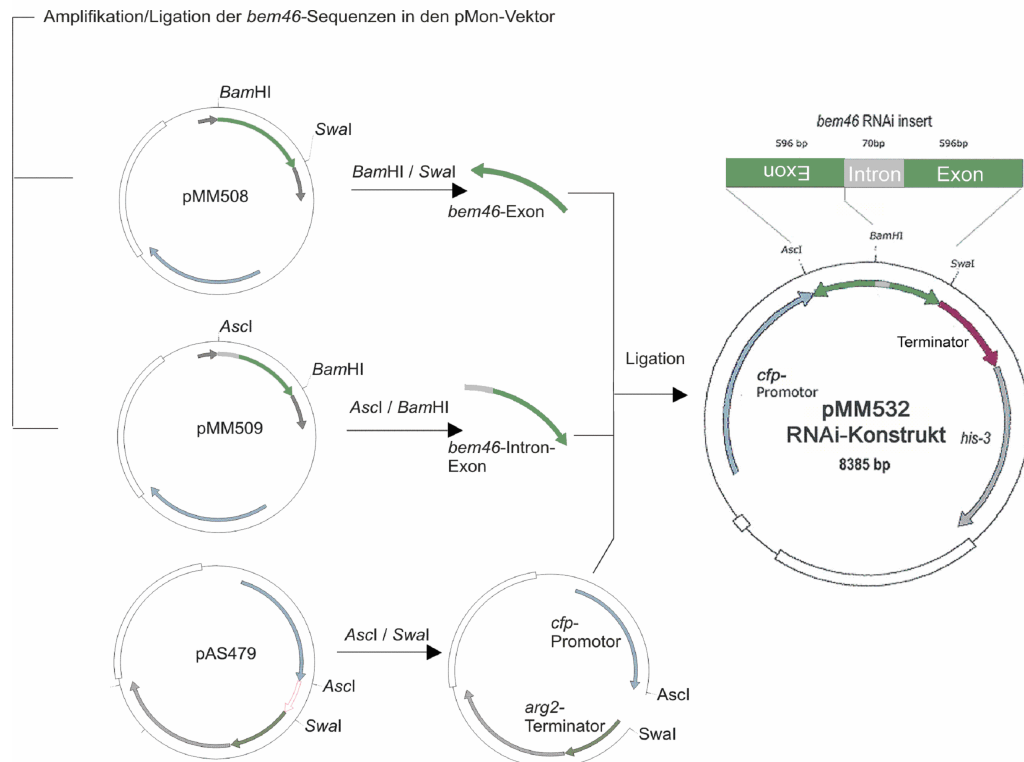


Abbildung 10: Klonierungsstrategie für die Erstellung des *bem46*-RNAi-Vektors pMM532

Mit Hilfe der Oligonukleotide FK813/FK814 bzw. FK815/FK816 wurden zwei Fragmente des *bem46*-Gens amplifiziert und jeweils in den mit *Xcm*I hydrolysierten Klonierungsvektor pMon inseriert. Es resultierten die oben gezeigten Vektoren pMM508 und pMM509. pMM508 trägt eine Exonsequenz, pMM509 die identische Exonsequenz, ergänzt um ein vollständiges Intron. Als Expressionsvektor diente das Plasmid pAS479. Nach der Hydrolyse der drei Vektoren mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden die *bem46*-Fragmente in entgegengesetzter Orientierung zueinander in den Expressionsvektor integriert.

Promotoren unterscheiden (Silke Alves, persönliche Mitteilung): pAS479 verfügt über den *cfp*-Promotor (Temporini *et al.*, 2004) und pAS365 steht unter der Kontrolle des *acu-5*-Promotors (Collins *et al.*, 1991).

Eine Übersicht der Klonierungsstrategie für die Erstellung des RNAi-Konstruktes ist in Abbildung 10 am Beispiel des Vektors pMM532 gezeigt. Der Vektor pMM532 verfügt über den durch Ethanol regulierbaren *cfp*-Promotor (Temporini *et al.*, 2004) und den Arginin-2-Terminator (Orbach *et al.*, 1992). Die Überprüfung dieses Vektors erfolgte durch Hydrolyse der DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Xmn*I, *Kpn*I und *Bam*HI. Das Ergebnis der Hydrolyse ist in Abbildung 11 gezeigt, wobei die beobachteten Bandengrößen den erwarteten Größen entsprechen.

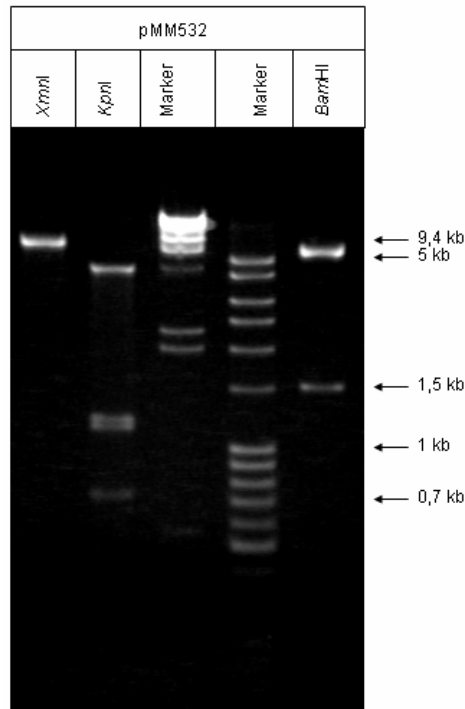


Abbildung 11: Hydrolyse der Vektor-DNA von pMM532 mit den Restriktionsendonukleasen *XmnI*, *KpnI* und *BamHI*

Bei der Hydrolyse des Vektors pMM532 mit *XmnI* wurde eine Bande der Größe 7191 bp, bei der Hydrolyse mit *KpnI* Banden der Größe 4344 bp, 1205 bp, 1142 bp und 721 bp und bei der Hydrolyse mit *BamHI* Banden der Größe 6074 bp und 1505 bp erwartet. Die beobachteten Bandengrößen entsprechen den erwarteten Größen. Als Größenstandard diente mit *HindIII* hydrolysierte λ -DNA sowie ein 100-5000 bp Größenstandard (MBBL, Bielefeld).

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit das RNAi-Konstrukt pMM510 (siehe Anhang) erstellt, welches im Unterschied zu dem Vektor pMM532 über den *acu-5*-Promotor (Collins *et al.*, 1991) verfügt. Somit wurden zwei *bem46*-RNAi-Vektoren erstellt, die sich in der Wahl ihrer Promotoren unterscheiden.

3.1.2 Transformation und molekulare Charakterisierung

Mit dem Ziel *bem46*-RNAi-Transformanten zu erhalten, wurde *N. crassa* mit den linearisierten RNAi-Vektoren pMM510 und pMM532 wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben transformiert. Diese beiden Vektoren unterscheiden sich in der Wahl ihrer Promotoren (siehe Anhang).

Da die Transformation mit dem Vektor pMM510 trotz einer Analyse von 28 putativen Transformanten nicht mittels Southern-Blot bestätigt werden konnte,

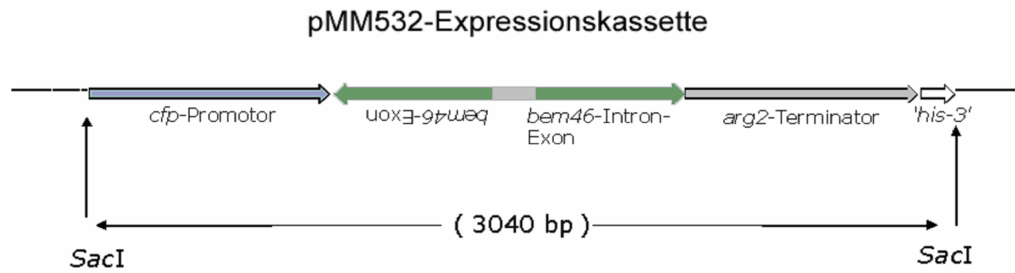


Abbildung 12: Der Vektor pMM532 nach der Hydrolyse mit *SacI*

Dargestellt ist der mit *SacI* hydrolysierte Vektor pMM532, der in das *N. crassa*-Genom integriert werden sollte.

konzentrierten sich die weiteren Versuche auf Arbeiten mit dem Vektor pMM532. Der Vektor pMM532 trägt das RNAi-Konstrukt unter der Kontrolle des *cfp*-Promotors. Der Transformation folgte eine Southern-Blot-Analyse der DNA putativer Transformanten. Für die Hydrolyse der DNA wurde die Restriktionsendonuklease *SacI* verwendet. Das DNA-Fragment des Transgens hat eine erwartete Größe von 3 kb (siehe Abbildung 12). In Abbildung 13 ist das Autoradiogramm der Southern-Blot-Analyse putativer Transformanten nach der Transformation mit dem Vektor pMM532 gezeigt. Als Sonde wurde ³²P-markierte DNA des *bem46*-Exon-3 verwendet (vgl. Abbildung 3). Neben dem Signal der endogenen *bem46*-Kopie (ca. 7 kb-Bande in allen Spuren) und einigen schwächeren, unspezifischen Signalen bei 4 kb, fand sich in den Spuren 2, 4, 7 und 14 jeweils eine zusätzliche Bande mit der zu erwartenden Größe von 3 kb. Die entsprechenden Transformanten NcT289-NcT292 wurden daher für nachfolgende Analysen verwendet.

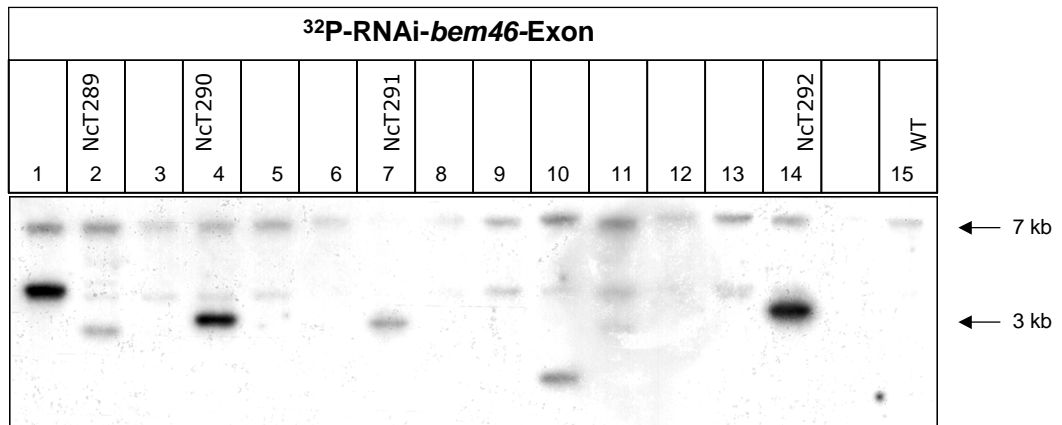


Abbildung 13: Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung zur Identifizierung von RNAi-Transformanten

Für die Southern-Hybridisierung dieses Autoradiogramms wurde eine radioaktiv markierte *bem46*-Exon-3-spezifische Sonde verwendet. Auf der Höhe von 7 kb findet sich ein Signal, welches auch in der Spur des Wildtyps zu finden ist und auf die endogene *bem46*-Sequenz zurückzuführen ist. In den Spuren 2, 4, 7 und 14 ist ein zusätzliches Signal auf der erwarteten Höhe von 3 kb zu sehen.

3.1.3 Charakterisierung der RNAi-Transformanten auf RNA-Ebene

Das *bem46*-Transkriptniveau der RNAi-Transformanten NcT289-NcT292 (siehe Kapitel 3.1.2) wurde mit dem des Wildtyps verglichen. Hierzu wurde mit je 30 µg isolierter Gesamt-RNA der Transformanten und des Wildtyps ein Northern-Blot durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde hierfür aus Myzel isoliert, das zuvor unter induzierenden Bedingungen bezüglich des verwendeten *cfp*-Promotors inkubiert worden war (vgl. Kapitel 2.2.1.2). Bei der Northern-Hybridisierung fungierte das ³²P-markierte Exon-3 aus dem *bem46*-Gen als Sonde (siehe Abbildung 3). Da diese Sonde sowohl mit der endogenen *bem46*-mRNA als auch mit dem Transkript des RNAi-Konstruktes hybridisiert, kann auf dem in Abbildung 14 gezeigten Autoradiogramm nicht zwischen den Signalen dieser beiden Transkripte unterschieden werden, da die Transkripte annähernd gleich groß sind. Um die Signalstärke mit der entsprechend eingesetzten Gesamt-RNA-Menge ins Verhältnis setzen zu können, ist in Abbildung 14 B unter dem Autoradiogramm („A“) die Gesamt-RNA im Bereich der rRNA-Banden dargestellt. In den Spuren des Wildtyps und der Transformanten NcT290, NcT291 und NcT292 findet sich ein relativ schwaches Signal auf der Höhe von 1,6 kb. Setzt man die Bandenstärke dieser Spuren in Relation zu den eingesetzten RNA-Mengen, so ist die *bem46*-Transkriptmenge bei diesen vier Pilzen identisch.

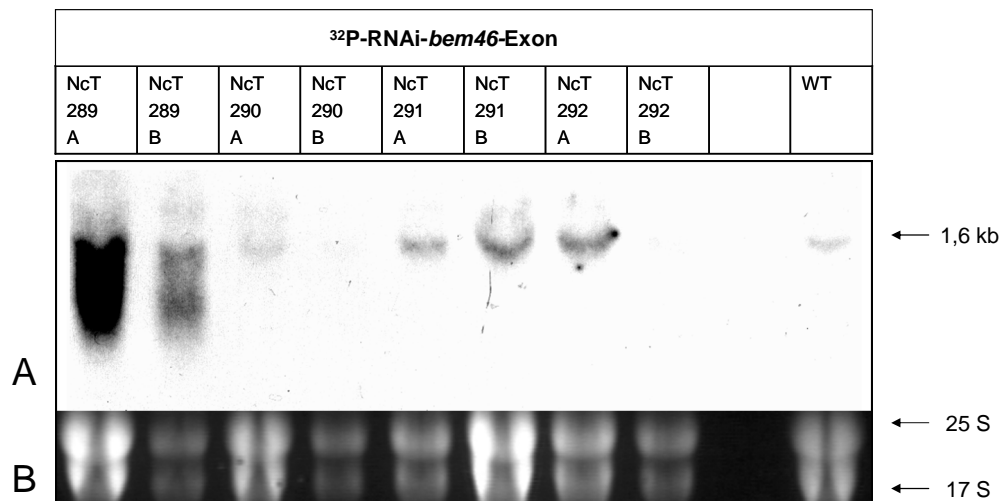


Abbildung 14: Autoradiogramm der Northern-Hybridisierung zur Charakterisierung von RNAi-Transformanten

Um eine Quantifizierung der Transkriptmengen zu erlauben, sind unterhalb des gezeigten Autoradiogramms („A“) die entsprechend eingesetzten Gesamt-RNA-Mengen im Bereich der ribosomalen Banden dargestellt („B“). In den Spuren der Transformanten NcT290, NcT291, NcT292 und der des Wildtyps finden sich auf der Höhe von 1,6 kb in etwa gleiche relative Signalstärken. In den Spuren der Transformante NcT289 ist ein deutlich stärkeres Signal auch in den Bereichen unterhalb von 1,6 kb zu finden.

Die RNA der Transformante NcT289 zeigt jedoch ein vielfach stärkeres Signal, das auch in dem Bereich unterhalb von 1,6 kb zu finden ist.

Um zu überprüfen, ob sich die *bem46*-Transkriptmenge der RNAi-Transformanten von der des Wildtyps unterscheidet, wurde diese anschließend mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert (siehe Kapitel 2.2.2.6). Hierfür wurden die Oligonukleotide FK701 und FK702 verwendet. Sie ermöglichen die Amplifikation eines 492 bp großen Fragments der endogenen *bem46*-mRNA, wobei entscheidend ist, dass das Transkript des RNAi-Konstrukts nicht als Template genutzt werden kann. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der oben dargestellten Northern-Hybridisierung zeigte die Transformante NcT289 im Gegensatz zum Wildtyp kein nachweisbares *bem46*-Transkript, d.h. die in Abbildung 14 nachgewiesene mRNA stammt von dem RNAi-Konstrukt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente der OneStep-RT-PCR sind in Abbildung 15 dargestellt. Hier ist nur beim Wildtyp ein deutliches *bem46*-Amplifikat mit der

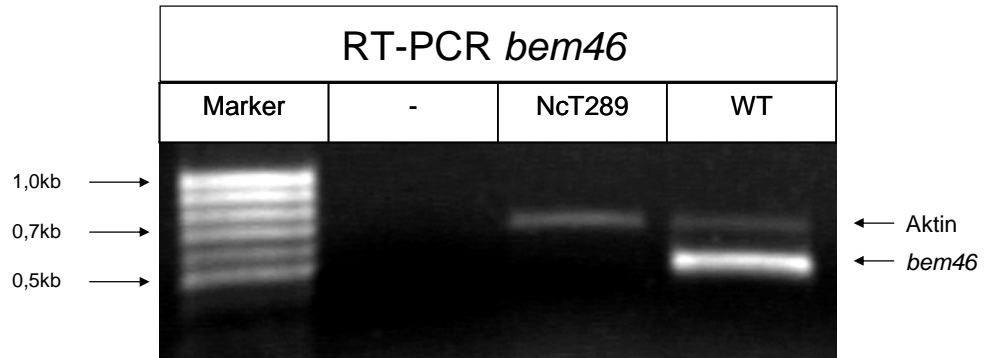


Abbildung 15: Semiquantitative RT-PCR des *bem46*-Gens nach 33 Zyklen

Neben einem 492 bp großen *bem46*-Fragment wurde als Amplifikationskontrolle zusätzlich ein 706 bp großes Aktin3-Fragment amplifiziert.

Von links nach rechts: 100-500 bp-Größenstandard (MBBL, Bielefeld), Wasserkontrolle, NcT289, WT. Die 0,5 kb große *bem46*-Bande fehlt in der Spur mit der Transformante NcT289. Die 0,7 kb großen Aktin3-Banden sind etwa gleich stark.

Größe von 0,5 kb zu erkennen. Um bestätigen zu können, dass etwa gleiche Mengen intakter RNA eingesetzt wurden, waren in diesen Reaktionsansätzen zusätzlich die Oligonukleotide FK790 und FK791 für die Amplifikation eines 706 bp großen Fragments der Aktin3-mRNA enthalten. Wie der Abbildung 15 zu entnehmen ist, sind die Mengen der Aktin-Amplifikate in den Spuren der Transformante und des Wildtyps vergleichbar. Damit wurde eine RNAi-Transformante erhalten, bei der nachweisbar das *bem46*-Transkriptniveau stark reduziert ist.

3.2 Erstellung von *bem46*-Überexpressions-Transformanten

Neben der verminderten Expression eines Gens bietet dessen Überexpression eine weitere Möglichkeit, Aufschlüsse über die Funktion des Gens zu erlangen (Weld *et al.*, 2006). Auch in filamentösen Pilzen wurde diese Technik erfolgreich für die Charakterisierung von Genen angewendet (Juvvadi *et al.*, 2003; Hisada *et al.*, 2005).

Um die Auswirkungen einer starken *bem46*-Expression in *Neurospora crassa* zu untersuchen, wurden *bem46*-Überexpressions-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Deren Erstellung und molekulare Charakterisierung ist im Folgenden dargestellt.

3.2.1 Klonierung eines Überexpressions-Vektors

Ein Überexpressions-Vektor trägt den offenen Leserahmen des entsprechenden Gens unter der Kontrolle eines starken Promotors (Weld *et al.*, 2006). Für die Erstellung eines *bem46*-Überexpressions-Vektors wurde der offene Leserahmen von *bem46* mit Hilfe der Oligonukleotide FK832 und FK833 (siehe Tabelle 1) amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment mit der Größe von 1361 bp ist in Abbildung 16 gezeigt. Anschließend wurde das Fragment in den *Sma*I hydrolysierten Klonierungsvektor pBluescript II/SK+ (Short *et al.*, 1988) inseriert. Es resultierte der Vektor pMM527 (siehe Anhang), dessen inseriertes Fragment mittels

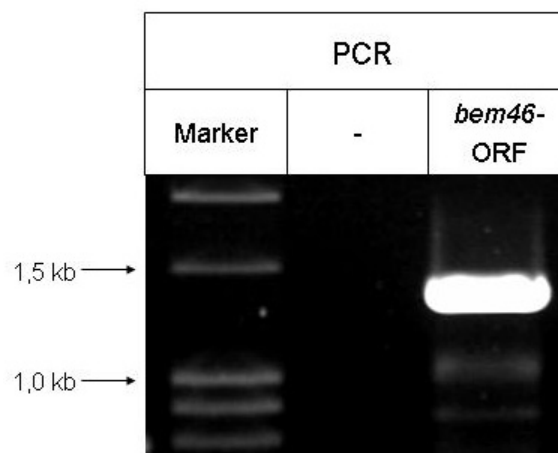


Abbildung 16: PCR-Amplifikat des *bem46*-ORFs

Gezeigt ist das *bem46*-Amplifikat der erwarteten Größe von 1361 bp, amplifiziert mit den Oligonukleotiden FK832 und FK833.

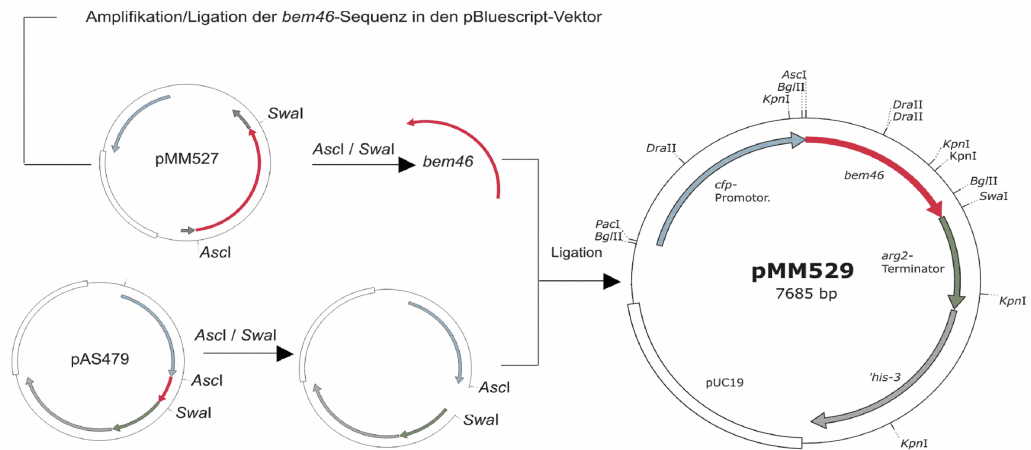


Abbildung 17: Klonierungsstrategie zu Erstellung von pMM529

Das Überexpressions-Konstrukt pMM529 wurde erstellt, indem pMM527 und pAS479 mit den Restriktionsendonukleasen *Ascl*/*Swal* hydrolysiert wurden. Nach der Ligation der entsprechenden Fragmente stand der *bem46*-ORF unter der Kontrolle des *cfp*-Promotors.

Sequenzierung überprüft wurde. Für die Erstellung des *bem46*-Überexpressions-Vektors wurden anschließend der Vektor pMM527 sowie ein Expressionsvektor mit den Restriktionsendonukleasen *Ascl* und *Swal* hydrolysiert und anschließend der *bem46*-ORF in den Expressionsvektor integriert. Dafür fanden die Expressionsvektoren pAS479 und pAS480 Verwendung, die sich bezüglich der Wahl ihrer Promotoren unterscheiden (Silke Alves, persönliche Mitteilung): pAS479 verfügt über den *cfp*-Promotor (Temporini *et al.*, 2004) und pAS480 steht unter der Kontrolle des *taa*-Promotors (Galagan *et al.*, 2003).

Eine Übersicht über die Klonierung eines *bem46*-Überexpressions-Konstruktes ist in Abbildung 17 am Beispiel des Vektors pMM529 gezeigt. Dieser Vektor verfügt über den regulierbaren *cfp*-Promotor, dessen Aktivität durch die Zugabe von Ethanol in das Nährmedium gesenkt werden kann (Temporini *et al.*, 2004). Die Überprüfung des Vektors pMM529 erfolgte durch Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI*, *DraII*, *BglII* und *PacI*. Die resultierenden DNA-Fragmente sind in Abbildung 18 dargestellt. Die beobachteten Bandengrößen entsprechen den erwarteten Größen.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit der *bem46*-Überexpressions-Vektor pMM528 erstellt, der über den *taa*-Promotor verfügt. Dieser Promotor zeigt eine konstitutive Aktivität in *Neurospora crassa* (Silke Alves, persönliche Mitteilung).

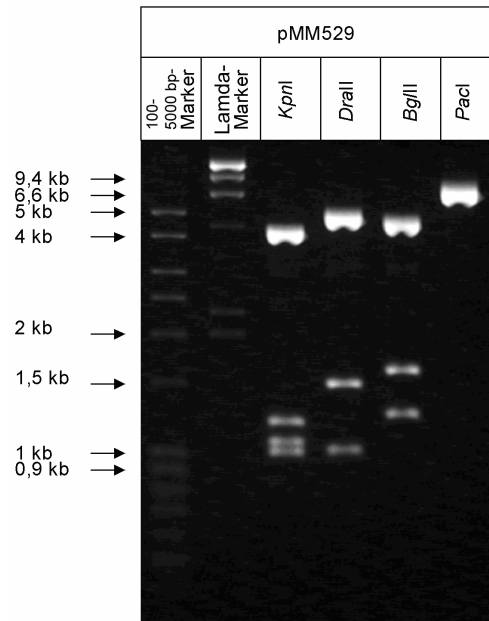


Abbildung 18: Hydrolyse des Vektors pMM529 mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI*, *DraIII*, *BglII* und *PaeI*

Bei der Hydrolyse der Vektor-DNA von pMM529 mit *KpnI* wurden Banden der Größe 4334 bp, 1205 bp, 1069 bp und 1006 bp, bei der Hydrolyse mit *DraIII* Banden der Größe 5173 bp, 1500 bp und 1011 bp, bei der Hydrolyse mit *BglII* Banden der Größe 4814 bp, 1614 bp und 1257 bp und bei der Hydrolyse mit *PaeI* eine Bande der Größe 7685 bp erwartet. Die beobachteten Bandengrößen entsprechen den erwarteten Größen. Als Größenstandard diente die mit *HindIII* hydrolysierte λ -DNA sowie ein 100-5000 bp Größenstandard (MBBL, Bielefeld).

