

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung	1
1. Einleitung	1
2. Hyphenwuchs bei hefeartigen Pilzen	2
2.1 Der Pseudohyphenwuchs bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modell für den Übergang zu polarisiertem Wachstum	2
2.2 Hyphenwuchs und Pathogenität sind bei <i>Ustilago maydis</i> korreliert	6
3. Strukturen zur asexuellen Fortpflanzung bei Hyphenpilzen	8
3.1 Die Differenzierung von asexuellen Sporen bei <i>Aspergillus nidulans</i> wird durch räumliche und zeitliche Muster der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert	8
3.2 Eine innere Uhr reguliert die Konidienbildung bei <i>Neurospora crassa</i>	11
4. Die Kreuzungstypgene der Ascomyceten kodieren für Transkriptionsfaktoren, die für die Regulation der Dikaryophase entscheidend sind	13
5. Einige Zielgene entwicklungsgesteuerter Regulationsprozesse kodieren für Zellwandproteine	17
6. Die Erforschung der Zelldifferenzierung bei Pilzen liefert interessante Einblicke in verschiedenste Regulationsprozesse	18
II. Problemstellung	20
III. Material und Methoden	24
1. Material	24
1.1 Stämme	24
1.2 Plasmide	24
1.3 Oligonukleotide	26
1.4 Genbibliothek	27
1.5 Chemikalien	27
1.6 Enzyme	27
1.7 Häufig verwendete Puffer	28
1.8 Nährmedien	28
2. Methoden	28
2.1 Kulturbedingungen	28
2.2 Isolierung von Nukleinsäuren	29
2.2.1 Plasmid- und Cosmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.2 Gesamt-DNA aus Pilzen	29
2.2.3 Gesamt-RNA aus <i>Sordaria macrospora</i>	29
2.3 Protoplastierung von <i>Sordaria macrospora</i>	29
2.4 Transformationen	30
2.4.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	30

2.4.2 Transformation von <i>Sordaria macrospora</i>	30
2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA	30
2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen	31
2.7 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	31
2.8 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	31
2.9 Blotverfahren und Hybridisierungen	31
2.10 Oligonukleotidsynthese	32
2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.11.1 PCR von <i>S. macrospora</i> -Gesamt-DNA	32
2.11.2 RT-PCR	32
2.12 DNA-Sequenzierung	33
2.13 Auswertung von Nukleotid-Sequenzen	33
2.14 "Primer extension"	33
2.15 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Pilzmyzel	34
2.16 Nachweis von Enzymaktivitäten	34
2.16.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Test	34
2.16.2 Malat-Dehydrogenase-gekoppelter ATP-Citrat-Lyase-Test	34
2.16.3 Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-gekoppelter ATP-Citrat-Lyase-Test	36
2.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	36
2.18 Immunhistochemie	37
2.19 Fluoreszenzmikroskopie	38
2.20 Rasterelektronenmikroskopie	38
2.21 Sicherheitsmaßnahmen	38
IV. Ergebnisse	39
1. Morphologische und cytologische Charakterisierung der Mutante per5	39
2. Komplementation der Mutante per5 mit einer <i>S. macrospora</i> -Cosmid-Genbank	41
3. Analyse des <i>aclI</i> -Gens und seiner Expression in der Mutante per5	48
3.1 Genetische und molekulare Analyse des <i>aclI</i> -Allels der Mutante per5	48
3.2 Transformation der Mutante per5 mit mutierten und deletierten Derivaten des komplementierenden Cosmid-Klons	50
3.3 Vergleich der <i>aclI</i> -Transkription zwischen <i>S. macrospora</i> -Wildtyp und Mutante per5	53
3.4 Untersuchung der ACL-Aktivität in Wildtyp, Mutante und komplementierten Transformanten	54
3.5 Teilkomplementation der Mutante per5 durch verschiedene Medien-Zusätze	57
4. Untersuchung des ACL1-Polypeptids	58
4.1 "Epitope tagging" des ACL1-Polypeptids	59
4.2 Subzelluläre Lokalisation des ACL1-Polypeptids in Hyphen von <i>S. macrospora</i>	62
5. Entwicklungsabhängige Regulation der <i>aclI</i> -Expression in <i>S. macrospora</i>	63
5.1 Analyse der ACL-Aktivität im Verlauf der Entwicklung von <i>S. macrospora</i>	63

5.2 Analyse der <i>acl1</i> -Transkriptmenge sowie des ACL-Polypeptids im Verlauf der Entwicklung von <i>S. macrospora</i>	66
6. Einfluß des <i>sdr1</i> -Gens auf die ACL-Aktivität in <i>S. macrospora</i>	68
7. Entwicklungsabhängige Regulation der ACL-Aktivität bei <i>Podospora anserina</i> und <i>Aspergillus nidulans</i>	69
V. Diskussion	74
1. Das Gen für die ATP-Citrat-Lyase komplementiert die Entwicklungs- mutante <i>per5</i> von <i>Sordaria macrospora</i>	74
2. Eukaryotische ATP-Citrat-Lyase-Gene sind sehr konserviert	76
2.1 Das <i>acl1</i> -Gen von <i>S. macrospora</i> weist hohe Homologien zu den ATP-Citrat-Lyase-Genen anderer Eukaryoten auf	76
2.2 Das ACL1-Polypeptid von <i>S. macrospora</i> ist kleiner als das ACL-Polypeptid aus Tieren	79
2.3 Subzelluläre Lokalisation und physiologische Funktion der ATP-Citrat-Lyase	81
3. ATP-Citrat-Lyase-Aktivität ist für die Fruchtkörperentwicklung von <i>S. macrospora</i> erforderlich	85
3.1 Die Mutante <i>per5</i> leidet unter Acetyl-CoA-Mangel	85
3.2 Für eine erfolgreiche sexuelle Entwicklung sind bei vielen Pilzen bestimmte Lipide erforderlich	87
3.3 Die Bereitstellung von Basismetaboliten ist entwicklungs- abhängig reguliert	89
3.4 Modellvorstellung zur Funktion der ATP-Citrat-Lyase in der Fruchtkörperentwicklung von <i>S. macrospora</i>	93
VI. Zusammenfassung	96
VII. Summary	99
VIII. Literatur	102
IX. Anhang	117