3.2.2 Transformation und molekulare Charakterisierung

Nach der Erstellung der *bem46*-Überexpressions-Vektoren pMM528 und pMM529 (siehe Anhang) folgte die in Kapitel 2.2.2.2 beschriebene Transformation der *Neurospora crassa*-Makrokonidien. Da nach der Transformation mit dem Vektor pMM528 nur wenige Kolonien auf den Selektionsplatten wuchsen, konzentrierten sich die weiteren Versuche auf den Vektor pMM529, der *bem46* unter der Kontrolle des induzierbaren *cfp*-Promotors (Temporini *et al.*, 2004) trägt.

Der Transformation folgte die Analyse der putativen Transformanten mittels Southern-Hybridisierung (siehe Kapitel 2.2.2.9). Die dafür eingesetzte genomische DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *SacI* hydrolysiert. Wenn eine Insertion des Vektors pMM529 in das Genom stattgefunden hatte, hat das Hybridisierungssignal des Transgens eine erwartete Größe von 3,1 kb. (siehe Abbildung 19). In Abbildung 20 ist das Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung zur

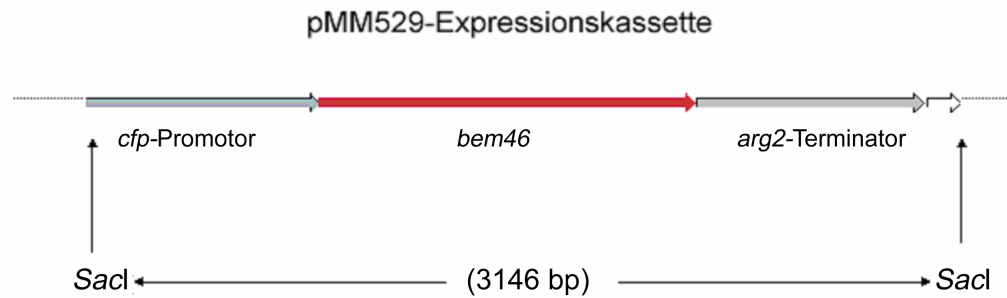


Abbildung 19: Der Vektor pMM529 nach der Hydrolyse mit *SacI*

Dargestellt ist der mit *SacI* hydrolysierte Überexpressions-Vektor pMM529, der in das *N. crassa*-Genom integriert werden sollte

Untersuchung fünf putativer Transformanten des Vektors pMM529 gezeigt. Als Referenz diente der Wildtyp. Jeweils 25 µg der mit *SacI* hydrolysierten genomischen DNA wurden eingesetzt. Die verwendete ³²P-markierte Sonde war *bem46*-spezifisch. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, befindet sich in allen Spuren ein Signal bei 7 kb. Da dieses Signal auch in der Spur des Wildtyps zu beobachten ist, handelt es sich dabei vermutlich um die endogene *bem46*-Kopie. Bei allen untersuchten putativen Transformanten ist im Unterschied zum Wildtyp ein weiteres deutliches Signal auf der erwarteten Höhe von 3,1 kb zu finden. Somit wurden fünf *N. crassa* Transformanten erstellt, die ein *bem46*-Überexpressions-Konstrukt tragen. Die Transformanten NcT284-NcT288 wurden für die nachfolgende Analysen verwendet.

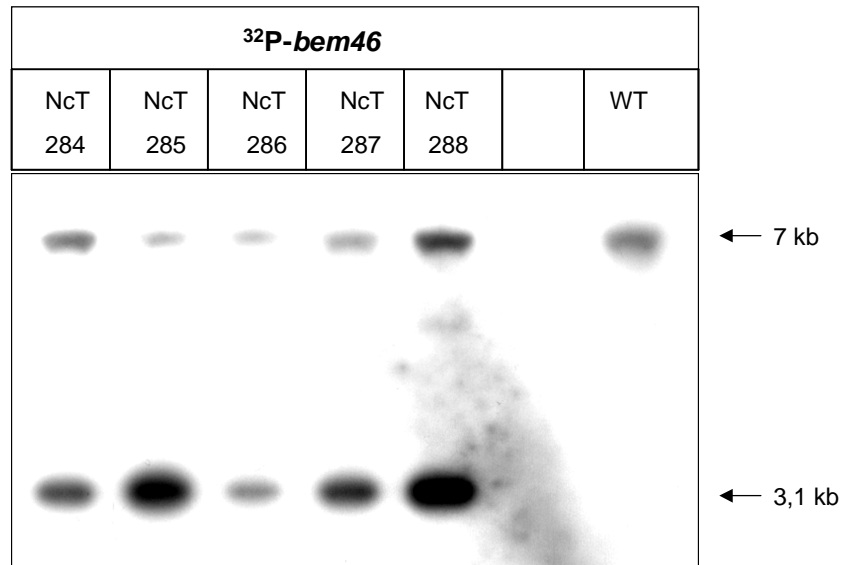


Abbildung 20: Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung zur Identifizierung von Überexpressions-Transformanten

Für die Southern-Hybridisierung wurde eine radioaktiv markierte *bem46*-spezifische Sonde verwendet. Bei der Größe von 7 kb ist in allen Spuren ein Signal zu beobachten, das dem endogenen *bem46* entspricht. Ein zusätzliches Signal der erwarteten Größe von 3,1 kb befindet sich in den Spuren der Transformanten NcT284-NcT288, und ist auf die transgene *bem46*-Kopie zurückzuführen.

3.2.3 Transkriptanalyse der *bem46*-Überexpressions-Transformanten

Nachdem in Kapitel 3.2.2 fünf Transformanten auf DNA-Ebene identifiziert wurden, die den *bem46*-Überexpressions-Vektor pMM529 tragen, folgte die Charakterisierung dieser Transformanten auf Transkriptebene. Zu zeigen war, dass diese Transformanten unter induzierenden Bedingungen (siehe Kapitel 2.2.1.2) eine deutlich erhöhte *bem46*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus Myzel isoliert, das zuvor unter induzierenden Bedingungen bezüglich des verwendeten *cfp*-Promotors inkubiert worden war. Es folgte die Analyse mittels Northern-Hybridisierung. Das Autoradiogramm der entsprechenden Hybridisierung ist in Abbildung 21 dargestellt. Als ³²P-markierte Sonde wurde das Exon-3 aus dem *bem46*-Gen (vgl. Abbildung 3) verwendet. Abbildung 21 zeigt in den Spuren der Transformanten im Gegensatz zum Wildtyp ein deutliches Signal auf der erwarteten Höhe von 1,6 kb. Damit wurden fünf Überexpressions-Transformanten erhalten, bei denen nachweisbar eine Überexpression des *bem46*-Gens stattfindet.

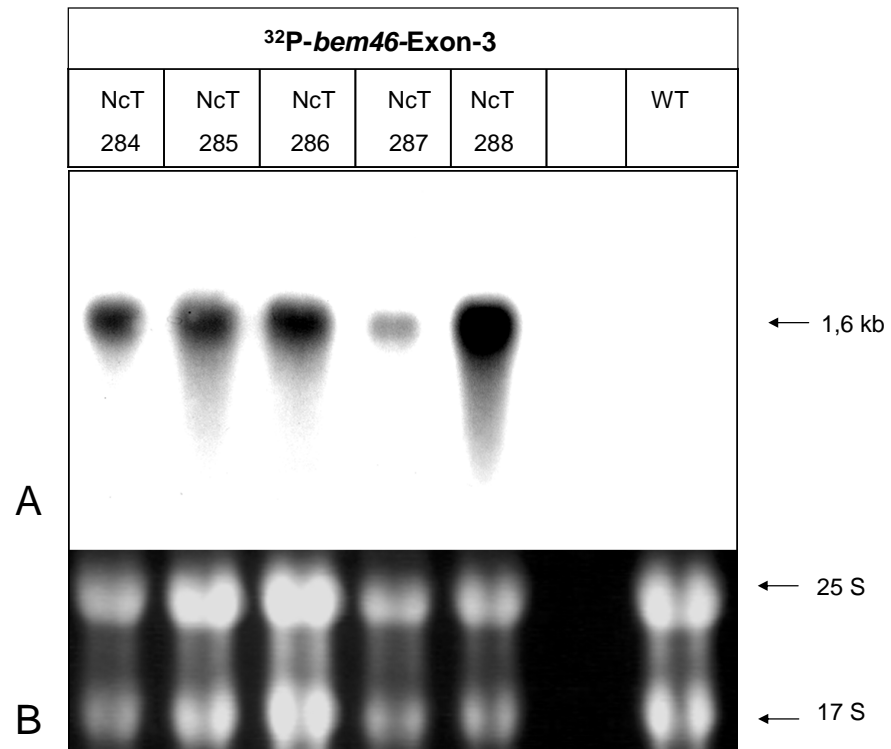


Abbildung 21: Autoradiogramm der Northern-Hybridisierung zur Charakterisierung von *bem46*-Überexpressions-Tranformanten

Um eine bessere Quantifizierung der *bem46*-Transkriptmengen zu erlauben, sind unterhalb des dargestellten Autoradiogramms („A“) die entsprechend eingesetzten Gesamt-RNA-Mengen im Bereich der ribosomalen Banden dargestellt („B“). Auf der erwarteten Höhe von etwa 1,6 kb findet sich auf dem Autoradiogramm in den Spuren der Tranformanten ein deutliches Signal, welches in der Spur des Wildtyps fehlt.

3.3 Phänotypische Analyse und vergleichende Studien von Wildtyp, *bem46*-RNAi- und *bem46*-Überexpressions-Transformanten

Es wurde gezeigt, dass einige *bem46*-RNAi- bzw. *bem46*-Überexpressions-Transformanten ein gegenüber dem Wildtyp vermindertes bzw. erhöhtes *bem46*-Transkriptniveau aufweisen. Um Hinweise über die Funktion des *bem46*-Gens in *Neurospora crassa* erlangen zu können, wurden diese Transformanten im Vergleich zum Wildtyp phänotypisch analysiert.

3.3.1 Morphologie des vegetatives Myzels

Das Myzel der RNAi- und Überexpressions-Stämme ist in der Abbildung 22 am Beispiel der Transformanten NcT289 und NcT286 im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Die Anzucht für die Lichtmikroskopie erfolgte wie unter 2.2.1.2

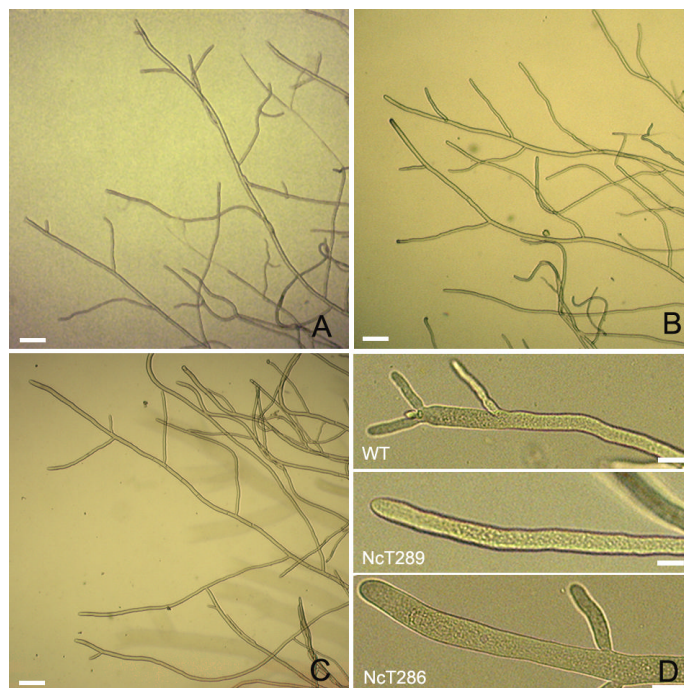


Abbildung 22: Vergleichende Aufnahmen des vegetativen Myzels

A: Wildtyp, **B:** RNAi-Transformante NcT289, **C:** Überexpressions-Transformante NcT286, **D:** Hyphenspitzenregionen im Vergleich. Zwischen den untersuchten Stämmen sind keine Unterschiede im Hyphenwachstum festzustellen.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss AuxioPhot-Mikroskop und einer SONY 3CCD-Digitalkamera durch Plan-Neofluor Objektive der Vergrößerungen 2,5x sowie 20x angefertigt. Die Balken in „A“-„C“ entsprechen 50 µm, in „D“ 10 µm.

beschrieben. Neben generellen anatomischen Merkmalen wurden Verzweigungshäufigkeit und -richtung, gerichtetes Wachstum und die Häufigkeit sichtbarer Vakuolen miteinander verglichen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Hyphen der untersuchten Transformanten und des WT.

3.3.3 Wachstumsgeschwindigkeit des vegetativen Myzels

Um zu überprüfen, ob sich ein verändertes *bem46*-Expressionsniveau auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *Neurospora crassa* auswirkt, erfolgte die Anzucht in Rennrohren wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben. Untersucht wurden die RNAi-Transformante NcT289 sowie die Überexpressions-Transformanten NcT285, NcT286 und NcT288. Als Referenz diente der Wildtyp. In Abbildung 23 ist unter „A“ die Wachstumsstrecke der untersuchten Pilze als Funktion der Zeit dargestellt. Die Steigung der Funktionen repräsentiert die Wachstumsgeschwindigkeit. Unter „B“ ist die durchschnittliche Wachstumsstrecke pro Tag gezeigt. Der Abbildung 23 ist zu entnehmen, dass Pilzstämmen mit verändertem *bem46*-Expressionsniveau im Vergleich zum Wildtyp keine deutlichen Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zeigen.

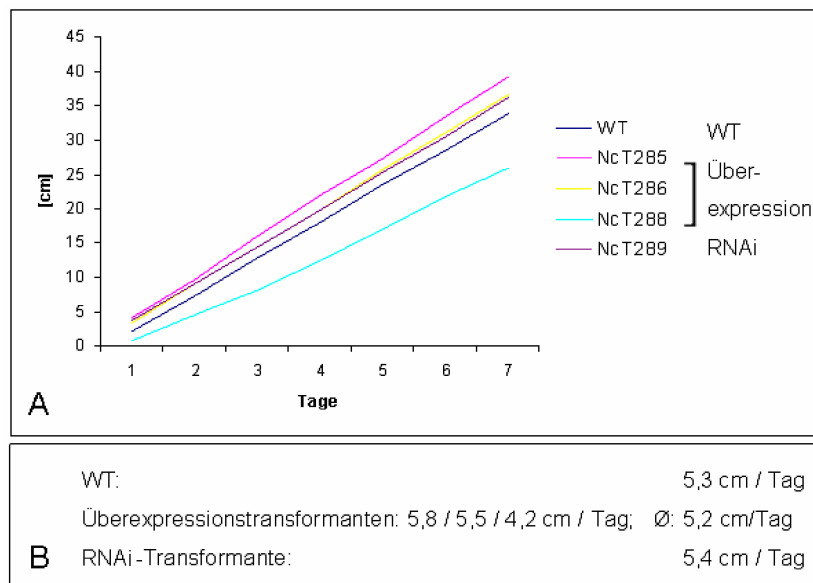


Abbildung 23: Vergleichende Analyse der Wachstumsgeschwindigkeit

A: Die Wachstumsstrecke des Wildtyps, der Überexpressions-Transformanten NcT285, NcT286 und NcT287 sowie der RNAi-Transformante NcT289, dargestellt als Funktion der Zeit

B: Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit pro Tag.

Es sind keine deutlichen Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den untersuchten Pilzstämmen zu beobachten.

3.3.3 Ascosporenentwicklung

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, findet bei *Neurospora crassa* die Entwicklung von jeweils acht Ascosporen in einem Keimschlauch, dem sogenannten Ascus, statt. Die Asci finden sich dabei in größerer Menge eingeschlossen in Fruchtkörpern, den Perithezien. Um einen möglichen Einfluss von *bem46* auf die Entwicklung der Ascosporen zu untersuchen, wurden Kreuzungen mit den *bem46*-RNAi- bzw. *bem46*-Überexpressions-Transformanten durchgeführt. Die resultierenden Ascosporen wurden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht. Die Präparation für die mikroskopische Analyse wurde wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben durchgeführt. In der Abbildung 24 sind vergleichende Aufnahmen der Asci in verschiedenen Reifestadien am Beispiel der RNAi-Transformante NcT289, der Überexpressions-Transformante NcT288 sowie des Wildtyps FGSC#6103 gezeigt. Als Kreuzungspartner diente jeweils der WT-Stamm FGSC#9716. Die Kreuzungen der Transformanten zeigten im Vergleich zur Wildtyp-Kreuzung keine Unterschiede in Bezug auf Größe, Morphologie und Anzahl der Sporen pro Ascus.

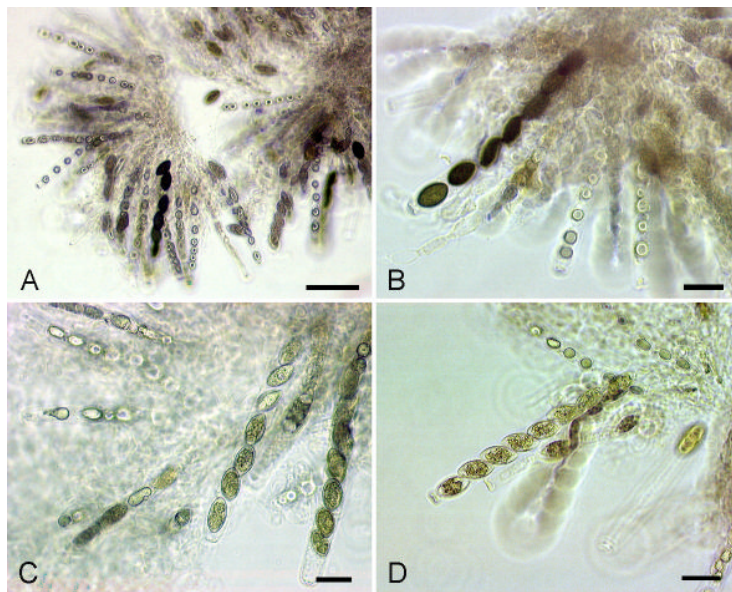


Abbildung 24: Vergleichende Aufnahmen von Asci in verschiedenen Reifestadien

A, B: WT-Kreuzung: FGSC#6103 x FGSC#9716, **C:** RNAi-Kreuzung NcT289 x FGSC#9716, **D:** Überexpressions-Kreuzung NcT288 x FGSC#9716

Zwischen den untersuchten Kreuzungen wurden keine Unterschiede in der Entwicklung der Ascosporen festgestellt. Die Balken in „A“ entsprechen 100 µm, in „B“, „C“, „D“ 25 µm.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss AuxioPhot-Mikroskop und einer SONY 3CCD-Digitalkamera durch ein Plan-Neofluor Objektiv der Vergrößerung 10x angefertigt.

3.3.4 Ascosporenkeimung

Um zu untersuchen, ob sich eine veränderte *bem46*-Transkriptmenge auf die Keimung der Ascosporen auswirkt, wurden die Sporen der in Abbildung 25 dargestellten Kreuzungen analysiert. Da alle Transformanten dem Paarungstyp „A“ angehörten, diente als jeweiliger Kreuzungspartner der untransformierte Stamm FGSC#9716 des Paarungstyps „a“. Dieser Stamm ist Histidin-auxotroph (*his⁻*). Die analysierten Transformanten fungierten in den Kreuzungen je einmal als maternales und einmal als paternales Elter (vgl. Kapitel 2.2.1.2). Als Referenz diente eine im Folgenden als „WT“ bezeichnete Kreuzung. Hier wurde der untransformierte Stamm FGSC#9716 mit der Transformante NcT179 gekreuzt. Diese Transformante trägt ein Transgen unter Kontrolle des *cfp*-Promotors (Silke Alves, persönliche Mitteilung), das keinen Einfluss auf die Ascosporenkeimung aufweist. Der entsprechende Vektor pAS479 findet sich im Anhang.

	Stamm für matern. Elter	PT	x	Stamm für patern. Elter	PT
WT-Kreuzung	NcT179	A	x	FGSC#9716 (<i>his⁻</i>)	a
RNAi- Kreuzungen	NcT289	A	x	FGSC#9716 (<i>his⁻</i>)	a
	FGSC#9716 (<i>his⁻</i>)	a	x	NcT289	A
Überexpressions- Kreuzungen	NcT285	A	x	FGSC#9716 (<i>his⁻</i>)	a
	FGSC#9716 (<i>his⁻</i>)	a	x	NcT288	A

Abbildung 25: Durchgeführte Kreuzungen für die Analyse der Ascosporenkeimung

PT= Paarungstyp

Die zu untersuchenden Ascosporen wurden auf Histidin-freiem Medium wie in Kapitel 2.2.4.4 für die Analyse der Keimungsrate präpariert. Nur bei transgenen, und somit Histidin-prototrophen Ascosporen wurde ein vollständiges Auswachsen erwartet. Da *his*-Marker und Transgen sehr eng gekoppelt sind, sollten diese fast immer gekoppelt vererbt werden. Des Weiteren wurden die Analysen zusätzlich auf Ethanol-haltigem Medium durchgeführt, da hier die Aktivität des in dem Überexpressions- und RNAi-Konstrukt verwendeten *cfp*-Promotors geringer ist (Temporini *et al.*, 2004).

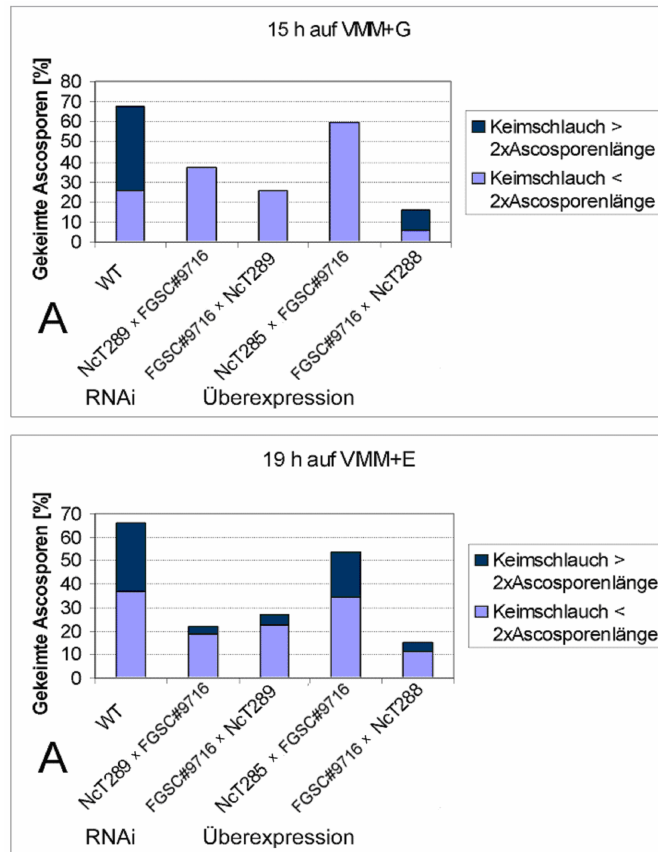


Abbildung 26: Vergleichende grafische Darstellung der Ascosporen-Auskeimungsrate und -Keimschlauchlänge

WT-Kreuzung: NcT179 x FGSC#9716, RNAi-Kreuzungen: NcT289 x FGSC#9716, FGSC#9716 x NcT289, Überexpressions-Kreuzungen: NcT285 x FGSC#9716, FGSC#9716 x NcT288. An erster Stelle ist immer der als maternales Elter verwendete Pilz angegeben. Der Stamm FGSC#9716 ist Histidin-auxotroph, die Keimung der Ascosporen fand auf Histidin-freiem Medium statt.

A: Auswertung nach 15 Stunden Inkubation bei 25°C und Licht auf VMM+Glucose-Medium

B: Auswertung nach 19 Stunden Inkubation bei 25°C und Licht auf VMM+Ethanol-Medium

Die Anzahl der ausgewerteten Sporen betrug bei den WT- und RNAi-Kreuzungen zwischen 140 und 200, bei den Überexpressions-Kreuzungen zwischen 60 und 110.

Die Abbildung 26 stellt die prozentuale Keimungsrate von Ascosporen und deren Keimschlauchlänge auf den Medien VMM+Glucose sowie VMM+Ethanol dar. Die zeitliche Differenz in der Auswertung zwischen den unterschiedlichen Nährmedien resultierte aus dem verminderten Wachstum des Pilzes auf alkoholhaltigem Medium.

Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, wurde neben einer Auswertung der Gesamt-Keimungsrate auch die Keimschlauchlänge erfasst. Hier diente die zweifache

Ascosporenlänge als Schwellenwert. Dieser Schwellenwert orientierte sich an Keimungsanalysen von Ascosporen mit dem deaktiviertem *bem46*-Gen, bei denen das Wachstum direkt nach der Auskeimung eingestellt wurde (Hentschel, 2002). Auf dem VMM+G-Medium fanden sich neben Unterschieden in der Gesamt-Keimungsrate deutliche Unterschiede in der Keimschlauchlänge zwischen den verschiedenen Kreuzungen. So betrug nach 15 Stunden Keimung der Anteil derjenigen Sporen, deren Keimschlauchlänge den Schwellenwert überschritt, bei dem Wildtyp 41 %, bei den RNAi-Kreuzungen 0 %, und bei den Überexpressions-Kreuzungen 0 % bzw. 10 %. Wie dem Teil „B“ der Abbildung 26 zu entnehmen ist, wurden auf dem VMM+Ethanol-Medium die oben genannten Effekte nicht bzw. nicht vollständig aufgehoben. Eine statistische Auswertung zu einem späteren Zeitpunkt der Auskeimung erwies sich als schwierig, da die Sporen der Wildtyp-Kreuzung so weit ausgewachsen waren, dass sich eine Auszählung als nicht durchführbar erwies. Daher sind in der Abbildung 27 Petrischalen gezeigt, auf denen je 200 ausgebrachte Ascosporen der in Abbildung 25 gezeigten Kreuzungen für 40 Stunden bei 25 °C und Licht inkubiert wurden. Auf den Petrischalen mit Ascosporen der WT-Kreuzung kam es zu deutlichem Myzelwachstum, während kein sichtbares Myzelwachstum auf den Petrischalen mit Sporen der *bem46*-RNAi- und der -Überexpressions-Kreuzungen zu sehen war.

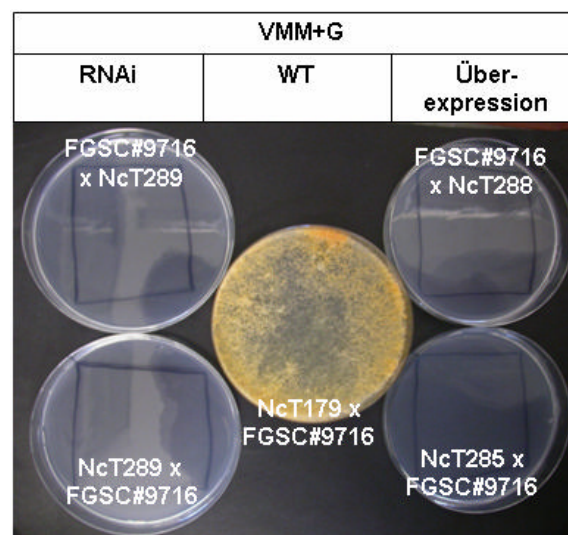


Abbildung 27: Vergleich der Ascosporenkeimung von Wildtyp-, RNAi und Überexpressions-Kreuzungen

Je Petrischale wurden 200 Ascosporen ausgebracht und für 40 Stunden bei 25°C und Dauerlicht inkubiert. Der als jeweiliger Kreuzungspartner eingesetzte untransformierte Stamm FGSC#9716 ist Histidin-auxotroph, die Keimung fand auf Histidin-freiem Medium statt. Auf der Platte der WT-Kreuzung findet sich im Gegensatz zu denen der *bem46*-RNAi- und *bem46*-Überexpressions-Kreuzungen deutliches Myzelwachstum

3.3.5 Morphologie ausgekeimter Ascosporen

Die Präparation der ausgekeimten Ascosporen für die Lichtmikroskopie wurde wie in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben durchgeführt. Die in Abbildung 28 gezeigten Aufnahmen ausgekeimter Ascosporen entstanden, soweit nicht anders angegeben, nach 40 Stunden Inkubation bei 25 °C und Licht auf VMM+G-Medium. Bei allen untersuchten ausgekeimten Sporen der RNAi- sowie der Überexpressions-Kreuzungen war es zur Einstellung des Wachstums gekommen. Die Hyphenspitzen der ausgekeimten Ascosporen wirkten häufig blasenförmig verdickt (in der Abbildung 28 mit Pfeilen gekennzeichnet). Da nach 40 Stunden Inkubation aufgrund der Dichte des Myzels auf den Platten der Wildtyp-Kreuzungen ein Fotografieren einzelner Sporen nicht möglich war, ist als Vergleich die ausgekeimte Ascospore einer Wildtypkreuzung nach 17 Stunden gezeigt (Abbildung 28 G).

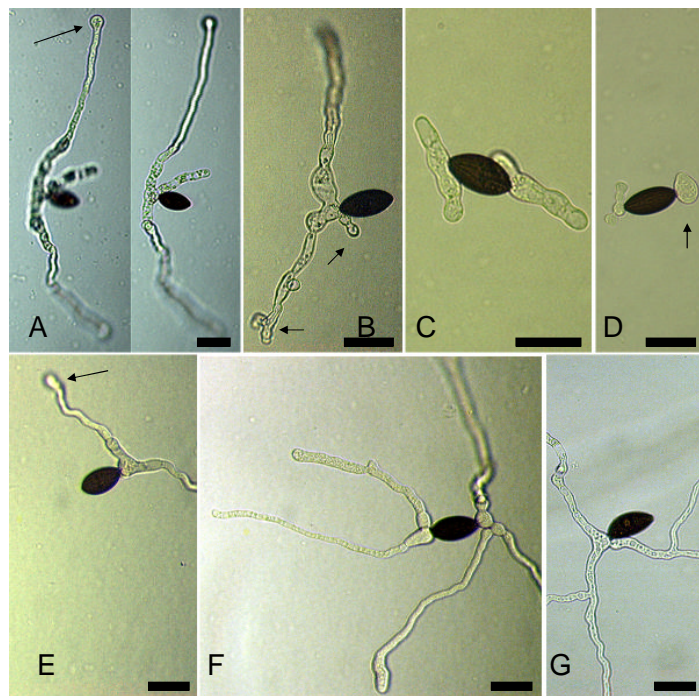


Abbildung 28: Vergleichende Morphologie gekeimter Ascosporen nach 40h

A-C: RNAi-Kreuzung: NcT289 x FGSC#9716, **D-F:** Überexpressions-Kreuzung: D: NcT285 x FGSC#9716, E-F: FGSC#9716 x NcT288, **G:** WT-Kreuzung: NcT179 x FGSC#9716 nach 17 Stunden. Der als Kreuzungspartner eingesetzte untransformierte Stamm FGSC#9716 ist Histidin-auxotroph, die Keimung fand auf Histidin-freiem VMM+G-Medium bei 25°C und Licht statt. Bei allen ausgekeimten Ascosporen der *bem46*-RNAi- und *bem46*-Überexpressions-Kreuzungen hatte im Gegensatz zu der WT-Kreuzung ein Wachstumsstopp stattgefunden. Pfeile markieren das blasige Wachstum im Bereich der Hyphenspitzen.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss AuxioPhot-Mikroskop und einer SONY 3CCD-Digitalkamera durch ein Plan-Neofluor Objektiv der Vergrößerung 10x angefertigt. Ein Balken entspricht 25 µm.

3.4 BEM46::eGFP-Fusion und Lokalisation

Um die Expression und Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, kann man sich des grün fluoreszierenden Proteins GFP bedienen, welches in Kapitel 1.4.3 näher beschrieben ist. Auch in *Neurospora crassa* wurden GFP-Fusionskonstrukte erfolgreich in subzellulären Strukturen lebender Zellen lokalisiert (Fuchs *et al.*, 2002; Freitag *et al.*, 2004).

Um die Expression und Lokalisation des BEM46-Proteins in *Neurospora crassa* studieren zu können, wurden in dieser Arbeit *bem46::egfp*-Fusionskonstrukte erstellt und verwendet.

3.4.1 Klonierung eines *bem46::egfp*-Fusionskonstruktes

Die Konstruktion eines *bem46::egfp*-Fusionsvektors für die Expression in *N. crassa* folgte entsprechend den Arbeiten von Freitag *et al.* (2004). Dazu wurde der offene Leserahmen des *egfp*s stromabwärts dem offenen Leserahmen des *bem46*-Gens kloniert. Es entstand ein fusionierter Leserahmen. Bei einer Expression entsteht ein BEM46-Protein, dessen C-terminales Ende mit dem eGFP-Protein fusioniert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene *bem46::egfp*-Fusionskonstrukte erstellt, pMM531 und pMM536 (siehe Anhang). Im Falle des Vektors pMM531 wurde der native *bem46*-Promotor verwendet, der Fusionsvektor pMM536 verfügt über den starken *ccg1*-Promotor (McNally *et al.*, 1988). Die Klonierungsstrategie zur Erstellung eines *bem46::egfp*-Fusionsvektors ist in der Abbildung 30 am Beispiel des Vektors pMM536 gezeigt. Hierfür wurde zunächst das 1357 bp große *bem46*-Fragment mit den Oligonukleotiden FK832

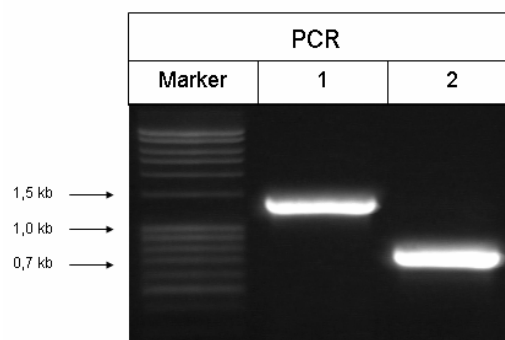


Abbildung 29: PCR-Amplifikate für die Erstellung des *bem46::egfp*-Konstruktes pMM536

Spur 1 zeigt das *bem46*-Fragment mit einer Größe von 1357 bp, Spur 2 das *egfp*-Fragment mit einer Größe von 734 bp. Als Größenstandard diente ein 100-5000 bp Größenstandard (MBBL, Bielefeld).

und FK430 und das 734 bp große *egfp*-Fragment mit den Oligonukleotiden FK431 und FK652 amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Fragmente sind in Abbildung 29 gezeigt. Anschließend wurden die beiden Amplifikate jeweils in den mit *Sma*I hydrolysierten Klonierungsvektor pBluescript II/SK+ (Short *et al.*, 1988) inseriert. Daraus resultierten die Vektoren pMM535 und pMM534 (siehe Anhang), deren inserierte Fragmente mittels Sequenzierung überprüft wurden.

Für die Erstellung des Fusionsvektors pMM536 wurden die Vektoren pMM535, pMM534 sowie der als Basis dienende Expressionsvektor pNW521 (Nancy Weiland, persönliche Mitteilung) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und das *bem46*-Fragment zusammen mit dem *egfp*-Fragment in den Expressionsvektor integriert. Der Expressionsvektor pNW521 verfügt über den *ccg1*-Promotor (McNally *et al.*, 1988). Die Überprüfung des *bem46::egfp*-

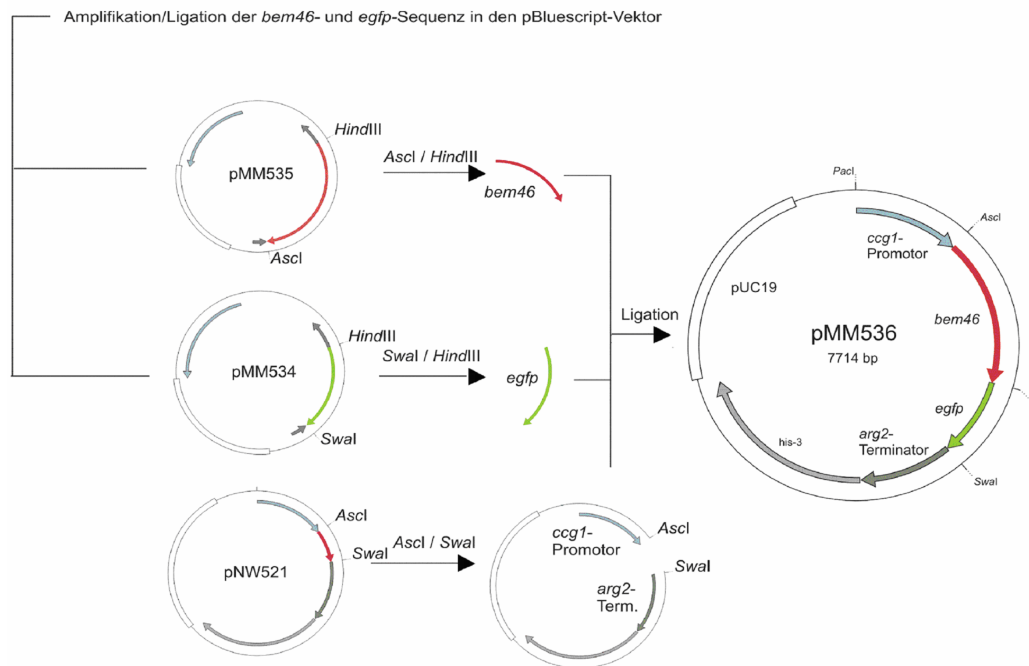


Abbildung 30: Klonierungsstrategie zur Erstellung des *bem46::egfp*-Fusionskonstruktes pMM536

Mit Hilfe der Oligonukleotide FK832 und FK430 wurde der *bem46*-ORF ohne Stopp-Kodon und mit Hilfe der Oligonukleotide FK651 und FK652 wurde der *egfp*-ORF ohne Start-Kodon amplifiziert und jeweils in den mit *Sma*I hydrolysierten Klonierungsvektor pBluescript II/SK+ inseriert. Es resultierten die oben gezeigten Vektoren pMM535 und pMM534. Als Expressionsvektor-Basis diente der Vektor pNW521. Nach der Hydrolyse der drei Vektoren mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen und anschließender Ligation der drei Fragmente entstand der Vektor pMM536, welcher die *bem46::egfp*- Fusionskassette unter Kontrolle des *ccg1*-Promotors trägt.

Fusionsvektors pMM536 erfolgte über eine Hydrolyse der Vektor-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI*, *HindIII* und *EcoRI*. In Abbildung 31 sind die entsprechenden DNA-Fragmente dargestellt, deren Größen den erwarteten Fragmentgrößen entsprechen.

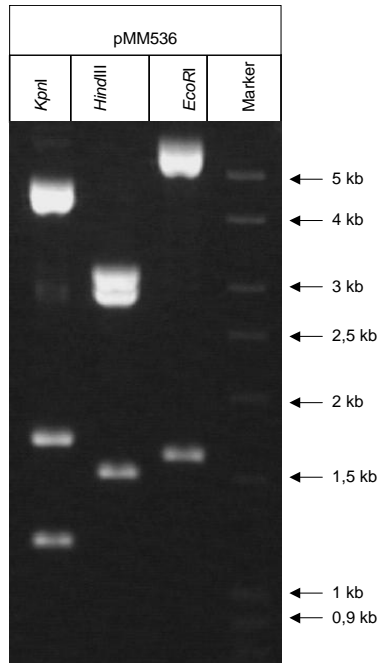


Abbildung 31: Hydrolyse des Vektors pMM536 mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI*, *HindIII*, und *EcoRI*

Nach der Hydrolyse der Vektor-DNA von pMM536 mit *KpnI* wurden Banden der Größe von 4723 bp, 1725 bp und 1205 bp, bei der Hydrolyse mit *HindIII* Banden der Größe von 3170 bp, 3011 bp und 1533 bp und bei der Hydrolyse mit *EcoRI* Banden der Größe von 6083 bp und 1631 bp erwartet. Die beobachteten Bandengrößen entsprechen den erwarteten Größen. Es wurde ein 100-5000 bp Größenstandard (MBBL, Bielefeld) verwendet.

3.4.2 Transformation und molekulare Charakterisierung

Die Transformation von *Neurospora crassa* mit den *bem46::egfp*-Fusionsvektoren pMM531 und pMM536 (siehe Anhang) wurde wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Der Vektor pMM531 trägt die *bem46::egfp*-Fusion unter der Kontrolle des nativen *bem46*-Promotors, der Vektor pMM536 verfügt über den weitaus stärkeren *ccg1*-Promotor. Zwanzig mittels Fluoreszenzmikroskopie untersuchte putative Transformanten des Vektors pMM531 zeigten keine sichtbare *egfp*-Expression. Aus diesem Grund konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen mit *bem46::egfp*-Konstrukten auf Arbeiten mit dem Vektor pMM536.

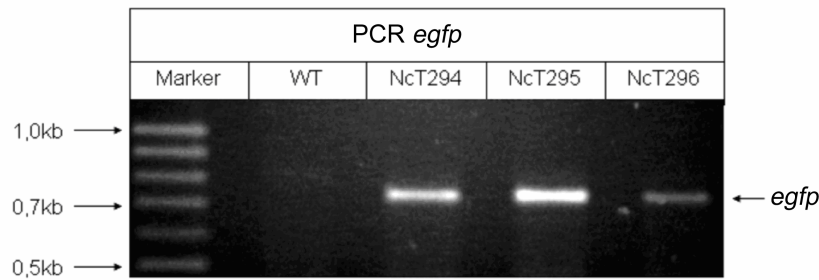


Abbildung 32: Nachweis des heterologen *egfp*-Gens mittels PCR

In den Spuren der drei Transformanten ist das *egfp*-Amplifikat der erwarteten Größe von 733 bp zu finden, welches in der Spur des Wildtyps fehlt.

Nach der Transformation mit dem Fusionsvektor pMM536 fand eine visuelle Vor-selektion möglicher Transformanten mittels Fluoreszenzmikroskop statt. Der Nachweis einer Integration des *egfp*-Gens in drei Transformanten erfolgte nach der in Kapitel 2.2.2.6 beschriebenen PCR mit DNA aus *N. crassa*-Konidien mit Hilfe der Oligonukleotide FK651 und FK652. Die amplifizierten DNA-Fragmente des *egfp*-Gens mit der Größe von 733 bp sind in Abbildung 32 gezeigt.

3.4.3 Lokalisation und Detektion des rekombinanten eGFP

Die Lokalisation der eGFP-Fluoreszenz in lebenden *N. crassa* Zellen erfolgte über mikroskopische Analysen. Alle in diesem Kapitel gezeigten Aufnahmen wurden, soweit nicht anders angegeben, wie unter 2.2.3.2 beschrieben angefertigt. Es wurden Makrokonidien, junge Hyphen, vegetatives Myzel und Ascosporen auf eGFP-Fluoreszenz untersucht.

3.4.3.1 Lokalisation von eGFP in Makrokonidien

Um die subzelluläre Zuordnung der eGFP-Fluoreszenz in Makrokonidien gewährleisten zu können, wurden die Proben zusätzlich, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, mit den Fluoreszenzfarbstoffen SynaptoRed und DAPI angefärbt. In Abbildung 33 sind Aufnahmen von Makrokonidien der Transformante NcT294 gezeigt, die den *bem46::egfp*-Vektor pMM536 trägt. Hierbei ist unter „A“ und „F“ die eGFP-Fluoreszenz, unter „B“ die Fluoreszenz der mit Hilfe von DAPI gefärbten Zellkerne und unter „C“ die Fluoreszenz der mit SynaptoRed gefärbten Plasmamembran zu sehen. Unter „D“ findet sich eine Überlagerung der Bilder „A“- „C“. Unter „E“ ist das berechnete Hellfeldbild gezeigt. Man erkennt, dass sich die eGFP-Fluoreszenz deutlich in dem Bereich direkt um die Zellkerne sowie punktförmig in räumlicher Nähe zur Plasmamembran konzentriert.

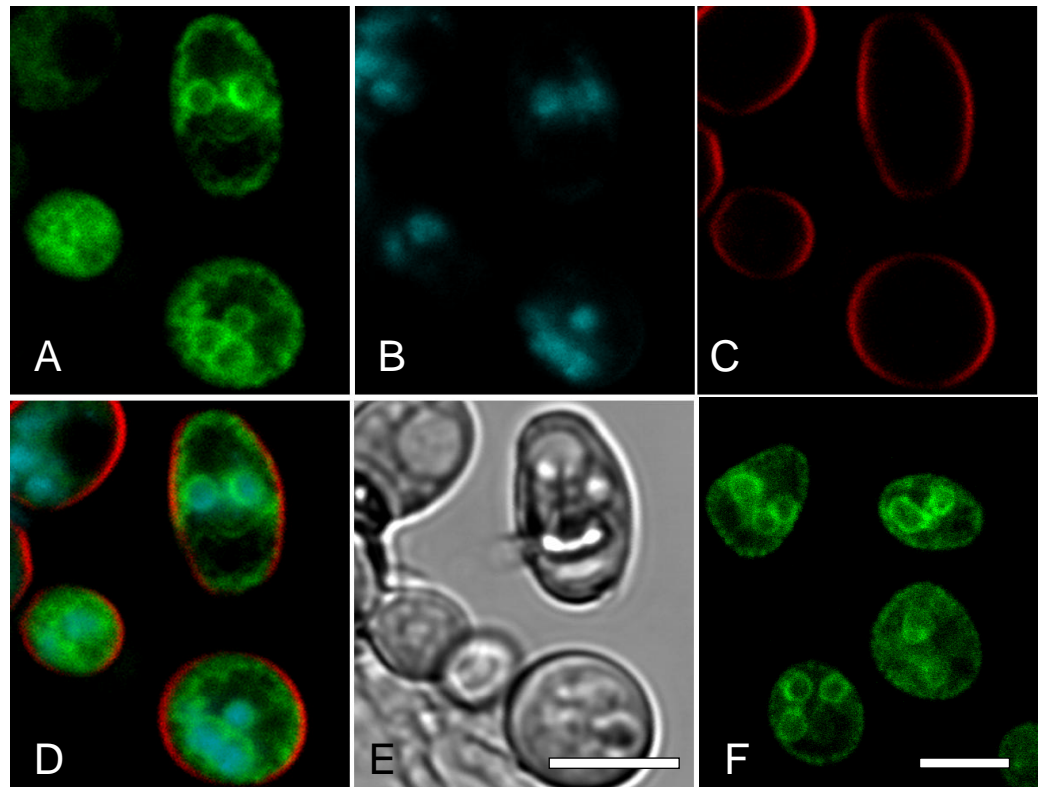


Abbildung 33: *bem46::egfp*-exprimierende Makrosporen der Transformante NcT294

A,F: eGFP-Fluoreszenz, **B:** DAPI-Färbung der Zellkerne, **C:** SynptoRed-Färbung der Plasmamembran, **D:** Übereinanderlagerung von „A“, „B“ und „C“, **E:** berechnetes Hellfeld.

Es findet sich eine Akkumulation der eGFP-Fluoreszenz um die Zellkerne und in räumlicher Nähe zur Plasmamembran.

Die Balken entsprechen 10 µm.

3.4.3.2 Lokalisation von eGFP in frühen Keimungsstadien der Makrokonidien

Die im Folgenden gezeigten Makrokonidien wurden nach 5 Stunden Keimung bei 25 °C und Licht auf eGFP-Fluoreszenz untersucht (siehe Kapitel 2.2.3.2). Die Abbildung 34 zeigt die eGFP-Fluoreszenz von Makrokonidien der Transformante NcT296 in frühen Keimungsstadien. Unter „A“ sind mehrere Makrokonidien mit kurzen Keimschläuchen zu sehen. „B“ zeigt die Spitzenregion einer jungen Hyphe. In „C“ sieht man eine Konidie mit einem auswachsenden Keimschlauch. In allen drei Aufnahmen erkennt man, wie schon bei den Makrokonidien gezeigt (vgl. Kapitel 3.4.3.1), eine deutliche Akkumulation der Fluoreszenz um die Zellkerne. Weiterhin zeigt die Hyphenspitzenregion in Aufnahme „B“ eine verstärkte Fluoreszenz in peripheren Bereichen.

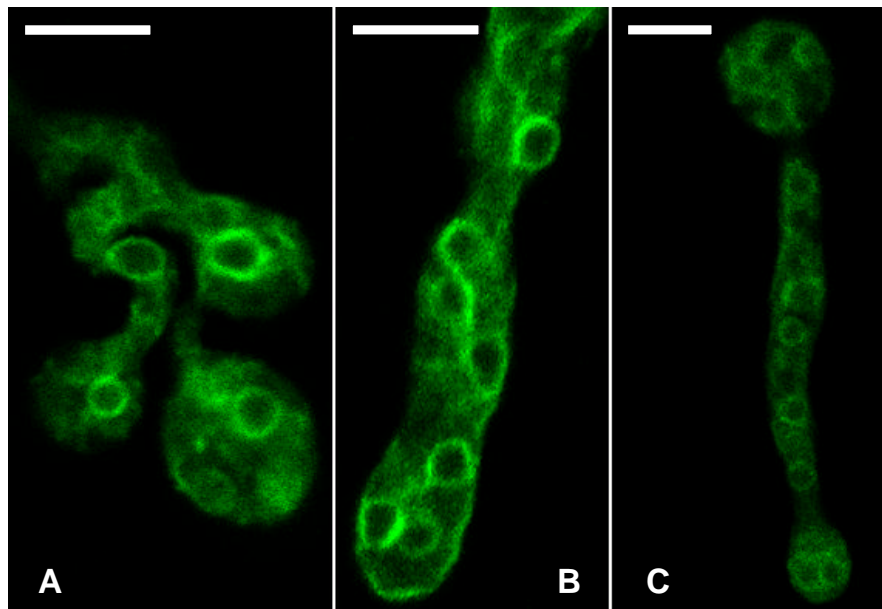


Abbildung 34: Frühe Stadien in der Auskeimung *bem46::egfp*-exprimierender Makrosporen der Transformante NcT296

A: mehrere Makrokonidien mit kurzen Keimschläuchen, **B:** Spitzenregion einer jungen Hyphe, **C:** Konidie mit auswachsendem Keimschlauch.

Die eGFP-Fluoreszenz konzentriert sich um die Zellkerne und, wie unter „B“ zu sehen, in den peripheren Bereichen der Hyphenspitzenregion.

Ein Balken entspricht 10 µm.

3.4.3.3 Lokalisation im vegetativen Myzel

Die Anzucht der Pilze für die folgenden Aufnahmen wurde, wie unter 2.3.3.2 beschrieben, durchgeführt. Die Abbildung 35 zeigt Aufnahmen des vegetativen Myzels der Transformante NcT294. Hierbei ist unter „A“ die eGFP-Fluoreszenz und unter „B“ die Fluoreszenz der mit SynptoRed gefärbten Plasmamembran zu sehen. Unter „C“ findet sich eine Überlagerung dieser Bilder und unter „D“ ist das berechnete Hellfeld abgebildet. Man erkennt eine deutliche granuläre eGFP-Fluoreszenz innerhalb der Hyphen. Ringförmige Akkumulationen der Fluoreszenz sind mit „R“ gekennzeichnet. Bei größeren nicht fluoreszierenden Bereichen (mit „V“ gekennzeichnet) handelt es sich vermutlich um Vakuolen.

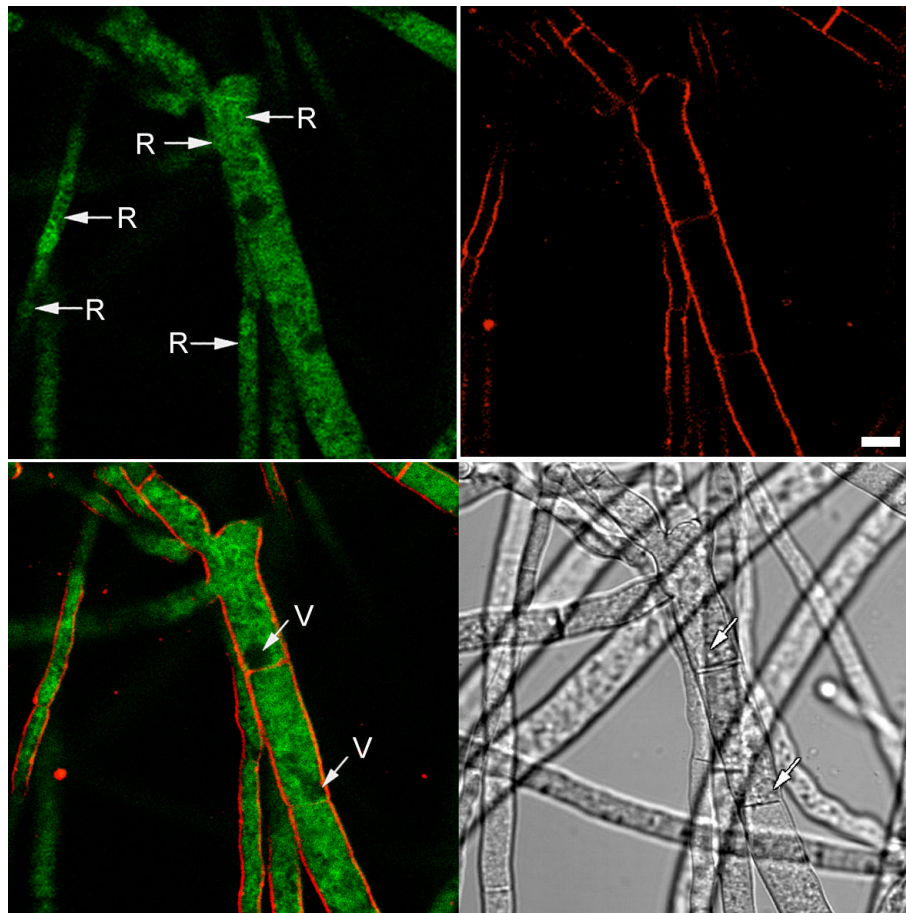


Abbildung 35: *bem46::egfp*-exprimierenden Hyphen der Transformante NcT294

A: eGFP-Fluoreszenz, **B:** SynptoRed-Färbung der Plasmamembran, **C:** Übereinanderlagerung von „A“ und „B“, **D:** berechnetes Hellfeld.

Es findet sich eine über das gesamte Zytoplasma ausgedehnte granuläre Fluoreszenz mit ringförmigen Akkumulationen. V = Vakuolen, R = ringförmige Konzentrationen der Fluoreszenz. Ein Balken entspricht 10 µm.

3.4.3.4 Lokalisation von eGFP in Ascosporen

Für die im Folgenden gezeigten Ascosporen wurden die Perithezien wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben isoliert und präpariert. Die Fluoreszenzanalyse der Aufnahmen „A“ und „B“ erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (vgl. Kapitel 2.2.3.1) unter Verwendung des Fluoreszenzfilters 450-490 HB. Die Aufnahmen „C“-„E“ wurden, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, am Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. In Abbildung 36 ist die eGFP-Fluoreszenz mehrerer Ascosporen der Transformante NcT295 dargestellt. Man sieht eine deutliche eGFP-Fluoreszenz, wobei diese bei der am Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop entstandenen Aufnahme eine granuläre Struktur aufweist. Wie in Abbildung 36 E zu sehen ist, sind erneut ringförmige Akkumulationen der Fluoreszenz auszumachen, die mit Pfeilen gekennzeichnet sind.

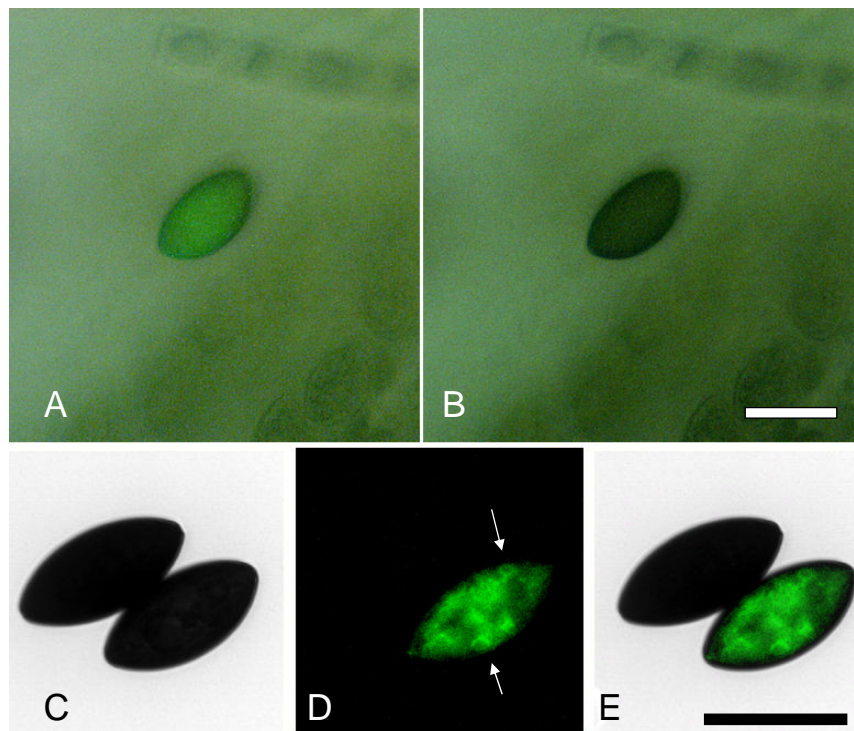


Abbildung 36: *bem46::egfp*-exprimierende Ascosporen der Transformante NcT295

A: Ascospore im Hellfeldbild mit überlagerter eGFP-Fluoreszenz, **B:** Ascospore im Hellfeldbild, **C:** Zwei Ascosporen im berechneten Hellfeld, **D:** eGFP-Fluoreszenz, vermutlich transgene neben WT-Spore, **E:** Übereinanderlagerung von „C“ und „D“

Die Aufnahmen „A“-„B“ entstanden mit Hilfe eines Zeiss AuxioPhot-Mikroskops und einer SONY 3CCD-Digitalkamera durch ein Plan-Neofluor Objektiv der Vergrößerung 10x. Die Aufnahmen „C“-„D“ wurden mittels Konfokalem-Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP1 der Firma Leica mit dem Leica HC Apo-Objektiv der Vergrößerung 10x angefertigt. Die Balken entsprechen 25 µm.

4. Diskussion

Der Modellorganismus *Neurospora crassa* stellt derzeit den am intensivsten studierten filamentösen Schimmelpilz dar (Braun *et al.*, 2004). Die Verfügbarkeit seiner Genomsequenz erleichtert die Erforschung und Charakterisierung von Genen mit noch unbekannter Funktion (Galagan *et al.*, 2003; Braun *et al.*, 2004). Gut studierte Modellorganismen, wie z.B. *N. crassa*, bieten über die Aufklärung einzelner Genfunktionen zunehmend die Möglichkeit, auch übergeordnete regulatorische Netzwerke zu verstehen (Banerjee *et al.*, 2002). Aus diesem Grund befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung eines Gens mit noch unzulänglich geklärter Funktion in *Neurospora crassa*, dem *bem46*-Gen. Es wurden Hinweise auf die Funktion von *bem46* in *N. crassa* erlangt, indem das Transkriptniveau dieses Gens verändert und die entsprechenden Transformanten analysiert wurden. Die subzelluläre Lokalisation von BEM46 wurde über eine Fusion mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) ermittelt.

4.1 Änderung des *bem46*-Expressionsniveaus in *Neurospora crassa*

Eine gebräuchliche Methode, Informationen über ein Gen zu erlangen, besteht darin, die Expressionsstärke dieses Gens zu verändern (Weld *et al.*, 2006). Es gibt die Möglichkeiten einer Überexpression, einer Verminderung der Expression und einer kompletten Inaktivierung dieses Gens (Bruce *et al.*, 2002).

Erste Hinweise über mögliche Funktionen von *bem46* in *Neurospora crassa* wurden von Hentschel (2002) durch eine Inaktivierung dieses Gens erlangt. Die Inaktivierung erfolgte mit Hilfe des „Repeat-Induced Point Mutation“ (RIP)-Mechanismus. Bei dem RIP-Mechanismus handelt es sich um eine Inaktivierung von repetitiven Sequenzen, die während der Meiose von *N. crassa* erfolgt (Foss *et al.*, 1991). Über das Einbringen einer zweiten Kopie des *bem46*-Gens in das Genom von *N. crassa* konnten so durch anschließende Kreuzung Ascosporen erhalten werden, deren *bem46*-Gen durch den RIP-Mechanismus inaktiviert wurde. Eine Analyse dieser Sporen erbrachte eine stark reduzierte Keimungsrate (Hentschel, 2002). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle von *bem46* in der Keimung der Ascosporen oder generell auf eine essentielle Funktion dieses Gens hin (Kempken, persönliche Mitteilung). Essentielle Gene zeichnen sich

dadurch aus, dass ihr Verlust das Überleben oder jegliche Form der Reproduktion des Organismus verhindert (Riddle *et al.*, 1997).

Da durch die Inaktivierung also keine näheren Aussagen über die Funktion von *bem46* getroffen werden konnten, wurden in dieser Arbeit Studien mit *N. crassa* Transformanten durchgeführt, die ein erhöhtes bzw. vermindertes *bem46*-Expressionsniveau zeigen.

4.1.1 Destabilisierung des *bem46*-Transkripts

Für die Verminderung der Expressionsstärke von *bem46* wurde in dieser Arbeit die RNAi-Technik verwendet (vgl. Kapitel 1.4.1). Der Vorteil dieser Methode gegenüber einer Inaktivierung von Genen liegt darin, dass eine kontrollierte Verminderung der Expression eines Gens auf RNA-Ebene möglich ist. Auf diese Weise können auch essentielle Gene in ihrer Funktion analysiert werden (Nakayshiki *et al.*, 2005).

Die RNAi-Methode wurde bisher in verschiedenen filamentösen Pilzen, einschließlich *Neurospora crassa*, erfolgreich angewandt (Weld *et al.*, 2006). Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, werden für die Erstellung eines funktionsfähigen RNAi-Konstruktes Sequenzen des Zielgens in invers repetitiver Anordnung in einen Expressionsvektor kloniert. Die von diesem Vektor abgelesene mRNA kann sich so zu einer Stammschlaufenstruktur falten, in der die repetitiven Sequenzen einen RNA-Doppelstrang bilden (Hannon, 2002). Bezüglich des RNA-Doppelstrangs erwiesen sich dabei in filamentösen Pilzen Längen von 500 bp bis 900 bp als effizient (Mouyna *et al.* 2004, Goldoni *et al.*, 2004). RNAi-Vektoren mit repetitiven Bereichen von 200 nt zeigten hingegen eine deutlich verminderte Effizienz in der Degradation des Zieltranskripts (Goldoni *et al.*, 2004). Letzteres ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass dsRNA mit weniger als 300 bp nur ineffizient von wichtigen Enzymen des RNA-silencing-Prozesses erkannt wird (Bernstein *et al.*, 2001). Eine Steigerung der Effektivität in der Gen-Unterdrückung erzielte Goldoni *et al.* (2004) in *N. crassa*, indem in der Schlaufenregion der RNAi-Transkripte ein spleißbares Intron von 100 nt verwendet wurde. Dieser Zusammenhang zwischen Spleißvorgängen und RNA-Interferenz wurde erstmals von Smith *et al.* (2000) in Pflanzen nachgewiesen.

Abgeleitet aus diesen Ergebnissen schien das Intron-2 aus *bem46* (siehe Abbildung 3) mit einer Größe von 70 Nukleotiden für die Schlaufenregion des *bem46*-RNAi-Transkripts geeignet zu sein. Als Sequenz für die Ausbildung des gewünschten RNA-Doppelstrangs bot sich ein 596 bp-Fragment aus dem anschlie-

ßenden Exon-3 an. Diese Fragmente aus *bem46* dienen als Basis für den *bem46*-RNAi-Anteil der in dieser Arbeit erstellten RNAi-Vektoren.

Für die RNAi-Konstrukte dieser Arbeit wurden die regulierbaren Promotoren *acu-5* und *cfp* gewählt. Der in dem *bem46*-RNAi-Vektor pMM510 verwendete *acu-5*-Promotor lässt sich durch Zugabe von Acetat induzieren (Collins *et al.*, 1991), wohingegen der in dem Vektor pMM532 verwendete *cfp*-Promotor nach der Zugabe von Ethanol eine stark reduzierte Aktivität zeigt (Temporini *et al.*, 2004). Die Verwendung regulierbarer Promotoren in RNAi-Konstrukten bietet eine Möglichkeit, die entsprechende Transkriptmenge nach gezielter Induktion zu vermindern (Matthew, 2004). Dies kann die Analyse essentieller Gene erleichtern, zu denen, nach den Arbeiten von Hentschel (2002), möglicherweise auch das *bem46*-Gen gehört.

Obwohl die Transformation von *Neurospora crassa* mit den *bem46*-RNAi-Vektoren pMM510 und pMM532 unter reprimierenden Bedingungen durchgeführt wurde, fiel die Transformationsrate unerwartet niedrig aus. So wurde nur in einer von 42 untersuchten putativen Transformanten eine Expression des Transgens nachgewiesen. Es ist nicht ungewöhnlich, dass die Effizienz der Transformation in Abhängigkeit zu verschiedenen Faktoren variiert, doch liegt die Ausbeute an Transformanten in der Regel deutlich höher (Margolin *et al.*, 1997). Es ist daher nicht auszuschließen, dass *bem46* in *N. crassa* eine Rolle in der Auskeimung der Makrokonidien spielt. So könnte sich selbst eine geringe Expression des *bem46*-RNAi-Konstrukts negativ auf die Auskeimung der Makrokonidien ausgewirkt haben. Ein Hinweis darauf könnte sein, dass eine erfolgreiche Transformation mit dem Vektor pMM532, jedoch nicht mit dem Vektor pMM510 gelang. So zeigt der in dem Vektor pMM532 verwendete *cfp*-Promotor unter reprimierenden Bedingungen keine mittels Northern-Blot-Analysen nachweisbare Aktivität (Temporini *et al.*, 2004), wohingegen der in dem Vektor pMM510 verwendete *acu-5* Promotor (Collins *et al.*, 1991) unter reprimierenden Bedingungen eine schwache Aktivität zeigt (Alves, persönliche Mitteilung). In dieser effektiveren Repression des *cfp*-Promotors könnte begründet liegen, dass die Transformation mit dem *bem46*-RNAi-Vektor pMM532 Erfolg zeigte. Da die Selektion positiver Transformanten jedoch auf auskeimende Konidien erfolgt, sind folglich Transformanten mit beeinträchtigter Konidienkeimung auf diesem Wege schwierig zu isolieren und zu charakterisieren.

Eine erfolgreiche und starke Expression des *bem46*-RNAi-Konstruktes pMM532 wurde in der Transformante NcT289 mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen gezeigt

(vgl. Kapitel 3.1.3). Die damit verbundene große Menge an dsRNA ist entscheidend für ein effizientes RNA-silencing in *N. crassa* (Forrest *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden Abbauprodukte dieses RNAi-Transkripts nachgewiesen, was für den erfolgreichen Abbau der dsRNA in siRNA-Fragmente spricht, gemäß dem in Kapitel 1.4.1 vorgestellten RNA-silencing Mechanismus von *N. crassa* (Nakayashiki, 2005). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von RT-PCR-Analysen gezeigt, dass die Transformante NcT289 im Gegensatz zum Wildtyp kein nachweisbares *bem46*-Transkript zeigt. Die RNAi-induzierte Transkript-Degradation scheint also trotz der geringen Expression von *bem46* (Weiland, 2005) effektiv zu funktionieren. Das stimmt mit den Studien von Goldoni *et al.* (2004) überein, in denen ebenfalls ein effizienter Abbau eines schwach exprimierten Transkripts durch Expression eines RNAi-Konstruktes in *N. crassa* nachgewiesen wurde. Sowohl in den Studien von Goldoni als auch bei RNAi-Studien an anderen filamentösen Pilzen konnte jedoch in der Regel noch Transkript des Zielgens nachgewiesen werden (Nakayashiki, 2005; Weld *et al.*, 2006). Aus diesem Grund ist trotz einer hohen Effizienz der *bem46*-Transkript-Degradation in der Transformante NcT289 nicht auszuschließen, dass eine geringe Expression des *bem46*-Gens stattfindet.

Somit zeigte die Transformante NcT289 eine effiziente Degradation des *bem46*-Transkripts. Daher war sie für die Verwendung in weiteren morphologischen Analysen dieser Arbeit geeignet, die Aufschluss über die Auswirkungen eines verminderten *bem46*-Transkriptniveaus auf *N. crassa* geben sollten.

4.1.2 Überexpression des *bem46*-Gens

Um weitere Aufschlüsse über die Funktion von *bem46* in *Neurospora crassa* zu erlangen, wurde das Gen im Rahmen dieser Arbeit in *N. crassa* mit Hilfe starker Promotoren exprimiert (vgl. Kapitel 1.4.2). Um die Stärke der Überexpression von *bem46* regulieren zu können, wurde für die Erstellung des *bem46*-Überexpressionvektors pMM529 der *cfp*-Promotor verwendet. Wie schon in Kapitel 4.1.1 beschrieben, lässt sich die Aktivität dieses Promotors nach Temporini *et al.* (2004) durch die Verwendung von Ethanol als Kohlenstoffquelle drastisch senken, wohingegen er eine starke Aktivität auf Ethanol-freiem Standardmedium zeigt.

Die in dieser Arbeit erstellten *N. crassa* Transformanten NcT284-NcT288, die das *bem46*-Überexpressions-Konstrukt pMM529 tragen, wurden mittels Northern-Hybridisierung auf deren *bem46*-Transkriptmenge untersucht (siehe Kapitel

3.2.3). Dabei zeigten alle analysierten Transformanten eine deutliche *bem46*-Expression, wohingegen im Wildtyp kein *bem46*-Transkript nachgewiesen werden konnte. Dies spricht für eine erfolgreiche Überexpression des *bem46*-Gens in den oben genannten Transformanten. Des Weiteren unterstützen diese Analysen die bisherigen Indizien bzgl. einer schwachen Expression des *bem46*-Gens im vegetativen Myzel des Wildtyps. So zeigte Weiland (2005), dass dieses Gen im Wildtyp-Myzel zwar exprimiert wird, diese Expression aber für Northern-Blot-Analysen zu gering ist. Aus diesem niedrigen nativen Expressionsniveau von *bem46* resultiert, dass sich die *bem46*-Transkriptmenge der Überexpressions-Stämme deutlich von der des Wildtyps unterscheidet. Somit waren die Transformanten NcT284-NcT288 dafür geeignet, die morphologischen Auswirkungen einer *bem46*-Überexpression auf den Organismus *N. crassa* zu studieren.

4.2 Die Expression von *egfp*-Fusionskonstrukten in *Neurospora crassa*

Wichtige Informationen für die Charakterisierung eines Proteins liefert seine zelluläre Lokalisation (Ding *et al.*, 2000). Eine weit verbreitete Möglichkeit Proteine in lebenden Zellen zu lokalisieren, besteht in deren Fusion mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP (siehe Kapitel 1.4.3). Dadurch können fluoreszierende Fusionsproteine gebildet werden, deren Lokalisation über mikroskopische Studien am lebenden Objekt ermittelt werden kann (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998). In *Neurospora crassa* wurde GFP erstmals von Freitag *et al.* (2001) in einer Stärke exprimiert, die eine Fluoreszenzanalyse lebender Zellen möglich machte. Dafür wurde das GFP-Derivat eGFP unter Kontrolle des heterologen *ToxA*-Promotors (Andrie *et al.*, 2005) zytoplasmatisch exprimiert. Eine erfolgreiche Visualisierung subzellulärer Strukturen in *N. crassa* wurden erstmals von Fuchs *et al.* (2002) beschrieben, wobei eGFP mit mitochondrialen Zielsequenzen fusioniert und exprimiert wurde. Ausführliche Studien mit eGFP-Fusionsproteinen in *N. crassa* wurden im Jahre 2004 von Freitag *et al.* veröffentlicht, in denen Kern- und Mikrotubuliorganisation in lebenden Zellen beobachtet wurden. Dabei fand der *ccg1*-Promotor (McNally *et al.*, 1988) Verwendung.

In dieser Arbeit wurde das *bem46*-Gen analog zu den Arbeiten von Freitag *et al.* (2004) mit dem *egfp*-Gen fusioniert und die Fluoreszenz der BEM46::eGFP-Fusionsproteine mit Hilfe mikroskopischer Methoden subzellulär lokalisiert.

4.2.1 Die Expression mittels nativem Promotor und die Überexpression von *bem46::egfp*

Die Verwendung des nativen Promotors bei GFP-Fusionsstudien bietet gegenüber einer Überexpression den Vorteil, dass eine Analyse der Expressionsstärke in Abhängigkeit zu verschiedenen Entwicklungsstadien und physiologischen Bedingungen möglich ist (Ding *et al.*, 2000). Ein möglicher Nachteil kann sein, dass dieser Promotor ein zu geringes Expressionsniveau für eine ausreichende Fluoreszenz in lebenden Zellen bewirkt. So wurden bisher verschiedene Promotoren und Fusionskonstrukte für die GFP-Expression in *Neurospora crassa* verwendet, ohne eine ausreichende Fluoreszenz zu bewirken (Freitag *et al.*, 2001). Die Überexpression des Fusionskonstruktes bietet hingegen die Möglichkeit, das Fusionsprotein unabhängig von der Expressionsstärke des untersuchten Gens zu lokalisieren. Dies ist besonders von Vorteil, wenn das untersuchte Protein ein geringes natürliches Expressionsniveau aufweist. Ein möglicher Nachteil der Überexpression eines Fusionskonstruktes kann darin bestehen, dass die starke Expression zu einer Fehllokalisierung der Fusionsproteine führt. Dies kann z.B. über die Bildung von Protein-Aggregaten erfolgen (Lisenbee *et al.*, 2003).

Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene *bem46::egfp*-Fusionvektoren, pMM531 und pMM536, erstellt. Der Vektor pMM531 verfügt über den nativen *bem46*-Promotor, der Vektor pMM536 über den *ccg1*-Promotor (McNally *et al.*, 1988). Der *ccg1*-Promotor wies in Studien von Freitag *et al.* (2004) eine hinreichend stabile und starke Expression für die Visualisierung von Fusionsproteinen in lebenden *N. crassa* Zellen auf.

Die mikroskopische Analyse von putativen Transformanten des Vektors pMM531, die *bem46::egfp* unter Kontrolle des nativen *bem46*-Promotors exprimierten, erbrachte keine sichtbare Fluoreszenz in den Hyphen und Konidien (siehe Kapitel 3.4.2). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Aktivität des *bem46*-Promotors unter Standard-Bedingungen für Fluoreszenzanalysen zu gering ist. Das stimmt mit den Northern-Blot-Analysen Weilands (2005) und denen dieser Arbeit überein, die auf eine sehr geringe Expression des *bem46*-Gens unter Standard-Bedingungen hinweisen.

Transformanten des Vektors pMM536 hingegen exprimierten die Fusionskassette mit Hilfe des *ccg1*-Promotors derart, dass eine visuelle Vorselektion der putativen Transformanten möglich war. Zur Verifizierung der erfolgreichen Transformation wurden *egfp*-Fragmente mittels PCR aus Konidien-DNA amplifiziert.

Um eine durch die Überexpression bedingte Fehllokalisation der BEM46::eGFP-Fusionsproteine auszuschließen, gibt es die Möglichkeit, Fusionsvektoren unter der Kontrolle des nativen Promotors zu verwenden, die das *egfp*-Gen in mehrfacher Kopienzahl tragen. So kann auch mit Hilfe eines schwachen nativen Promotors eine ausreichende Fluoreszenz für mikroskopische Studien erzielt werden (Genové *et al.*, 2005).

4.2.2 BEM46::eGFP ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert

Wie den in Kapitel 3.4.3 gezeigten Aufnahmen zu entnehmen ist, zeigte sich in allen analysierten Entwicklungsstadien der Transformanten mit dem *bem46::egfp*-Fusionskonstrukt pMM536 eine deutliche eGFP-Fluoreszenz. Diese akkumulierte in ringförmigen Strukturen mit einem Durchmesser von 2-3 μm . Mittels einer Fluoreszenzfärbung der DNA wurde gezeigt, dass sich diese Strukturen um die Zellkerne gruppieren. Des Weiteren wurde häufig eine verstärkte Fluoreszenz in peripheren Bereichen der Zellen festgestellt, die meist ungleichmäßig oder punktförmig konzentriert vorlag. Eine Färbung der Plasmamembran zeigte, dass diese periphere Fluoreszenz zwar in räumlicher Nähe zur Plasmamembran zu finden war, diese jedoch nicht einschloss. Die Membranen und Lumina der im Hellfeld zu erkennenden Vakuolen zeigten ebenso wie die Zellwände und Zellkerne keine Fluoreszenz. Im Bereich des Zytoplasmas hingegen fand sich eine granuläre Strukturierung der Fluoreszenz, die besonders ausgeprägt im vegetativen Myzel vorzufinden war.

Vergleiche der Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Studien deuten auf eine Lokalisation des BEM46-Proteins im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von *Neurospora crassa* hin. So zeigten Shatkin und Tatum (1959) anhand elektronenmikroskopischer Studien an *N. crassa* Myzel, dass das ER mit der Kernmembran in Verbindung steht. Es konzentriert sich in räumlicher Nähe zur Plasmamembran und besteht aus einem Netzwerk von Vesikeln und tubulären Strukturen. Auch in *N. crassa* Konidien wurde von Namboodiri (1966) gezeigt, dass das ER konzentriert um die Zellkerne vorliegt, und in Verbindung mit der äußeren Kernmembran steht. In wachsenden *Neurospora*-Hyphen fanden Bracker und Grove (1974) außerdem ein ausgedehntes ER im gesamten Zytoplasma, was mit der in dieser Arbeit ermittelten ausgedehnten Fluoreszenz im vegetativen Myzel übereinstimmt.

Fluoreszenzanalysen an Hefen, deren ER mit GFP markiert worden war, zeigen ebenfalls Übereinstimmungen mit den in dieser Arbeit entstandenen Aufnahmen

(Grimme *et al.*, 2004; Faulhammer *et al.*, 2005; Estrada de Martin *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2001; Fehrerbacher *et al.*, 2002). Auch in entsprechenden Studien an den filamentösen Pilzen *Aspergillus niger* und *Ustilago maydis* (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002) findet sich eine Fluoreszenzverteilung, die der in dieser Arbeit ermittelten Lokalisation von BEM46::eGFP entspricht. In Abbildung 37 sind Vergleiche zwischen Fluoreszenzaufnahmen letztgenannter Studien und denen dieser Arbeit gezeigt. Eine Überprüfung der ER-Lokalisation von BEM46::eGFP könnte durch Co-Lokalisationsstudien mit Hilfe eines ER-spezifischen Farbstoffs erfolgen.

Die experimentell ermittelte Lokalisation des BEM46-Proteins in *N. crassa* wurde mittels Computer-basierter Analysen der Proteinsequenz bestätigt: Am N-terminalen Ende von BEM46 wird ein Signalpeptid für den Transport in das ER durch das Programm TargetP vorhergesagt. Proteine, die ein Signalpeptid für den Transport in das ER tragen, müssen nicht dauerhaft im ER lokalisiert sein. In den meisten Fällen werden diese Proteine im ER modifiziert, anschließend in

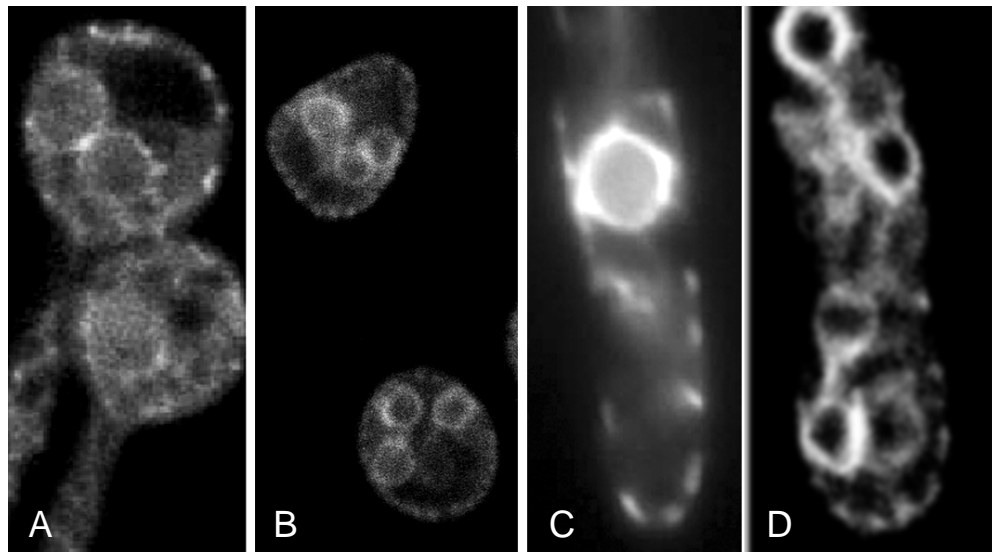


Abbildung 37: Vergleiche des GFP-markierten ERs von *Aspergillus nidulans* und *Ustilago maydis* mit der BEM46::eGFP-Fluoreszenz von *Neurospora crassa*

A: Keimende Konidien eines *Aspergillus nidulans* Stamms, der GFP mit ER-Zielsequenz und Retentionssignal exprimiert (Abbildung aus Fernández-Ábalos *et al.*, 1998); **B:** *bem46::egfp* exprimierende Makrokonidien der *N. crassa*-Transformante NcT294; **C:** Zelle eines *Ustilago maydis* Stamms, der ein ER-lokalisiertes GFP-Fusionsprotein exprimiert (Abbildung aus Wedlich-Söldner *et al.*, 2002); **D:** *bem46::egfp* exprimierende junge Hyphe der *N. crassa* Transformante NcT296.

andere Kompartimente transportiert oder sekretiert (Vitale *et al.*, 1993). Bei Proteinen, die dauerhaft im ER lokalisiert sind, findet eine ER-Retention statt. Dabei werden sie nicht in den Golgi-Apparat, sondern wieder zurück in das ER transportiert (Pimpl *et al.*, 2000). Bekannte Sequenzen, die diese Retention in das ER bewirken, bestehen in der Regel aus vier stark konservierten Aminosäuren. Beispiele sind die Sequenzen KDEL und HDEL (Denecke *et al.*, 1992). In der BEM46-Sequenz von *Neurospora crassa* findet sich keines der bekannten ER-Retentionssignale.

Gordon *et al.* (2000) zeigte an dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger* Unterschiede in der Fluoreszenzverteilung von sekretierten GFP-Fusionsproteinen und solchen, die mit einem ER-Retentionssignal versehen waren. In den Studien an Fusionsproteinen mit ER-Retentionssignal fand sich eine vergleichbare Fluoreszenzverteilung wie die der BEM46::eGFP-Fusionsproteine dieser Arbeit. Die Sekret-Fusionsproteine hingegen zeigten eine Fluoreszenzverteilung, die sich deutlich von der Lokalisation der BEM46::eGFP-Fluoreszenz unterscheidet: Die Fluoreszenz der fusionierten Sekretproteine beschränkte sich fast ausschließlich auf die Zellwände. Übereinstimmende Ergebnisse wurden bei der mikroskopischen Analyse GFP-sekretierender Stämme von *Neurospora crassa* erzielt (Alves und Mercker, Daten nicht veröffentlicht). In Studien an *Aspergillus oryzae* beobachtete Masai *et al.* (2004), dass sich die Fluoreszenz von Sekret-Fusionsproteinen auf die apikalen Bereiche der Hyphen beschränkt. Nach Behandlung mit Chemikalien, die den Proteintransport zwischen ER und Golgi-Apparat unterbinden, akkumulierte die Fluoreszenz in ringförmigen Strukturen um die Zellkerne, wie es in dieser Arbeit auch für die BEM46::eGFP-Fusionsproteine gezeigt wurde.

Die genannten Studien legen nahe, dass BEM46 dauerhaft im ER lokalisiert ist und nicht sekretiert wird. Wie bereits beschrieben, enthält die *Neurospora crassa* BEM46-Sequenz jedoch keine der bekannten ER-Retentions-Sequenzmotive. Dadurch erklärt sich eine vorhergesagte Sekretion dieses Proteins, die bei Computer-basierten Analysen von dem Programm WoLFPSORT mit großer Signifikanz angegeben wird (vgl. Abbildung 5). Ein Einfluss der eGFP-Sequenz auf die ER-Retention kann im Falle der BEM46::eGFP-Fusion ausgeschlossen werden, da *N. crassa* eGFP-Sekret-Proteine in den Bereich der Septen und Zellwände sekretiert (Alves und Mercker, unveröffentlichte Daten). Der Mechanismus der ER-Retention von BEM46 ist also unbekannt. Ähnliches wurde auch für andere Proteine beschrieben, wie z.B. für das SAC1-Protein der Hefe (Faulhammer *et al.*, 2005). Es ist daher nicht auszuschließen, dass BEM46 ein noch unbekanntes

ER-Retentionssignal trägt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass diese ER-Retention über jüngst beschriebene komplexe Mechanismen erfolgt, die in *Drosophila* und *Xenopus* im Zusammenhang mit ER-gekoppelten Signalwegen beschrieben wurden (Schlesinger *et al.*, 2005). Dabei kann die ER-Retention eines Signalproteins z.B. durch spezifische Proteine in bestimmten Stadien der Morphogenese kontrolliert werden (Yamamoto *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde in Bezug auf einen Signalkomplex gezeigt, dass eine ER-Retention stattfindet, bis alle Komponenten des Komplexes miteinander assoziiert sind (Kaether *et al.*, 2004).

In den oben genannten ER-Fluoreszenzanalysen mit Fusionsproteinen in lebenden Hefezellen konnte nicht zwischen einer Lokalisation in der ER-Membran und dem ER-Lumen unterschieden werden. Aus diesem Grund kann anhand der mikroskopischen Fluoreszenzanalysen dieser Arbeit auch keine diesbezügliche Aussage über das BEM46-Protein getroffen werden. Das Fehlen signifikant vorhergesagter Transmembrandomänen in BEM46 deutet aber auf eine Lokalisation im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums hin.

In dieser Arbeit wurde erstmals das ER in lebenden *Neurospora crassa* Zellen mittels GFP-Fusion visualisiert. Der *bem46::egfp* überexprimierende Fusionsvektor pMM536 kann zukünftig als Fluoreszenzmarker für ER-Studien in *N. crassa* eingesetzt werden.

4.3 Die Funktion von Proteinen des Endoplasmatischen Retikulums (ER)

Die molekulare Funktion von Proteinen des Endoplasmatischen Retikulums ist vielfältig, da dieses in Eukaryoten an unterschiedlichen Prozessen, überwiegend Synthesevorgängen, beteiligt ist. So spielt das ER eine wichtige Rolle bei der Proteinmodifikation, -faltung und beim Proteintransport (Vitale *et al.*, 1993). Spezielle Chaperone des ERs erleichtern eine korrekte Proteinfaltung, falsch gefaltete Proteine werden erkannt und mit Hilfe ER-spezifischer Degradation abgebaut (Ellgaard *et al.*, 2003). Eine weitere wichtige Rolle übernimmt das ER in der Synthese von Kohlenhydraten und Membranlipiden. Natter (2005) zeigte mittels GFP-Studien in der Hefe, dass ein Großteil der für die Lipid-Biosynthese benötigten Proteine im ER lokalisiert ist. Des Weiteren ist das ER in Pilzen an der Zellwand-Biosynthese beteiligt, da viele dafür benötigte Enzyme und Bestandteile im ER modifiziert werden (Orlean, 1997). In Tierzellen ist das ER in die Kontrolle

des Ca^{2+} -Spiegels involviert (Berridge *et al.*, 1989). Diese Funktion wird in Pflanzen und Pilzen von den Vakuolen übernommen (Silverman-Gavrila *et al.*, 2002). Dies wurde auch für *N. crassa* gezeigt (Cornelius *et al.*, 1989).

In Tabelle 4 sind diejenigen Proteine aus *N. crassa* aufgeführt, welche nach der Uni-ProtKB/Swiss-Prot-Proteindatenbank mit dem ER assoziiert sind. Die Lokalisation und Funktion der registrierten Proteine dieser Datenbank sind entweder experimentell bestätigt, oder sie weisen starke Homologien zu experimentell analysierten Proteinen auf. Wie der Tabelle 4 zu entnehmen ist, finden sich die oben genannten Funktionen des Endoplasmatischen Retikulums auch in der Analyse der ER-Proteine von *N. crassa* wieder. Ein großer Anteil der dargestellten Proteine ist an der Proteinmodifikation, dem –transport und –abbau beteiligt. Weitere Proteine sind in die Synthese von Fetten, Zellwandbestandteilen und Kohlenhydraten involviert. Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist das Protein „Palmitoyltransferase ERF2“, das über hohe Sequenzübereinstimmungen mit Enzymen verfügt, die an der Modifikation von G-Proteinen beteiligt sind. G-Proteine spielen eine wichtige Rolle in Signalprozessen (Simon *et al.*, 1991), es besteht die Vermutung, dass Mitglieder der BEM46-Familie Einfluss auf G-Protein gesteuerte Signalwege nehmen (Mochizuki, 2005).

Für eine Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums an Signalprozessen gibt es seit einigen Jahren zunehmend Beispiele und Belege (zusammengefasst in Schlesinger *et al.*, 2005). In der Regel handelt es sich dabei um Signalwege, die Einfluss auf entwicklungsbiologische Prozesse nehmen. So wurde z.B. in *Drosophila* gezeigt, dass komplex regulierte ER-Retentionsmechanismen die Aktivität des Rezeptor-Liganden „Spitz“ während der Augenentwicklung steuern (Schlesinger *et al.*, 2004). Neben der Kontrolle von Liganden scheint die ER-Retention von Rezeptor-Komplexen eine weitere wichtige Möglichkeit für die Steuerung von Signalstärken zu sein. So wurde gezeigt, dass während der *Xenopus*-Gastrulation eine durch das Protein "Shisas" vermittelte ER-Retention mehrerer Rezeptoren bestimmte Signalwege unterdrückt (Yamamoto *et al.*, 2005). Ein Vorteil des ERs bei der Beteiligung an Signalprozessen wird darin vermutet, dass es einen "neutralen Ort" für die Aktivierung von Signalmolekülen und der Dosierung von Signalkomplexen darstellt, bevor diese an ihren Bestimmungsort gelangen (Schlesinger *et al.*, 2005).

Zusammenfassend besteht im Hinblick auf die molekulare Funktion der BEM46-Proteine anderer Organismen (vgl. Kapitel 1.3) die Möglichkeit, dass BEM46 in *N. crassa* eine Funktion in ER-vermittelten Signalwegen übernimmt. Diese

Tabelle 4: Übersicht über 20 mutmaßlich mit dem ER assoziierte Proteine von *Neurospora crassa*

Proteinbezeichnung	ORF-Bezeichnung	mutmaßliche Funktion							Quelle
		Protein-modifikation	Proteinfaltung/transport	Proteinabbau	Lipid-Biosynthese	Zellwand-synthese	Sekundär-stoffwechsel	Signalwege	
Alpha-1,2 Glucosyltransferase ALG-10	NCU07328	x							1
Alpha-1,2-Mannosyltransferase ALG-11	NCU06779	x							1
Alpha-1,3-Mannosyltransferase ALG-2	NCU03503	x							1
Mutmaßliches Cytochrom b5	NCU03910				x				2, 1
Putative Dolichyldiphosphatase	NCU03718	x							2,1
Palmitoyltransferase ERF2	NCU02015	x						x	2,1
C-8 Sterol Isomerase	NCU04156					x			3,2,1
Mutmaßlich C-5 Sterol Desaturase	NCU06207					x			1
Endoplasmatisches Oxidoreductin-1	NCU02074		x						1
Protein Disulfid-Isomerase erp38	NCU03739		x						4,2,1
Mutmaßliche Squalen Synthetase	NCU06054						x		1
FK506-bindendes Protein 2	NCU02455		x						5,1
Glycosylphosphatidylinositol-Anker Biosynthese Protein 11	100H1.070	x							2
78 kDa Glucose-reguliertes Protein Homolog	NCU03982		x						6,1
Protein OS-9 Homolog	B13B3.010			x					2
Palmitoyltransferase PFA4	NCU02118	x							1
Proteintransport-Protein SEC61 alpha-Untereinheit	B14A21.120		x						2
Mutmaßliche Proteintransport Protein SEC61 gamma-Untereinheit	NCU04127		x						1,2
Palmitoyltransferase SWF1	NCU04080	x		x					1
3-Ketodihydrosphingosin Reduktase TSC-10	NCU00302				x				1

Die Lokalisation und Funktion der Proteine beruht auf experimenteller Basis oder auf Sequenz-Homologien zu experimentell analysierten Proteinen. Alle Daten stammen aus der UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank.

Quellen: 1: Galagan *et al.*, (2003); 2: Mannhaupt *et al.* (2003); 3: Gilbert *et al.* (1996); 4: Jeenes *et al.* (1997); 5: Solscheid *et al.* (2000); 6: Techel *et al.* (1998)

Signalwege könnten Ähnlichkeiten mit den oben beschriebenen Mechanismen während bestimmter Entwicklungsvorgänge von *Xenopus* und *Drosophila* aufweisen.

4.4 Übernimmt BEM46 aus *N. crassa* eine Funktion in der Ascosporenkeimung und frühen Hyphenentwicklung?

Alle bisher analysierten Mitglieder der BEM46-Familie übernehmen Funktionen in bestimmten Entwicklungsstadien oder unter bestimmten physiologischen Bedingungen: In *Arabidopsis* steht das *bem46*-Gen in Zusammenhang mit stimulus-induzierten Prozessen (Mochizuki *et al.*, 2005), in den Hefen *S. pombe* bzw. *S. cerevisiae* spielt es eine Rolle bei der Knospung (EMBL: SP29892; Cabib *et al.*, 1998; Madden *et al.*, 1998) und in *Drosophila* beeinflusst es vermutlich Entwicklungsvorgänge in larvalen Neuroblasten (Giot *et al.*, 2003; Parmentier *et al.*, 2000).

Die Funktion des BEM46-Proteins in *Neurospora crassa* scheint ebenfalls auf bestimmte Entwicklungsstadien beschränkt zu sein. Darauf weisen die morphologischen Studien dieser Arbeit hin. Wie in Kapitel 3.3 dargestellt, wurden keine Auswirkungen einer veränderten *bem46*-Transkriptmenge auf das vegetative Wachstum und die Ascosporengenesse festgestellt. Bei der Keimungsanalyse der Ascosporen hingegen wurden sowohl bei vermindertem als auch erhöhtem *bem46*-Transkriptniveau Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Keimlinge festgestellt. Von jeweils 200 analysierten Ascosporen der entsprechenden Kreuzungen entwickelte keine der Sporen ein lebensfähiges Myzel. Im Gegensatz dazu zeigten die Ascosporen der WT-Kreuzung nach der Auskeimung ein deutliches vegetatives Wachstum (siehe Abbildung 27). Dass sowohl eine Erhöhung als auch eine Verminderung des Transkriptniveaus eines Gens zu einem ähnlichen Phänotyp führen kann, wurde auch in anderen Studien an filamentösen Pilzen beobachtet. So wurde dieser Effekt z.B. bei Studien an einem G-Protein des Ascomyceten *Trichoderma atroviride* beschrieben (Rocha-Ramirez, 2002).

Wie in Kapitel 3.3 dargestellt, diente in den Kreuzungen dieser Arbeit als jeweiliger Kreuzungspartner des Paarungstyps "a" ein Histidin-auxotropher untransformierter *N. crassa* Stamm. Dies hat seinen Grund darin, dass alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten Transformanten dem Paarungstyp "A" angehören. Die Keimung der Ascosporen wurde auf Histidin-freiem Medium analysiert, so dass nur den transgenen Sporen ein ausreichendes Nährmedium für vegetatives Wachstum zur Verfügung stand. Dies liegt darin begründet, dass his-Marker und

Transgen eng gekoppelt vererbt werden. Von dem Anteil auxotropher Sporen konnte erwartet werden, dass sie auskeimen, anschließend aber das Wachstum einstellen (Barry, 1992). Da es sich bei den analysierten Sporen somit um eine Mischung aus auxotrophen und transgenen Sporen handelte, zwischen denen nicht unterschieden werden konnte, folgten keine weiteren morphologischen Analysen einzelner Sporen. Um ausschließlich transgene Ascosporen für weitere Analysen zur Verfügung zu haben, müssten Kreuzungen durchgeführt werden, in denen beide Paarungstypen über das entsprechende Transgen verfügen.

Die starke Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit von Ascosporen mit verändertem *bem46*-Expressionsniveau findet sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hentschel (2002). In diesen wurden mit Hilfe des RIP-Mechanismus Ascosporen erstellt, deren *bem46*-Gen inaktiviert ist. Diese zeigten eine deutlich verminderte Keimungsrate gegenüber dem Wildtyp. Ausgekeimte Sporen stellten das Wachstum schon nach kurzer Zeit ein und zeigten blasenförmig verdickte Hyphen.

Wie beschrieben, konnte ein Effekt der *bem46*-Überexpressions- und -RNAi-Konstrukte auf die Lebensfähigkeit der Ascosporen nicht durch Ethanol-haltiges Keimungsmedium aufgehoben werden. Dies wäre zu erwarten gewesen, da sich die Aktivität des in beiden Konstrukten verwendeten *cfp*-Promotors durch Ethanol deutlich senken lässt (Temporini *et al.*, 2004). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Expression von *bem46* so reguliert ist, dass selbst geringe Änderungen im Expressionsniveau Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Ascosporen haben. Solch ein "kritisches Expressionsniveau" wurde z.B. für Proteine in *Drosophila* beschrieben, die Einfluss auf die Spindelarchitektur und -länge bei der Kernteilung ausüben (Goshima *et al.*, 2005). Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass BEM46 in Prozesse während der Ascosporengese, und nicht in den Keimungsprozess selbst verwickelt ist. Da die Kreuzungen - und somit die Ascosporengese - auf Ethanol-freiem Medium stattfanden, könnte sich dabei das veränderte *bem46*-Expressionsniveau auf die Lebensfähigkeit der Ascosporen ausgewirkt haben, unabhängig von der *bem46*-Transkriptmenge während der Keimung.

Bisher sind eine Anzahl verschiedener *Neurospora crassa* Mutanten bekannt, deren Ascosporenkeimung und frühe Hyphenentwicklung beeinträchtigt sind (Perkins, persönliche Mitteilung). In Tabelle 5 sind diejenigen chromosomalen Loci von *N. crassa* zusammengefasst, deren Inaktivierung in einer Beeinträchtigung der Ascosporenkeimung resultiert, ohne einen vegetativ letalen Phänotyp

Tabelle 5: *N. crassa* Genloci mit Funktionen in der Ascosporenkeimung und frühen Hyphenentwicklung

Phänotyp	verantwortlicher Genlocus	Quelle
Verminderte Auskeimung	<i>rhy-1</i>	Chang <i>et al.</i> , 1998
	<i>le-1</i>	Murray <i>et al.</i> , 1961; Garnjobst <i>et al.</i> , 1967
	gelegentlich WT	Perkins, pers. Mitt.
Wachstumsverzögerung nach Auskeimung	<i>cpc-1</i>	Davis <i>et al.</i> , 1979; Perkins <i>et al.</i> , 2001
	<i>cyb-3</i>	Perkins, unveröffentlicht
	<i>lgd</i>	Perkins, 1997
	<i>esr-1, 2, 3</i>	Davis <i>et al.</i> , 1991
Veränderte Morphologie junger Hyphen	<i>col</i>	Garnjobst, 1967

zu bewirken. Wie bereits beschrieben, trifft dies auch auf die in dieser Arbeit erstellten Transformanten mit verändertem *bem46*-Transkriptniveau zu.

Bisher wurden verschiedene *N. crassa* Mutanten identifiziert, die nur funktionsfähige Ascosporen bilden, wenn sie als maternales Elter in einer Kreuzung eingesetzt werden (Terenzi *et al.*, 1967; Johnson *et al.*, 1978). Die Bezeichnung „paternales Elter“ bzw. „maternales Elter“ bezieht sich darauf, welches Elter bei einer Kreuzung als Kerndonor bzw. Kernakzeptor fungiert, und ist unabhängig vom Paarungstyp. Bei den Transformanten dieser Arbeit wurde jedoch eine Letalität der Ascosporen unabhängig davon beobachtet, ob sie als maternales oder paternales Elter Verwendung fanden. Daher ist die Sterilität in diesem Fall nicht auf ein Geschlecht beschränkt. Auch die von Chang *et al.* (1998) beschriebenen Insertionsstämme des Gens *rhy-1* zeigen neben Störungen in der zirkadianen Rhythmik eine stark reduzierte Keimungsrate der Ascosporen, die unabhängig vom Geschlecht ist. Letzteres ist auch bei Mutanten des Gens *le-1* zu beobachten, die des Weiteren eine veränderte Morphologie im vegetativen Myzel zeigen (Murray *et al.*, 1961; Garnjobst *et al.*, 1967). Auch in Kreuzungen zwischen WT-Stämmen finden sich gelegentlich letale Ascosporen. Als Grund dafür werden Segregationsstörungen während der Meiose vermutet (Perkins, persönliche Mitteilung). Neben den Stämmen mit beeinträchtigter Ascosporenkeimung wurden ebenfalls Mutanten identifiziert, die Störungen in späteren Entwicklungsstadien der Keimung aufweisen. So zeigen Mutanten des in die Arginin-Biosynthese in-

volvierten Gens *cpc-1* (früher CD-15) nach der Ascosporenkeimung eine Wachstumsverzögerung von mehreren Tagen, die nicht durch den Zusatz von Arginin beeinflusst werden kann (Davis *et al.*, 1979; Perkins *et al.*, 2001). Ebenfalls eine Verzögerung des Hyphenwachstums im Anschluss an die Auskeimung findet sich bei Mutanten des Gens *cyb-3* (Perkins, unveröffentlichte Daten), bei RIP-Mutanten des Gens *lgd* (Perkins *et al.*, 1997) und bei mehreren Pilzstämmen mit Mutationen in den sog. *esr*-Genen. (Perkins *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden *N. crassa* Mutanten der sog. *col*-Gene charakterisiert, deren Ascosporen in frühen Stadien des Hyphenwachstums eine veränderte Morphologie aufweisen, später aber vegetatives Myzel mit normaler Morphologie ausbilden (Garnjobst, 1967).

Die oben beschriebenen Phänotypen deuten auf Prozesse in *N. crassa* hin, die zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten eine wichtige Rolle für die Ascosporenkeimung und anschließende Ausbildung vegetativen Myzels spielen. Da es noch keine Aufschlüsse über den genauen Defekt der Ascosporen mit verändertem *bem46*-Transkriptniveau gibt, kommen für die Beteiligung von BEM46 verschiedene zelluläre Prozesse zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten in Frage. Eine verminderte Keimungsrate könnte aus Störungen in frühen Prozessen wie der Ascosporengese resultieren, zu denen der korrekte Ablauf der Meiose gehört (Raju, 1980). Auch könnten Prozesse des Auskeimens beeinträchtigt sein, wie die Aktivierung der Ascosporen und die damit verbundene metabolische Umstellung (Emerson, 1953; Sussman *et al.*, 1956; Goodrich-Tanrikulu *et al.*, 1998). Die Mutanten der Gene *cpc-1*, *cyb-3*, *lgd* und *esr* weisen zudem auf spätere wichtige Mechanismen hin, die nach dem Auskeimen dafür verantwortlich sind, dass das vegetative Wachstum eingeleitet wird. Hinweise auf Umstellungen zu noch späteren Entwicklungszeitpunkten geben die Mutanten der *col*-Gene.

In welche dieser Prozesse das BEM46-Protein in *N. crassa* involviert ist, ist noch nicht bekannt. Ein Hinweis darauf könnten jedoch die blasenförmigen Verdickungen in den frühen Hyphen nach der Ascosporenkeimung liefern, die sowohl in den *bem46*-Inaktivierungsstudien von Hentschel (2002) als auch in den *bem46*-RNAi- und -Überexpressionsstudien dieser Arbeit (vgl. Abbildung 28) zu finden waren. So wurden blasenförmige Verdickungen in den Hyphen bei mehreren *N. crassa* Stämmen beschrieben, die Störungen im polaren Wachstum aufweisen (Seiler *et al.*, 2003). In filamentösen Pilzen spielt unter anderem die Aktin-Organisation für das polare Wachstum eine wichtige Rolle (zitiert in Harris *et al.*,

2003). Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, wird für verschiedene Mitglieder der BEM46-Familie eine Beteiligung am gerichteten Wachstum in Zusammenhang mit der Aktin-Organisation angenommen. So könnte BEM46 in *N. crassa* eine Rolle in der Ausbildung der Polarität in den frühen Hyphen nach der Ascosporeneimung spielen.

Auch die molekulare Funktion des BEM46-Proteins in *N. crassa* wurde noch nicht aufgeklärt. Hinweise über mögliche molekulare Aufgaben von BEM46 in *N. crassa* können jedoch Studien an der Hefe *Saccharomyces pombe* liefern, in der die Keimung sexueller Sporen untersucht wurde (Osherov, 2000). Dabei wurde gezeigt, dass zwei Prozesse für die Auskeimung sexuell gebildeter Sporen notwendig sind: Proteinsynthese sowie G-Protein gesteuerte Signaltransduktion (Herman *et al.*, 1997). Die Aktivität von G-Proteinen ist dabei entscheidend für frühe Schritte der Auskeimung. Auch eine Involvierung von cAMP gesteuerten Signalwegen in die Auskeimung sexuell gebildeter Sporen wurde bei den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* beschrieben (Thevelin, 1984). Studien an den Keimungsprozessen asexuell gebildeter Sporen von *Neurospora crassa* und anderer filamentöser Pilzen zeigten, dass ebenfalls Proteinsynthese sowie G-Protein- und cAMP gekoppelte Signalwege eine wichtige Rolle spielen (Osherov *et al.*, 2000; Schmit *et al.*, 1976; Bruno, 1996; Fillinger *et al.*, 2002).

Sowohl eine Beteiligung an Signalwegen als auch eine Involvierung in die Proteinsynthese wurden für Proteine des Endoplasmatischen Retikulums beschrieben (siehe Kapitel 4.3). Es besteht daher die Möglichkeit, dass das BEM46-Protein in *Neurospora crassa* in diese Prozesse involviert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daher darauf hin, dass BEM46 in *Neurospora crassa* eine wichtige Rolle in der Ausbildung funktionsfähiger Ascosporen und der frühen Hyphenentwicklung übernimmt. Dies bestätigen Hinweise früherer Studien über die Funktion von *bem46* in *N. crassa* (Hentschel, 2002). Es gibt verschiedene zelluläre Prozesse, die eine Rolle bei der Ausbildung lebensfähiger Ascosporen spielen. Die genaue Aufgabe und molekulare Funktion von BEM46 ist noch nicht geklärt. Studien an anderen Mitgliedern der BEM46-Familie, Proteinen des Endoplasmatischen Retikulums, der Sporenauskeimung von Pilzen sowie Aufschlüsse dieser Arbeit über das native Expressionsniveau und die ER-Retention von BEM46 weisen darauf hin, dass BEM46 in *N. crassa* an Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist.

4.5 Ausblick

Studien an dem Modellorganismus *Neurospora crassa* spielten und spielen eine wichtige Rolle in Verständnis und Entwicklung der modernen Genetik (Hynes, 2003). Seit der Benennung dieses Organismus durch Shear und Dodge im Jahre 1927 wurden über 1000 der etwa 10.000 Kerngene näher in ihrer Funktion charakterisiert (Perkins *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde das *bem46*-Gen von *Neurospora crassa* analysiert. Es wurden Hinweise auf eine Involvierung dieses Gens bei der Ausbildung lebensfähiger Ascosporen erlangt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass BEM46 im Endoplasmatischen Retikulum von *N. crassa* lokalisiert ist.

Die Vektoren und *N. crassa* Transformanten, die aus der vorliegenden Arbeit resultierten, sollten für weitere Studien an den morphologischen Auswirkungen eines erhöhten bzw. verminderten Expressionsniveaus von *bem46* genutzt werden. Wie bereits beschrieben, gehören alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten Transformanten dem Paarungstyp "A" an, so dass für Kreuzungen als Stamm des Paarungstyps "a" ein auxotropher Wildtyp-Stamm diente. Es resultierte eine Mischung transgener und auxotropher Sporen. Um einheitlich transgene Ascosporen für weitere Analysen zur Verfügung zu haben, müssen *bem46*-RNAi- und *bem46*-Überexpressionsstämme des Paarungstyps "a" erstellt werden. Anschließend können von den Transformanten beider Paarungstypen homokaryotische Stämme durch eine Mikrokonidienpassage (Ebbole *et al.*, 1990) erhalten werden. Eine Kreuzung der *bem46*-RNAi- bzw. *bem46*-Überexpressions-Stämme beider Paarungstypen führt zu Ascosporen, die einheitlich über das entsprechende Transgen verfügen. Es können weitere mikroskopische Analysen des Phänotyps folgen.

Neben dem Einfluss von BEM46 auf zellulärer Ebene sollten Informationen über seine molekulare Funktion erlangt werden. Dafür könnte nach möglichen Interaktionspartnern von BEM46 gesucht werden. Eine Möglichkeit dafür bietet das sog. "Two-Hybrid-System" (Fields und Song, 1989), über das Interaktionen zwischen zwei Proteinen eines beliebigen Organismus mit Hilfe sog. Two-Hybrid-Vektoren in Hefezellen untersucht werden können. Auf diesem Wege wäre es möglich, die Interaktion von BEM46 mit einzelnen bekannten Proteinen zu untersuchen. Dafür könnten die Proteine der in Kapitel 4.4 vorgestellten Gene mit bekannter Funktion in der Ascosporenenkeimung Verwendung finden. Als weitere mögliche Interaktionspartner kämen diejenigen *N. crassa* Proteine in Frage, für deren Homologe

in anderen Lebewesen eine Interaktion mit dem entsprechenden BEM46-Protein angenommen wird. Auch umfangreichere Interaktionsstudien wären möglich, für die als Basis cDNA-Banken von *Neurospora crassa* dienen könnten.

Um weitere Aufschlüsse über die Expressions-Regulation von *bem46* zu erlangen, sollte die Expressionsstärke von *bem46* in verschiedenen Entwicklungsstadien von *N. crassa* analysiert werden. So könnte das *bem46*-Transkriptniveau von Ascosporen, Konidien und vegetativem Myzel mittels quantitativer RT-PCR miteinander verglichen werden.

Des Weiteren sollte der Fragestellung nachgegangen werden, aus welchem Grund das BEM46-Protein dauerhaft im ER lokalisiert ist, ohne dass eines der bekannten Retentionssignale in der Proteinsequenz zu finden ist. Um mögliche dafür verantwortliche Sequenzbereiche zu identifizieren, könnten Bereiche aus dem *bem46*-Anteil des *bem46::egfp*-Fusionsvektors pMM536 deletiert werden. Anschließend kann der Effekt der Deletion auf die Lokalisation des Fusionsproteins über mikroskopische Studien an Transformanten analysiert werden.

Eine weitere Aufklärung der Funktion und Interaktion des BEM46-Proteins in *Neurospora crassa* könnte in Zukunft dazu beitragen, die bisher wenig charakterisierten molekularen Mechanismen der Ascosporenkeimung und frühen Hyphenentwicklung besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das *bem46*-Gen in *Neurospora crassa* funktionell charakterisiert und das davon abgeleitete BEM46-Protein subzellulär lokalisiert. Die Funktionsanalyse erfolgte über morphologische Vergleiche zwischen Transformanten mit erhöhter bzw. verminderter *bem46*-Transkriptmenge und dem Wildtyp. Die Erhöhung des *bem46*-Transkriptniveaus wurde mit Hilfe von Überexpressions-Vektoren, die Verminderung mit RNAi-Vektoren bewirkt. Die subzelluläre Lokalisation erfolgte mit Hilfe mikroskopischer Studien an Transformanten, in denen eine *bem46::egfp* Genfusion exprimiert wurde. Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit folgendermaßen darstellen:

- Die *bem46*-RNAi-Vektoren pMM510 und pMM532 wurden erstellt. Der Vektor pMM510 trägt ein RNAi-Konstrukt unter der Kontrolle des *acu-5*-Promotors, der Vektor pMM532 verfügt über den *cfp*-Promotor. Beide Promotoren sind regulierbar. Nach der Transformation von *N. crassa* mit dem RNAi-Vektor pMM532 wurden die Transformanten NcT289-NcT292 auf DNA-Ebene identifiziert. Northern-Blot-Analysen zeigten in der Transformante NcT289 sowohl eine starke Expression des RNAi-Konstruktes, als auch den Abbau des RNAi-Transkripts. Bei dieser Transformante wurde mittels RT-PCR gezeigt, dass die Menge an *bem46*-Transkript im Unterschied zum Wildtyp stark reduziert ist.
- Für die Erstellung von *bem46*-Überexpressions-Stämmen wurden die Vektoren pMM528 und pMM529 erstellt. Der Vektor pMM528 verfügt über den *taa*-Promotor, der Vektor pMM529 trägt den *bem46*-ORF unter der Kontrolle des *cfp*-Promotors. Nach der Transformation von *N. crassa* mit dem *bem46*-Überexpressions-Vektor pMM529 wurden die Transformanten NcT284-NcT288 mittels Southern-Blot-Analysen identifiziert. Mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen wurde bei allen fünf Transformanten ein gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhtes *bem46*-Transkriptniveau festgestellt.
- Die *bem46*-RNAi- und *bem46*-Überexpressions-Transformanten wurden in Bezug auf Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit des vegetativen Myzels, Ascosporenentwicklung, Ascosporenenkeimung und Morphologie

ausgekeimter Ascosporen mit dem Wildtyp verglichen. Es wurde gezeigt, dass Transformanten mit einer gegenüber dem Wildtyp veränderten *bem46*-Transkriptmenge keine Veränderungen im Wachstum und in der Ascosporenentwicklung aufweisen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Ascosporenkeimung und frühes Hyphenwachstum bei den *bem46*-RNAi- und *bem46*-Überexpressions-Stämmen deutlich beeinträchtigt ist.

- Um BEM46 in lebenden *N. crassa* Zellen lokalisieren zu können, wurden die *bem46::egfp*-Fusionskonstrukte pMM531 und pMM536 erstellt. Der Vektor pMM531 exprimiert die Genfusion unter der Kontrolle des nativen *bem46*-Promotors, der Vektor pMM536 verfügt über den starken *cg1*-Promotor. In den Transformanten NcT294-NcT296 wurde die Integration des *bem46::egfp*-Überexpressions-Vektors pMM536 über die Amplifikation eines *gfp*-Fragments nachgewiesen. In Makrokonidien, jungen Hyphen, vegetativen Myzel und Ascosporen wurde mittels mikroskopischer Analysen eine durch den *bem46::egfp*-Fusionsvektor pMM536 bedingte Fluoreszenz ermittelt. Diese fand sich konzentriert um die Zellkerne und in peripheren Bereichen in räumlicher Nähe zur Plasmamembran.
- Über Vergleiche der Fluoreszenzstudien dieser Arbeit zu anderen Studien an Hefen und filamentösen Pilzen wurde gezeigt, dass BEM46 im Endoplasmatischen Retikulum von *Neurospora crassa* lokalisiert ist und vermutlich nicht sekretiert wird. Analysen der BEM46-Sequenz ergaben, dass sich im BEM46-Protein eine Zielsequenz für den Transport ins ER findet, aber keines der bekannten ER-Retentionssignale.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das native Expressionsniveau des *bem46*-Homologs essentiell für die Auskeimung der Ascosporen und die anschließende frühe Hyphenentwicklung in *N. crassa* ist. Des Weiteren legen die Studien nahe, dass das BEM46-Protein im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Verschiedene Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Studien weisen darauf hin, dass BEM46 in *N. crassa* in Signaltransduktionsprozesse involviert sein könnte.

6. Literaturverzeichnis

Agrios GN. (1997) Plant pathology. 4. Auflage. Academic Press. London, United Kingdom.

Ahmed A, Case ME, Giles NH. (1964) The nature of complementation among mutants in the histidine-3 region of *Neurospora crassa*. Brookhaven Symp Biol. 17: 53-65.

Almeida R, Allshire RC. (2005) RNA silencing and genome regulation. Trends Cell Biol 15(5): 251-258.

Andrie RM, Martinez JP. (2005) Development of ToxA and ToxB promoter-driven fluorescent protein expression vectors for use in filamentous ascomycetes. Mycologia 97(5): 1152-1161.

Banerjee N, Zhang MQ. (2002) Functional genomics as applied to mapping transcription regulatory networks. Curr Opin Microbiol 5(3): 313-317.

Barbato C, Calissano M, Pickford A, Romano N, Sandmann G, Macino G. (1996) Mild RIP- an alternative method for in vivo mutagenesis of the albino-3 gene in *Neurospora crassa*. Mol Gen Genet 252(4): 353-361.

Barry EG. (1992) A combination inversion and translocation in *Neurospora crassa* with inviable deficiency progeny that can be rescued in heterocaryons. Genetics 132: 403-412.

Beadle G, Tatum E. (1941) Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. Proceedings of the National Academy of Science 27: 499-506.

Bergquist PL, Te'o VS, Gibbs MD, Cziferszky AC, De Faria FP, Azevedo MO, Nevalainen KM. (2002) Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. Appl Biochem Biotechnol 98-100: 165-176.

Bernstein E., A.C. Caudy et al. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409: 336-363.

Berridge MJ, Irvine RF. (1989) Inositol phosphates and cell signaling. Nature 341: 197-205.

Bird D, Bradshaw R. (1997) Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Mol Gen Genet 255: 219-225.

Borges MI, Bonatelli R, Felipe MSS, Astolfi-Filho S. (1990) A practical method for the preparation of total DNA from filamentous fungi. *Fungal Genetics Newsletter* 37.

Borkovich KA, Alex LA, Yarden O, Freitag M, Turner GE, Read ND, Seiler S, Bell-Pedersen D, Paietta J, Plesofsky N, Plamann M, Goodrich-Tanrikulu M, Schulte U, Mannhaupt G, Nargang FE, Radford A, Selitrennikoff C, Galagan JE, Dunlap JC, Loros JJ, Catchside D, Inoue H, Aramayo R, Polymenis M, Selker EU, Sachs MS, Marzluf GA, Paulsen I, Davis R, Ebole DJ, Zelter A, Kalkman ER, O'Rourke R, Bowring F, Yeaton 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): 1-108.

Borovkov AY, Rivkin MI. (1997) *XcmI*-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques* 22(5): 812-814.

Bracker CE, Grove SN. (1974) Vegetative structures. In A. Beckett *et al.*: An atlas of fungal ultrastructure. Longman Group Ltd., London.

Braun EL, Natvig DO, Werner-Washburne M, Nelson MA. (2004) Genomics of *Neurospora crassa*: From one-gene-one-enzyme to 10,000 genes. *Fungal Genomics - Appl Mycol Biotechnol* 4: 295-313.

Brown TA. (1996) Gentechnologie für Einsteiger. 2. Auflage. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.

Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter K (2002) Molecular biology of the cell. 4. Auflage. Garland Science New York, USA.

Bruno KS, Aramayo R, Minke PF, Metzberg RL, Plamann M. (1996) Loss of growth polarity and mislocalization of septa in a *Neurospora* Mutant altered in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* 15: 5772-5782.

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Tech.* 5: 376-378.

Cabib E, Drgonová J, Drgon T. (1998) Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 67: 307-333.

Calderon AJ, Lavergne JA (2005) RNA interference: a novel and physiologic mechanism of gene silencing with great therapeutic potential. *P R Health Sci J*, 24(1): 27-33.

Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. (2002) Involvement of small RNAs and role of the qde-genes in the gene silencing pathway of *Neurospora*. *Genes Dev* 16: 790-795.

Catalanotto C, Pallotta M, ReFalo P, Sachs MS, Vayssie L, Macino G, Cogoni C. (2004) Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 24(6): 2536-2545.

Chalfie M. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802.

Chang B, Nakashima H. (1998) Isolation of temperature-sensitive rhythm mutant in *Neurospora crassa*. *Genes Genet Syst* 73(1): 71-73.

Chant J, Corrado K, Pringle JR, Herskowitz I. (1991) Yeast BUD5, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene BEM1. *Cell* 65: 1213-1224.

Chenevert J, Corrado K, Bender A, Pringle J, Herskowitz I. (1993) A yeast (BEM1) necessary for cell polarization whose product contains two SH3 domains. *Nature* 356(6364): 77-79.

Collins ME, Briggs G, Sawyer C, Sheffield P, Connerton IF. (1991) An inducible gene expression system for *Neurospora crassa*. *Enzyme Microb Technol* 13(5): 400-403.

Cornelius G, Nakashima H. (1987) Vacuoles play a decisive role in calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 99: 353-368.

Davidson RC, Cruz MC, Sia RA, Allen B, Alspaugh JA, Heitman J. (2000) Gene disruption by biolistic transformation in serotype D strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol* 29(1): 38-48.

Davis RH, Perkins DD. (2002) Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. *Nat Rev Genet* 3: 397-403.

Davis RH. (2003) The microbial models of molecular biology. From genes to genomes. 1. Auflage. Oxford University press, USA.

Davis RH., de Serres FJ. (1970) Genetic and microbial research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol* 17A: 79-143.

Davis, R. H. (1979) The genetics of arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Genetics* 93: 557-575.

De Fabo EC, Harding RW, Shropshire W. (1976) Action spectrum between 260 ad 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Neurospora crassa*. Plant Physiol 57: 440-445.

Denecke J, De Rycke R, Botterman J. (1992) Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. EMBO J 6: 2345-2355.

Ding DQ, Tomita Y, Yamamoto A, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2000) Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. Genes Cells 5: 169-190.

Dörfelt H., (1989) Lexikon der Mykologie. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, New York.

Du Y, Pypaert M, Novick P, Ferro-Novick S. (2001) Aux1p/Swa2p is required for cortical endoplasmic reticulum inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 12(9): 2614-2628.

Ebbole D, Sachs MS. (1990) A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. Fungal Genetics Newsletter 37: 17-18.

Ellgaard L, Helenius A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat Rev Mol Cell Biol 4(3): 181-191.

Emerson MR. (1953) Some Physiological Characteristics of Ascospore Activation in *Neurospora crassa*. Plant Physiol 29(5): 418–428.

Estrada de Martin P, Du Y, Novick P, Ferro-Novick S. (2005) Ice2p is important for the distribution and structure of the cortical network in *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Sci 118: 65-77.

Faulhammer F, Konrad G, Brankatschk B, Tahirovic S, Knodler A, Mayinger P. (2005) Cell growth-dependent coordination of lipid signaling and glycosylation is mediated by interactions between Sac1p and Dpm1p. J Cell Biol 168(2): 185-191.

Fehrenbacher KL, Davis D, Wu M, Boldogh I, Pon LA. (2001) Endoplasmic reticulum dynamics, inheritance, and cytoskeletal interactions in Budding Yeast. Mol Biol Cell 13: 854-865.

Fernandez-Abalos JM, Fox H, Pitt C, Wells B, Doonan JH. (1998) Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol 27: 121-130.

Fields S, Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230): 245-246.

Fillinger S, Chaverocche MK, Shimizu K, Keller N, d'Enfert C. (2002) cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 44(4): 1001-1016.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

Fischer-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA, Read ND. (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* 198: 246-259.

Fitzgerald A, Van Kan JA, Plummer KM. (2004) Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genet Biol* 41(10): 963-971.

Forrest EC, Cogoni C, Macino G. (2004) The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res* 32: 2123-2128.

Foss EJ, Garrett PW, Kinsey JA, Selker EU. (1991) Specificity of repeat-induced point mutation (RIP) in *Neurospora*: Sensitivity of non-*Neurospora* sequences, a natural diverged tandem duplication, and unique DNA adjacent to a duplicated region. *Genetics* 127(4): 711-717.

Foster M, Mueller GM, Bills G. (2004) Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods. 1. Auflage. ELSEVIER academic press, USA.

Freitag M, Ciuffetti LM, Selker U. (2001) Expression and visualization of green fluorescent protein (GFP) in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* 48: 15-19.

Freitag M, Hickey PC, Raju NB, Selker EU, Read ND. (2004) GFP as a tool to analyze the organisation, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 41(10): 897-910.

Fuchs F, Prokisch H, Neupert W, Westermann B. (2002) Interactions of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J Cell Sci* 115: 1931-1937.

Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma LJ, Smirnov S, Purcell S, Rehman B, Elkins T, Engels R, Wang S, Nielsen CB, Butler J, Endrizzi M, Qui D, Ianakiev P, Bell-Pedersen D, Nelson MA, Werner-Washburne M, Selitrennikoff CP, Kinsey JA, Braun EL, Zelter A, Schulte U, Kothe GO, Jedd G, Mewes W, Staben C, Marcotte E, Greenberg D, Roy A, Foley K, Naylor J, Stange-Thomann N, Barrett R, Gnerre S, Kamal M, Kamvysselis M, Mauceli E, Bielke C, Rudd S, Frishman D, Krystofova S, Rasmussen C, Metzenberg RL, Perkins DD, Kroken S, Cogoni C, Macino G, Catcheside D, Li W, Pratt RJ, Osmani SA, DeSouza CP, Glass L, Orbach MJ, Berglund JA, Voelker R, Yarden O, Plamann M, Seiler S, Dunlap J, Radford A, Aramayo R, Natvig DO, Alex LA, Mannhaupt G, Ebbole DJ, Freitag M, Paulsen I, Sachs MS, Lander ES, Nusbaum C, Birren B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422(6934): 859-868.

Gallie DR, Lucas WJ, Walbot V. (1989) Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* 1: 301-311.

Garnjobst L, Tatum EL (1967) A survey of new morphological mutants in *Neurospora crassa*. *Genetics* 57: 579-604.

Genové G, Glick BS, Barth AL (2005) Brighter reporter genes from multimerized fluorescent proteins. *BioTechniques* 39(6): 814-822.

Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Guldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kotter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391.

Gilbert et al. (1996) Nukleotid-Sequenz [genomische DNA]. Stamm = 74-OR23-1A / FGSC 987. Eingereicht in die EMBL/GenBank/DDBJ Datenbank.

Giot L. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302: 1727-1736.

Glass NL, Vollmer SJ, Staben C, Grotelueschen J, Metzberg RL, Yanofsky C. (1988) DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science* 241(4865): 570-573.

Goldoni M, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. (2004) Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 41(11): 1016-1024.

Goodrich-Tanrikulu M, Howe K, Stafford A, Nelson MA. (1998) Changes in fatty acid composition of *Neurospora crassa* accompany sexual development and ascospore germination. *Microbiol* 144(7): 1713-1720.

Gordon CL, Khalaj V, Ram AF, Archer DB, Brookman JL, Trinci AP, Jeenes DJ, Doonan JH, Wells B, Punt PJ, van den Hondel CA, Robson GD. (2000) Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiol* 146: 415-426.

Goshima G, Wollman R, Stuurman N, Scholey JM, Vale RD. (2005) Length control of the metaphase spindle. *Curr Biol* 15(22): 1979-1988.

Grimme SJ, Gao XD, Martin PS, Tu K, Tcheperegine SE, Corrado K, Farewell AE, Orlean P, Bi E. (2004) Deficiencies in the endoplasmic reticulum (ER)-membrane protein Gab1p perturb transfer of glycosylphosphatidylinositol to proteins and cause perinuclear ER-associated actin bar formation. *Mol Biol Cell* 15: 2758-2770.

Hamer L, Adachi K, Montenegro-Chamorro MV, Tanzer MM, Mahanty SK, Lo C, Tarpey RW, Skalchunes AR, Heiniger RW, Frank SA, Darveaux BA, Lampe DJ, Slater TM, Ramamurthy L, DeZwaan TM, Nelson GH, Shuster RJ, Woessner J, Hamer JE (2001) Gene discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5110-5115.

Hannon GJ. (2002) RNA-interference. *Nature* 418(6894): 244-251.

Harris SD, Momany M. (2003) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol* 41: 391-400.

Hawksworth DL. (2001) The magnitude of fungal diversity: The 1,5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105: 1422-1432.

Heim R, Cubitt AB. (1995) Improved green fluorescence. *Nature* 373: 663-664.

Hentschel U. (2002) Funktionelle Analyse von *bem46* Homologen bei Hyphenpilzen. Diplomarbeit. Christian-Albrechts Universität Kiel.

Herman PK., Rine J. (1997) Yeast spore germination: a requirement for Ras protein activity during re-entry into the cell cycle. *EMBO J* 16: 6171-6181.

Hickey C, Jacobson DJ, Read ND, Glass NL (2002) Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 37: 109-119.

Hisada H, Hata Y, Kawato A, Abe Y, Akita O. (2005) Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng* 99(6): 562-568.

Holmquist M. (2000) Alpha/Beta-Hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci.* 1(2): 209-235.

Hynes JH. (2003) The *Neurospora crassa* genome opens up the world of filamentous fungi. *Genome Biol* 4: 217.

Irazoqui JE, Gladfelter AS, Lew DJ. (2003) Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc24p. *Nat Cell Biol* 5: 1062-1070.

Jeenes DJ, Pfaller R, Archer DB. (1997) Isolation and characterisation of a novel stress-inducible PDI-family gene from *Aspergillus niger*. *Gene* 193: 151-156.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405.

Johnson TE. (1978) Isolation and characterization of perithecial development mutants in *Neurospora*. *Genetics* 88: 27-47.

Joosten V, Lokman C, van den Hondel CA, Punt PJ. (2003) The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microb Cell Fact* 30;2(1): 1-15.

Juvvadi PR, Kuroki Y, Arioka M, Nakajima H, Kitamoto K. (2003) Functional analysis of the calcineurin-encoding gene *cnaA* from *Aspergillus oryzae*: evidence for its putative role in stress adaptation. *Arch Microbiol* 179(6): 416-422.

Kaether C, Capell A, Edbauer D, Winkler E, Novak B, Steiner H, Haass C. (2004) The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity. *EMBO J.* 23(24): 4738-4748.

Kempken F. (2001) Hideaway, a repeated element from *Ascobolus immersus*, is rDNA-associated and may resemble a retrotransposon. *Curr Genet* 40(3): 179-185.

Kempken F, Kempken R, Stockmeyer K. (2004) Gentechnik bei Pflanzen. 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg NewYork.

Klink TA, Woycechowsky KJ, Taylor KM, Raines RT. (2000) Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. Eur J Biochem 267: 566-572.

Latge JP. (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 12: 310-350.

Lee DW, Pratt RJ, McLaughlin M, Aramayo R. (2003) An argonaute-like protein is required for meiotic silencing. Genetics 164: 821-828.

Legerton TL, Yanofsky C. (1985) Cloning and characterization of the multifunctional *his-3* gene of *Neurospora crassa*. Gene 39(2-3): 129-140.

Lisenbee CS, Karnik SK, Trelease RN. (2003) Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. Traffic 4(7): 491-501.

Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, Sawyer TL, Redman RS, Rollins JA, Wolpert TJ, Johnson KB, Rodriguez RJ, Dickman MB, Ciuffetti LM. (2001) Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. Appl Environ Microbiol 67(5): 1987-1994.

Madden K, Synder M. (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. Annu Rev Microbiol 52: 687-744.

Maheswari R. (1999) Microconidia of *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol 26: 1-18.

Mannhaupt G, Montrone C, Haase D, Mewes HW, Aign V, Hoheisel JD, Fartmann B, Nyakatura G, Kempken F, Maier J, Schulte U. (2003) What's in the genome of filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. Nucleic Acids Res 31: 1944-1955.

Margolin BS., Freitag M, Selker EU (1997) Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. Fungal Genetics Newsletter 44: 34-35.

Masai K, Maruyama J, Nakajima H, Kitamoto K. (2004) Effects of protein transport inhibitors on the distribution and secretion of the fusion protein RntA-EGFP in *Aspergillus oryzae*. Biosci Biotechnol Biochem 68(7): 1569-1573.

Matthew L. (2004) RNAi for plant functional genomic. Comp Funct Genom 5: 240-244.

McDonald T, Brown D, Keller NP, Hammond TM. (2005) RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 539-545.

McNally MT, Free SJ (1988) Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Curr Genet* 14(6): 545-551.

Meister G, Tuschel T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA. *Nature* 431(7006): 343-349.

Miller WG, Brandl MT, Quinones B, Lindow SE. (2000) Biological sensor for sucrose availability: relative sensitivities of various reporter genes. *Appl Environ Microbiol* 67(3): 1308-1317.

Mishra NC. (1977) Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Adv Genet* 19: 341-405.

Mochizuki S, Harada A, Inada S, Sugimoto-Shirasu K, Stacey N, Wada T, Ishiguro S, Okada K, Sakai T. (2005) The arabidopsis WAVY GROWTH 2 protein modulates root bending in response to environmental stimuli. *Plant Cell* 17(2): 537-547.

Mouyna I, Henry C, Doering TL, Latge JP. (2004) Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 231: 217-224.

Mülhardt C. (2003) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 4. Auflage. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.

Mullaney EJ, Hamer JE, Roberti KA, Yelton MM, Timberlake WE. (1985) Primary structure of the *trpC* gene from *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 199(1): 37-45.

Murray JC, Srb AM. (1961) A mutant locus determining abnormal morphology and ascospore lethality in *Neurospora*. *J Hered* 52: 149-153.

Nakayashiki H. (2005) RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Lett* 579: 5950-5957.

Namboodiri AN. (1966) Electron microscopic studies on the conidia and hyphae of *Neurospora crassa*. *Caryologia* 29: 503-524.

Natter K, Leitner P, Faschinger A, Wolinski H, McCraith S, Fields S, Kohlwein SD. (2005) The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. *Mol Cell Proteomics* 4(5): 662-672.

Nelson DL, Cox MM. (2001) Lehninger Biochemie. 3. Auflage. Spriger Verlag, Heidelberg.

Nelson EJ. (1996) Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. Trends Genet 12: 69-74.

Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, et al.(1992) The alpha/beta hydrolase fold. Protein Eng 3: 197-211.

Orbach MJ, Sachs MS und Yanofsky C. (1990) The *Neurospora crassa arg-2* locus. J Biol Chem 265(19): 10981-10987.

Orlean P. (1997) Biogenesis of yeast wall and surface components, in J.R. Pringle *et al.*: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: 229-362. Cell cycle and cell biology 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Osherov N, May G. (2000) Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and Proteinsynthesis. Genetics 155: 647-656.

Papagianni M. (1995) Morphology and citric acid production of *Aspergillus niger* in submerged culture. Ph. D. thesis. University of Strathclyde, Glasgow.

Park HO, Pringle JR, Herskowitz I. (1997) Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind two different effectors to determine yeast cell polarity. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 4463-4468.

Parmentier ML, Woods D, Greig S, Phan PG, Radovic A, Bryant P, O'Kane CJ. (2000) Rapsinoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in *Drosophila*. J Neurosci 20: RC84.

Perkins DD, Margolin BS, Selker EU, Haedo SD. (1997) Occurrence of repeat-induced point mutation in long segmental duplications of *Neurospora*. Genetics 141: 125-136.

Perkins DD, Radford A, Sachs MS. (2001) The *Neurospora* compendium chromosomal loci. Academic Press, San Diego.

Perkins DD, Turner BC. (1988) *Neurospora* from natural populations: Toward the population biology of a haploid eukaryote. Exp Mycol 12: 91-131.

Pimpl P, Denecke J. (2000) ER retention of soluble proteins: retrieval, retention, or both? Plant Cell 12: 1517-1519.

Raju N. (1980) Meiosis and ascospore genesis in *Neurospora*. Eur J Cell Biol. 23: 208-223.

Riddle DL, Meyer BJ, Blumenthal T. (1997) What are essential genes? *C. Elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Rocha-Ramirez V, Omero C, Chet I, Horwitz BA, Herrera-Estrella A. (2002) *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. Eukaryot Cell 1(4): 594-605.

Romano N, Macino G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol 6: 3343-3353.

Rørth P, Szabo K, Bailey A, Laverty T, Rehm J, Rubin GM, Weigmann K, Milan M, Benes V, Ansorge W, Cohen SM.(1998) Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. Development 125: 1049-1057.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239(4839): 487-491.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Schlesinger A, Kiger A, Perrimon N, Shilo BZ. (2004) Small wing PLCgamma is required for ER retention of cleaved Spitz during eye development in *Drosophila*. Dev Cell 7(4): 535-545.

Schlesinger A, Shilo BZ. (2005) ER retention of signaling modules. Dev Cell 8: 136-137.

Schmit JC, Brody S. (1976) Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. Bacteriol Rev 40: 1-41.

Seiler S, Nargang FE, Steinberg G, Schliwa M. (1997) Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. EMBO J 16(11): 3025-3034.

Seiler S, Plamann M. (2003) The Genetic Basis of Cellular Morphogenesis in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. Mol Biol Cell 14(11): 4352–4364.

Shatkin AJ, Tatum EL (1959) Electron Microscopy of *Neurospora crassa* Mycelia. J Biophys Biochem Cytol 6: 423-426.

Shear CL, Dodge BO (1927) Life histories and heterothallism of the red bread-mould fungi of the *Monilia sitophila* group. J Agric Res 34: 1019-1042.

Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. Nucleic Acids Res 15: 7583-7600.

Silverman-Gavrila LB, Lew RR (2002) An IP₃-activated Ca²⁺ channel regulates fungal tip growth. J Cell Science 115: 5013-5025.

Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. Science 252(5007): 802-808

Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature 407: 319-320.

Solscheid B, Tropschug M. (2000) A novel type of FKBP in the secretory pathway of *Neurospora crassa*. FEBS Lett 480: 118-122.

Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-517.

Springer M.L. (1993) Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. Genes Dev 3: 559-571.

Springer ML, Yanofsky C. (1989) A morphological and genetic analysis of conidiospore development in *Neurospora crassa*. Genes Dev 3: 559-571.

Staudt N, Molitor A, Somogyi K, Mata J, Curado S, Eulenberg K, Meise M, Siegmund T, Hader T, Hilfiker A, Bronner G, Ephrussi A, Rorth P, Cohen SM, Fellert S, Chung HR, Piepenburg O, Schafer U, Jackle H, Vorbruggen G. (2005) Gain-of-function screen for genes that affect *Drosophila* muscle pattern formation. PLoS Genet 1(4): 499-506.

Sussman AS, Distler JR, Krakow JS. (1956) Metabolic Aspects of *Neurospora* Activation and Germination. Plant Physiol 31(2): 126–135.

Takeno S, Sakuradani E, Tomi A, Inohara-Ochiai M, Kawashima H, Ashikari T, Shimizu S. (2005) Improvement of the fatty acid composition of an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, through RNA interference with delta12-desaturase gene expression. Appl Environ Microbiol 71(9): 5124-5128.

Taylor, JW., Bowman BH, Berbee ML White TJ. (1993) Fungal model organisms: Phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus*, and *Neurospora*. *Syst Biol* 42: 440-457.

Techel D, Hafker T. (1998) Molecular analysis of a glucose-regulated gene (*grp78*) of *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* 1397: 21-26.

Temporini ED, Alvarez ME, Mautino MR, Folco HD, Rosa AL. (2004) The *Neurospora crassa cfp* promoter drives a carbon source-dependent expression of transgenes in filamentous fungi. *J Appl Microbiol* 96(6): 1256-1264.

Terenzi HF, Reissig JL (1967) Modifiers of the *cot* gene in *Neurospora*: The gulliver mutants. *Genetics* 56: 321-329.

Thevelin JM. (1984) Cyclic-AMP content and trehalase activation in vegetative cells and ascospores of yeast. *Arch Microbiol* 138: 64-67.

Tinsley JH, Lee IH, Minke PF, Plamann M. (1998) Analysis of actin and actin-related protein 3 (ARP3) gene expression following induction of hyphal tip formation and apolar growth in *Neurospora*. *Mol Gen Genet* 259(6): 601-609.

Trinci APJ, Saunders P. (1977) Tip growth of fungal hyphae. *J Gen Microbiol* 103: 243-248.

Trinci APJ. (1984) Regulation of hyphal branching and hyphal orientation. In Jennings DJ und Rayner ADM: *The ecology and physiology of the fungal mycelium*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.

Tsien RY. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.

Turner BC., Perkins DD, Fairfield A. (2001) *Neurospora* from natural populations: a global study. *Fungal Genet Biol* 32: 67-92.

Wedlich-Soldner R, Schulz I, Straube A, Steinberg G. (2002) Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* 13: 965-977.

Weiland N. (2005) Identifizierung und funktionelle Analyse von Promotoren für die heterologe Genexpression in Ascomyceten. Diplomarbeit. Christian-Albrechts Universität Kiel.

Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA, Ridgway HJ. (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res* 16: 31-44.

Vitale A, Ceriotti A, Denecke J. (1993) The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *Journal of Experimental Botany* 44(9): 1417-1444

Yamamoto A, Nagano T. (2005) Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell* 120: 223-235.

Yeadon PJ, Catcheside DEA. (1996) Quick method for producing template for PCR from *Neurospora* cultures. *Fungal Genetics Newsletter* 43: 71.

Zimmer M. (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* 102: 759-781.

7. Anhang

Teilergebnisse dieser Arbeit fanden in folgenden Kongress-Beteiligungen Verwendung:

Alves S., Weiland N., Mercker M, Kempken F. (2005) Analysis of the *bem46*-gene from *Ascobolus immersus* and *Neurospora crassa*. 7. VAAM-Symposium "Molecular Biology of Fungi", Bochum.

Mercker M, Weiland N, Alves S, Kempken F. (2006) Functional analysis of the conserved *bem46*-gene from *Neurospora crassa*. 8. ECFG-Konferenz "European Conference of Fungal Genetics", Wien.

In den folgenden Abbildungen A1 bis A21 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und erstellten Plasmide anhand von Vektorkarten dargestellt. Funktionelle Bereiche sind farbig hervorgehoben.

Eine Übersicht über die Plasmide und die zugehörigen Referenzen findet sich in der Tabelle 2.

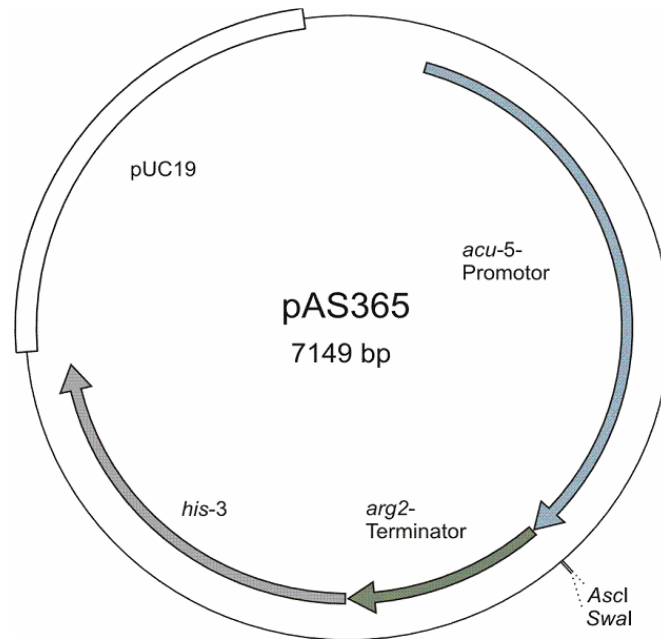


Abbildung A1: Expressionsvektor pAS365

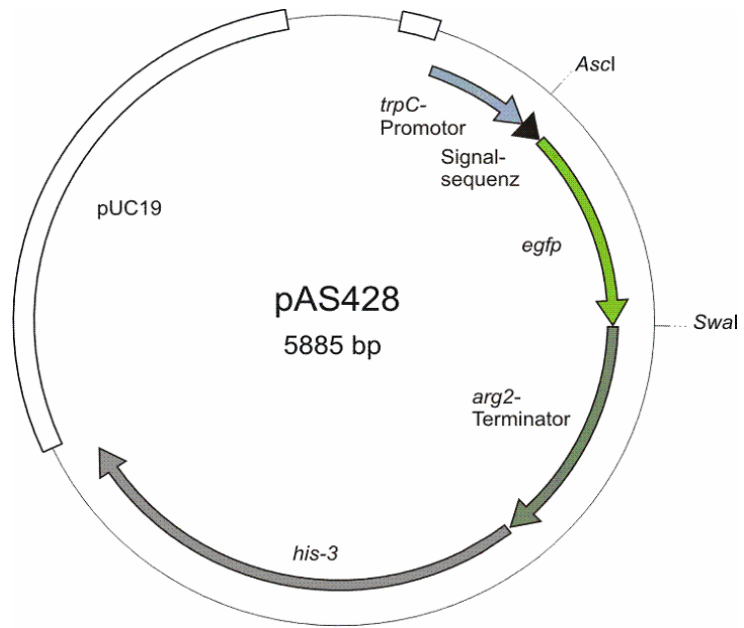


Abbildung A2: Expressionsvektor pAS428

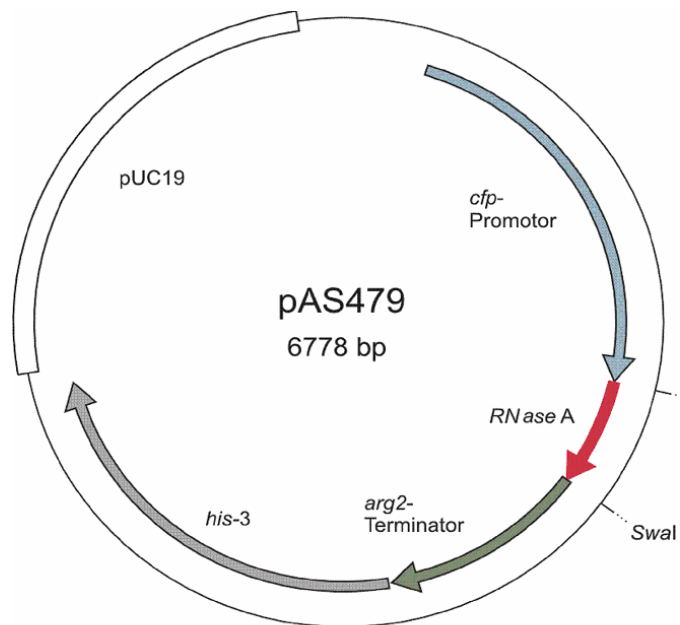


Abbildung A3: Expressionsvektor pAS479

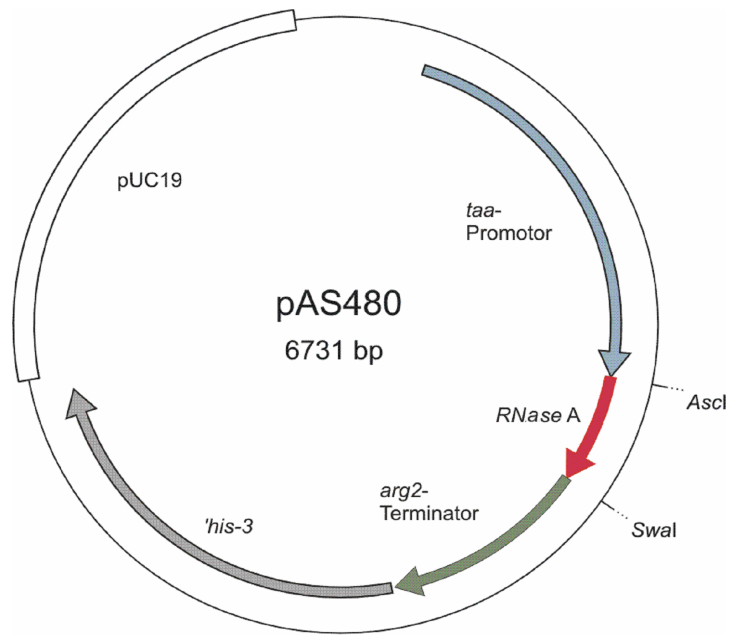


Abbildung A4: Expressionsvektor pAS480

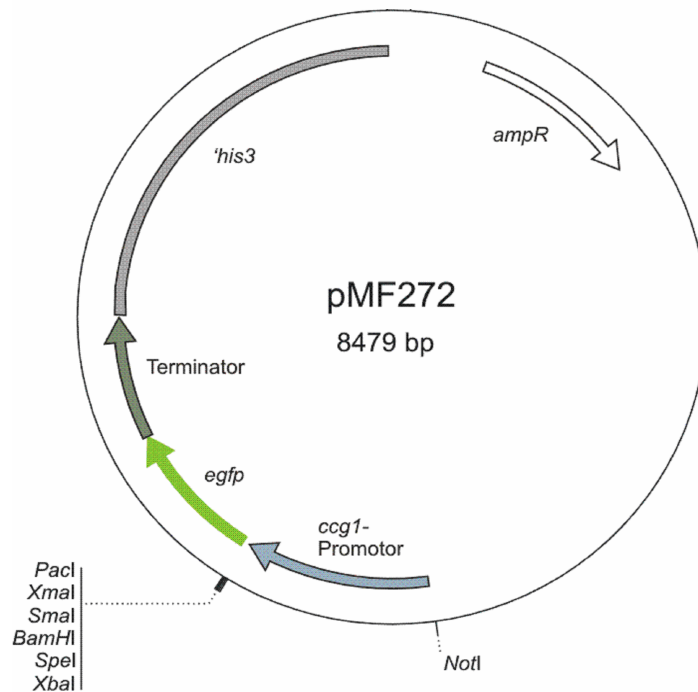


Abbildung A5: Expressionsvektor pMF272

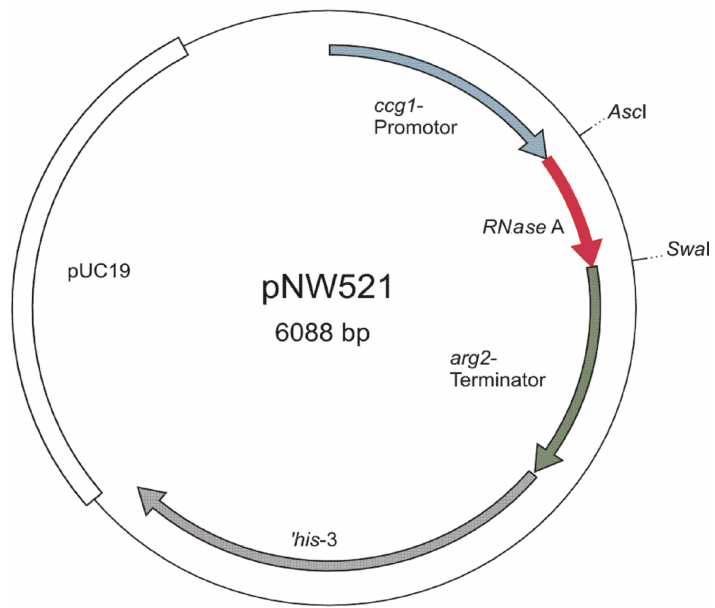


Abbildung A6: Expressionsvektor pNW521

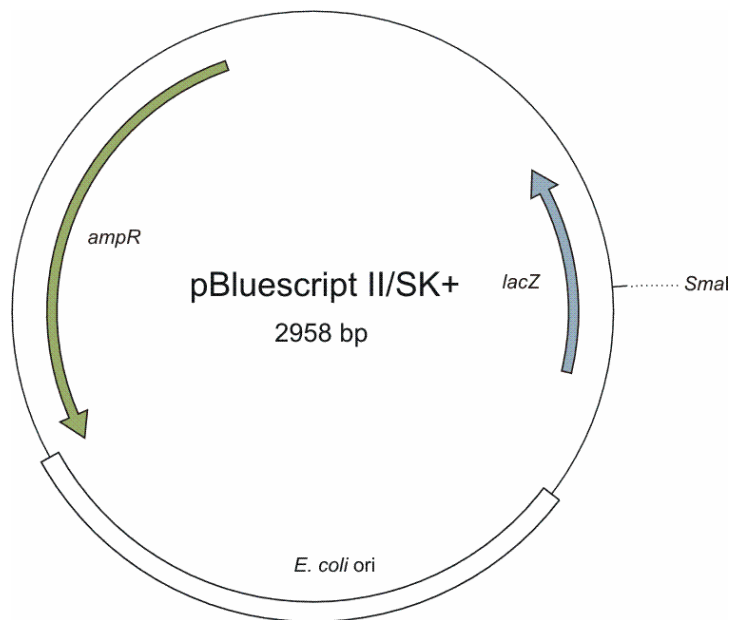


Abbildung A7: Klonierungsvektor pBluescript II/SK+

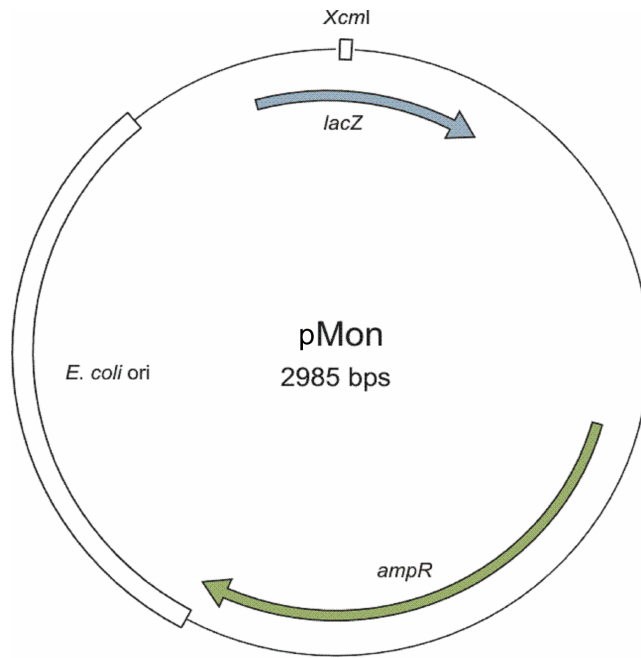


Abbildung A8: Klonierungsvektor pMon

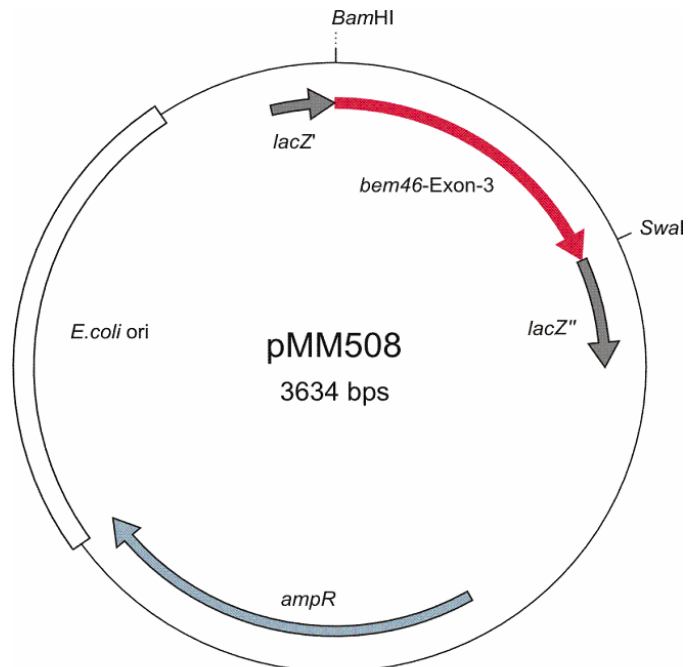


Abbildung A9: Vektor pMM508

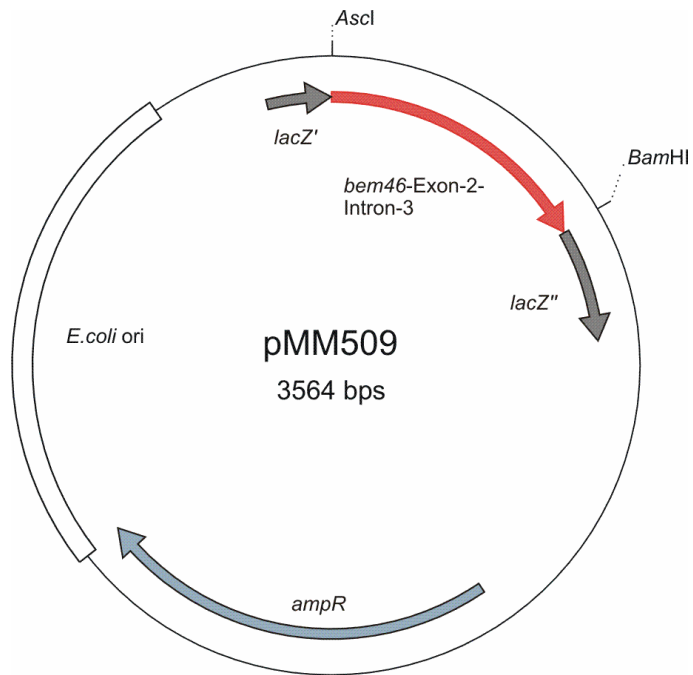


Abbildung A10: Vektor pMM509

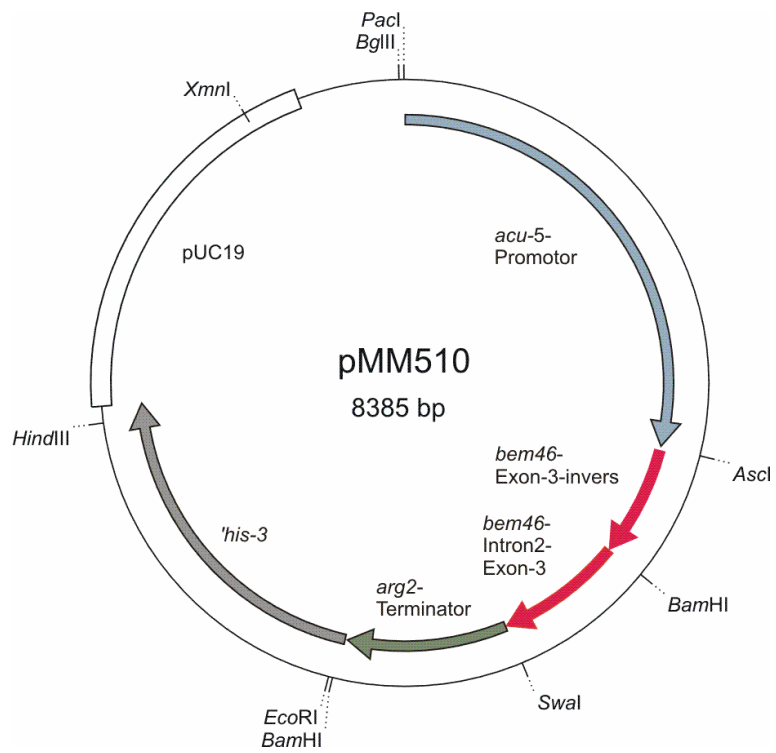


Abbildung A11: *bem46*-RNAi-Vektor pMM510

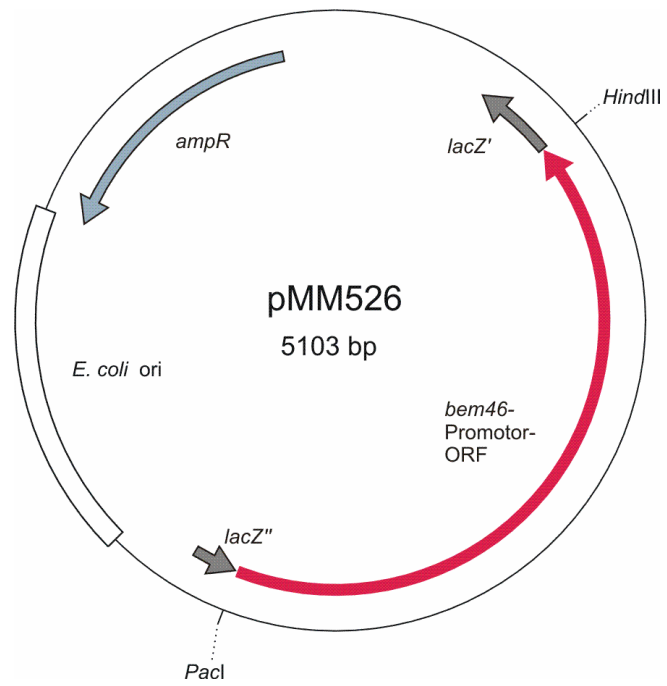


Abbildung A12: Vektor pMM526

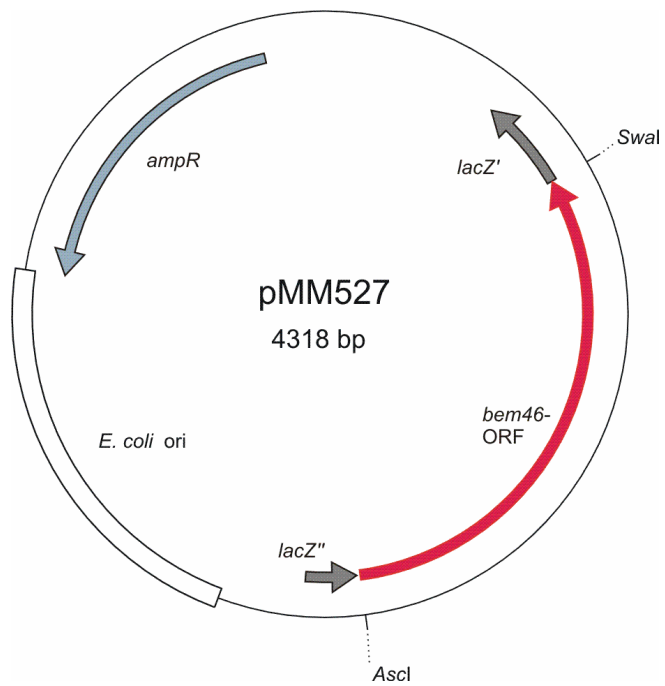


Abbildung A13: Vektor pMM527

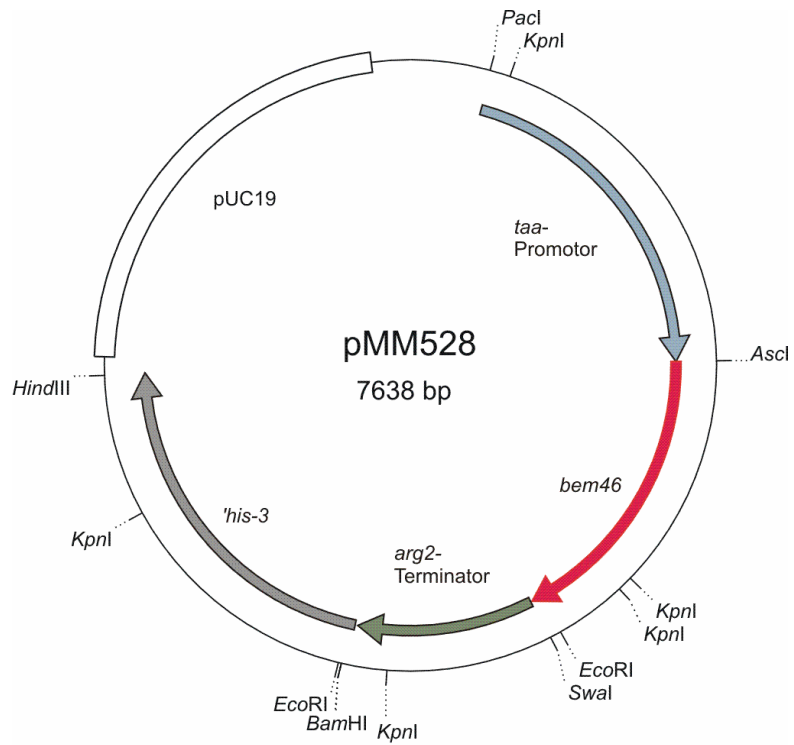


Abbildung A14: *bem46*-Überexpressions-Vektor pMM528

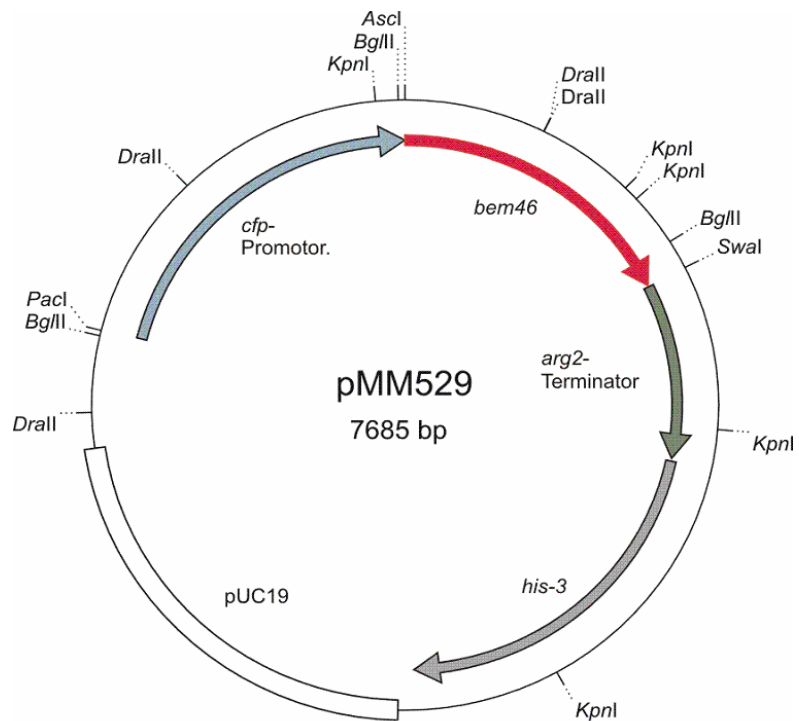


Abbildung A15: *bem46*-Überexpressions-Vektor pMM529

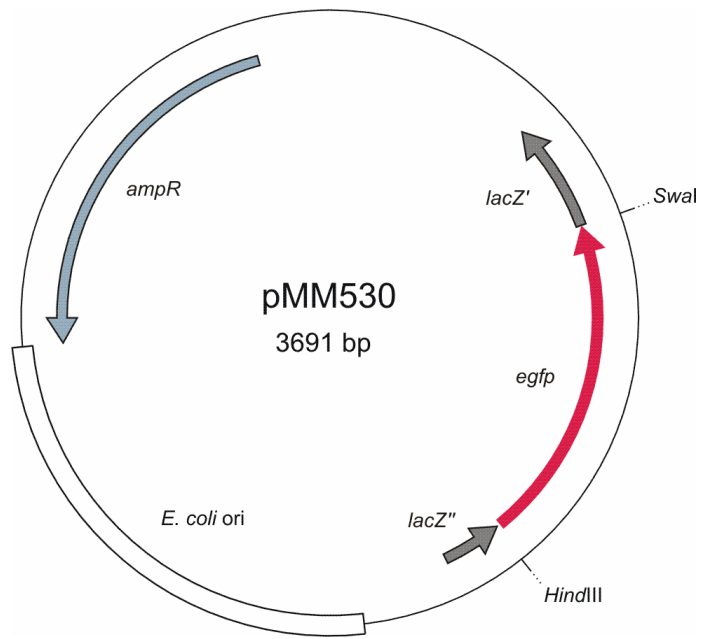


Abbildung A16: Vektor pMM530

Dieser Vektor trägt an *egfp*-Position 386 eine Basensubstitution von G nach A.

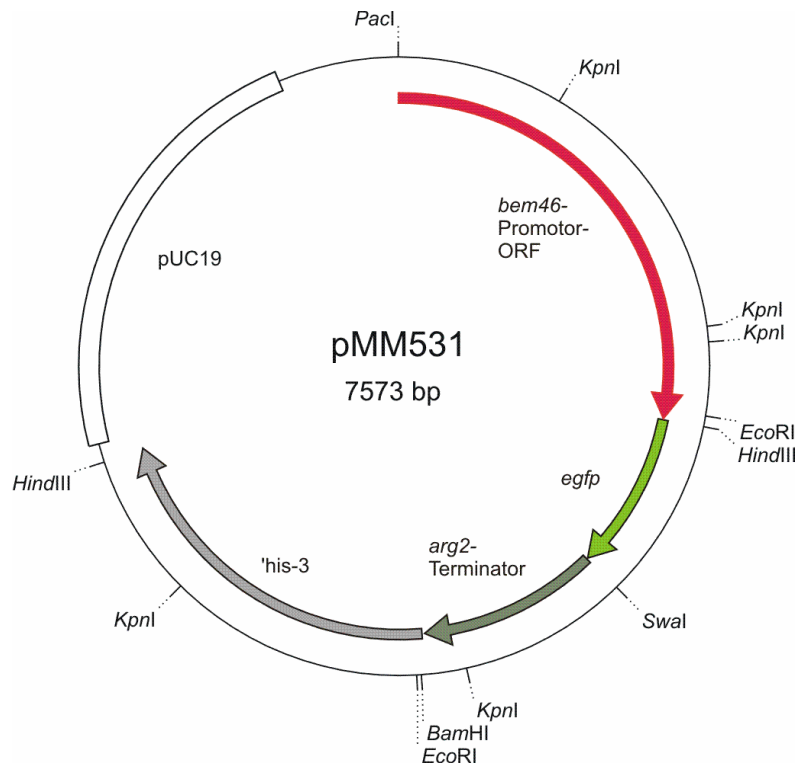


Abbildung A17: *bem46::egfp*-Fusionsvektor pMM531

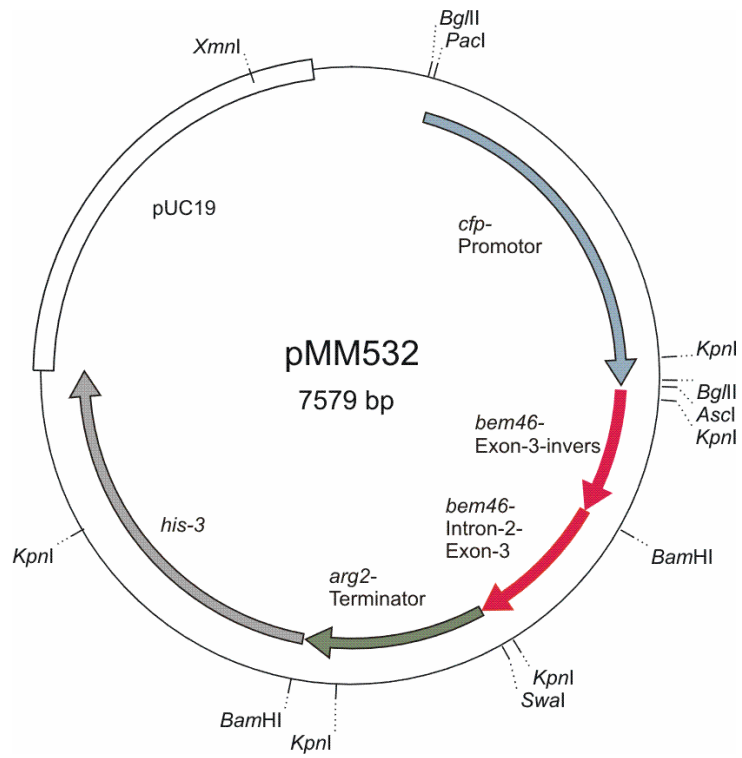


Abbildung A18: *bem46*-RNAi-Vektor pMM532

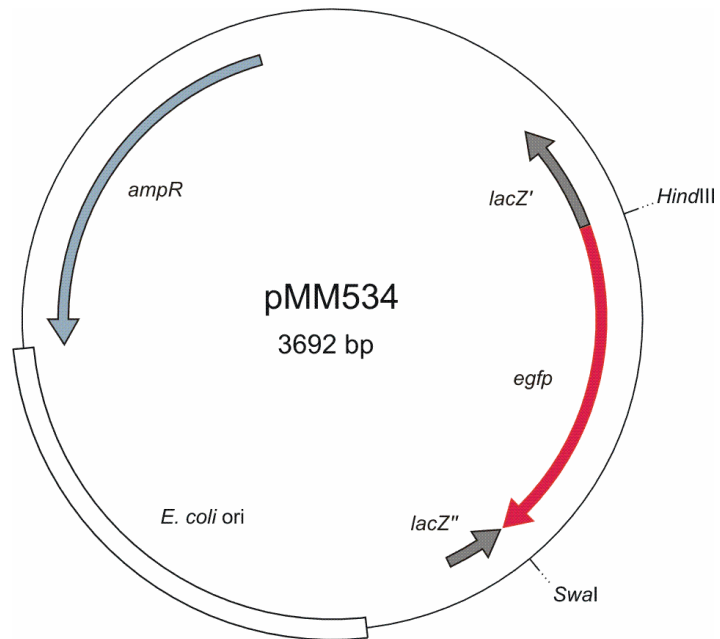


Abbildung A19: Vektor pMM534

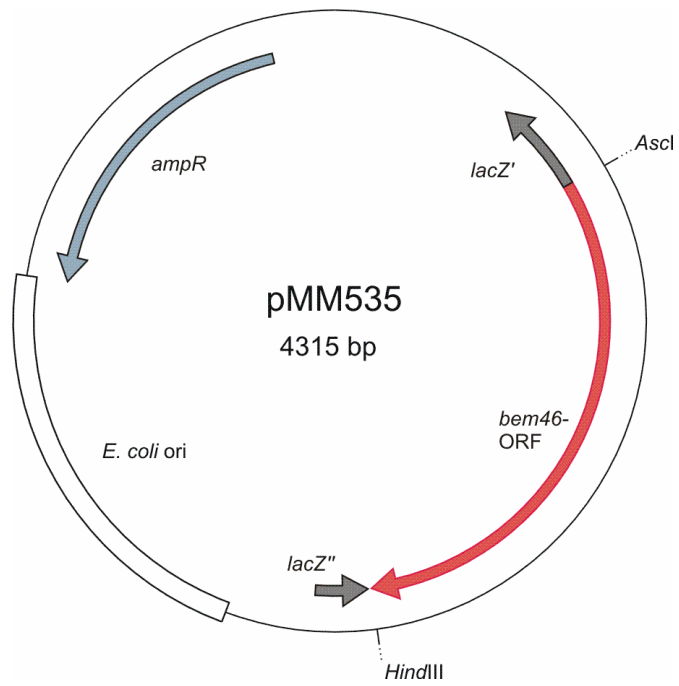


Abbildung A20: Vektor pMM535

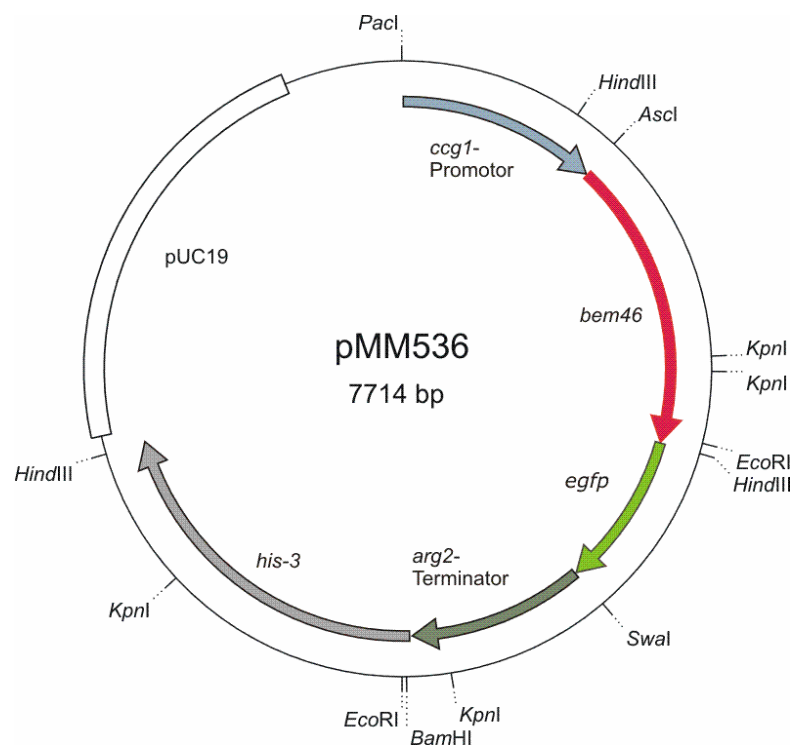


Abbildung A21: *bem46::egfp*-Fusionsvektor pMM536

In den folgenden Abbildungen B1-B4 sind die DNA- und Proteinsequenzen von *bem46* und *egfp* sowie die Lage der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide dargestellt.

***bem46*-Sequenz**

FK703 ->

TTGGACTCCCCTTTGTTGACTCCATCACTCTCATCCACATCTCCATTCCGTAC
GGGGAGAGGGTGCAGCT
TCTGGTCAATGAACAGATCAACACACCCGGGCGTTCAAGGCAGCTCTTACA
ATATAAGTCCAGTCAAATAACTGTATAAGGTAGCTATAGGAAACCTTACAGAA
TGTAACCAAACGTTTCGAAAGACTTCTACTGTCAACTACGAGGTTCCGGAAAC
GTCGAAAAGCTACAACGTTGGAAAAAATGACTATCTATTGATCATGAACAAT
CCAAATCCCGTTCGCAAATAATGAACGGTTCAATTGACCGGAAGTTGCACC
CCCCTCCTTTCCGAACTGTCATTTTCCCTGTCCGGCGTCGTGGCGTCCATAAT
ATCCCCTGTAGGCAAGCATCGAGGGTTGGCGACCATCCTGGAGCTTCCCAC
TTCCACGAGTTCTTTTGGCTTGGGTCTCTTTTAGCCGTCCGTACCTTGCAGA
CCGCGTCAAGCCAAAGAGGCCCCCGAGCTGAGCTTCCCTGCAGACTTGTTT
CCCTACCGCCATTTGCTCCAGGTTGCCCTGTCTCGCCTGTTTGGAGCCCCG
TCACGCCGTCACTCCGTCACTCCGTTGGACGTGGTACCTCACGTCAATCAA
TCAATCTGCGCAGACTTGCAGCCCGGAAGCCAACAGAGCCAAGAAGTCCA
CTCAGAGCCGGCACCCGATCGGTCAGGCGTCCACCCACGGCCCTCAACCC
TCGCTCGCCTCGGCAAGCATGTCATCTCCATCTGTACGCCTCCGGCTCCC
GATGGCAATTCTTTCTGGTGCAGATAGTGTCTCTGCTGAGCAGCGCCGCA
AGCCACTTGCGCCTGCCGGTGATAGCCTCTACTGTATGAGCCGGCATTCT
GTTTCTCCCGCCCTGTGCCTGAATGGCTGTTGAGCCGTCCGCGTCGACTGG
CCAAGGGGGCAAGTCCAATGCTTTCTCCCTCCCCGTCTCTATCAAGTGACC
TCTACCGGGGAGACGTCGTGCTAATCTTCGTGTTTCATGCGCTGACCTTGGC
TTTTGCCATCTAGGGAGTCGCCGCCATCCTCACTGGGCTGCTCTACTTCAA
GCAAAAGTATGTGGTCCCAATCTGACATCTCCATCCCAATTGCGTCACCTG
TATTAATGCGCTACCTTATTACAGAGCCCTAATCTATCCCTCTCACATGCCCC
CCGGCTCTCGAACGGACATACCTCGACCCAGCTTCTACCGCATCAAAGATT
ACGAAGAACTTATCATCCCGACCAAAGATGGCGAGAAGCTGTCTGCCTTTTA
CATTCGGGGCCCCAAGGGCGGGTCCAACTCTAAAGTGACCGTGATCATGTT
CCACGGAAACGCTGGTAATATTGGCCACCGTCTACCCATCGCACGCATGTT
GCTCCAAGCTGCGGGCTGCAACATCTTTATGCTCGAATACCGTGGCTACGG

AATCTCCACCGGCCACCCTGACGAATCTGGGCTCAACATTGACGCCCAAAC
CGCCCTCGACTATCTCCGCGATCGT^{<- FK702}GCCGAGACGCGGGACCACAAGTATAT
CGTCTACGGCCAGAGTCTTGGTGGGGCAGTTAGTGTTAAGCTCGTGTCCAA
GAACCAAGGCAGGGGGCGACATTGCCGGTTTGATTCTGGAAAATACCTTTCT
CAGCATGCGCAAGCTGATACCCAGCATCATTCTCCTGCTCGGTACCTTGC
ATCCCTATGCCATCAGGTCTGGGCTACCGACACCTTGATCGGCAATGTCAA
GGTACCTACTTTGTTTTT^{<- FK814, FK815}GAGTGGACTCCAGGACGAGATTGTGCCGTAAGTT
TTTGTCTGGCCTTTCTCATTGTGCCTCCACAATATGGTACTCTGAGCCACG
GTCTGTGGTTGTGGCCGGTTGGGTTGCATGAGAGCTGTCCGCTAATTCCAT
CACCCGCATCTTAGACCCACTCATATGAAGCAGCTTTATCATCTCTCCAACG
CTCCGATAAAGATCTGGAAGCCTCTTCCCAACGGCGACCATAACTCGAGTG
TCCTCGAAGAAGGCTACTTTGAAGCCATCGCAGAATTCATCCAAAGGGTTTC
CTCAGGAGACCCCGAAAAGAAATAG

<- FK430, FK833

Abbildung B1: DNA-Sequenz des *bem46*-Gens von *Neurospora crassa*

Diese Sequenz basiert auf dem *N. crassa* Datenbank-Eintrag gemäß Contig 7.9 (1619319 bp- 1622130 bp). Die dargestellte Sequenz beinhaltet putative Promotorbereiche. Intronsequenzen sind unterstrichen. Die Bindestellen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind grau hinterlegt.

BEM46-Sequenz

MSSPSVTPPAPDGNSFLVQIVSLLSSAASHLRLPVIASSTGVAAILTGLLYFKQKAL
IYPSHMPPGSRDIPRPSFYRIKDYEELIPTKDGEKLSAFYIRGPKGGSNSKVTVI
MFHGNAGNIGHRLPIARMLLQAAGCNIFMLEYRGGISTGHPDESGLNIDAQTA
LDYLRDRAETRDHKYIVYGQSLGGAVSVKLVSKNQGRGDIAGLILENTFLSMRK
LIPSIIPARYLASLCHQVWATDTLIGNVKVPTLFLSGLQDEIVPPTHMKQLYHLS
NAPIKIWKPLPNGDHNSSVLEEGYFEAIAEFIQRVSSGDPEKK

Abbildung B2: Proteinsequenz des BEM46-Proteins von *Neurospora crassa*

Diese Sequenz basiert auf dem *N. crassa* EMBL-Datenbankeintrag XP_330712. Es wurde der allgemein gebräuchliche Ein-Buchstaben-Code zur Darstellung der Aminosäuren verwendet.

egfp-Sequenz

FK431, FK651 ->

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGT
CGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG
GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA
CCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTAC
GGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTC
TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC
AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGA
CACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACG
GCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCT
ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCC
GCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG
AACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCT
GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA
TGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGAC
GAGCTGTACAAGTAA

<- FK652

Abbildung B3: DNA-Sequenz des egfp-Gens

Diese Sequenz basiert auf dem NCBI-Datenbankeintrag AY598428. Die Bindestellen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind grau hinterlegt.

eGFP-Sequenz

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGGDATYGKLTCLKFICTTGKL
PVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY
KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI
KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKR
DHMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK

Abbildung B4: Proteinsequenz des eGFP-Proteins

Diese Sequenz basiert auf dem NCBI-Datenbankeintrag AY598428. Es wurde der allgemein gebräuchliche Ein-Buchstaben-Code zur Darstellung der Aminosäuren verwendet.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Diplomarbeit mit dem Titel "Funktionsanalyse des *bem46*-Homologs bei *Neurospora crassa*" selbständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Ich bin damit einverstanden, dass ein Exemplar dieser Arbeit in die Universitätsbibliothek eingestellt wird.

Kiel, den 28.04.2006