

**Untersuchungen zur genetischen Regulation des Tryptophan-abhängigen
Pigmentstoffwechsels von *Malassezia furfur* und Aufklärung der
genetischen Sequenz des Schlüsselenzyms Mf_Tam1, einer Tryptophan-
Aminotransferase**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sarah Kristin Lang
aus Lahn-Gießen

Gießen 2010

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Leiter: Prof. Dr. med. M. Goebeler
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Mayser
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Schermuly
Datum der Disputation: 23.04.2010

für Clemens Jakob

Folgende Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Artikel:

Hort, W., Lang, S.K., Brunke, S., Mayser, P., Hube, B. Analysis of differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *M. furfur* by cDNA subtraction technology. *Med Mycol* 47 (3): 248-258, 2009.

Lang, S.K., Hort, W., Mayser, P. Differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *Malassezia furfur* - comparison with the recently published genome of *Malassezia globosa*. *Mycoses* accepted

Abstracts:

Lang, S.K., Hort, W., Brunke, S., Mayser, P., Hube, B. Tryptophan dependent pigment synthesis in *M. furfur* – characterization of associated genes. *Mycoses* 50: 334, 2007. (Vortrag, 41. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DmykG), Berlin)

Lang, S.K., Hort, W., Brunke, S., Mayser, P. Hube, B. Analysis of genes associated with tryptophan dependent pigment synthesis in *Malassezia furfur*. *J. Chemother.* 19 suppl. 3: 73, 2007. (Poster, 3rd Trends of Medical Mycology (TIMM), Turin)

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
Arg	Arginin
as	Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Gly	Glycin
h	Stunde
IAA	Indole-3-acetic acid
LB	Luria Bertani
μ	mikro
m	milli
n	nano
M	Mol
min	Minute
mRNA	messenger RNA
ORF	Open Reading Frame
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PV	Pityriasis versicolor
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SDS	(Sodium)Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Seq	Sequenz
SSC	Saline-Sodium Citrate
TE	Tris-EDTA
Trp	Tryptophan
UV	Ultraviolett

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. <i>Malassezia</i>-Hefen.....	1
1.1.1. Taxonomie.....	1
1.1.2. Morphologie	2
1.1.3. Physiologie	3
1.1.4. Kultur	4
1.1.5. Molekularbiologie	4
1.1.6. Epidemiologie	4
1.2. Tryptophan-abhängige Stoffwechselwege.....	5
1.2.1. Die Aminosäure Tryptophan und ihre Synthese	5
1.2.2. Tryptophanabbau in Mikroorganismen.....	6
1.2.3. Tryptophan als Grundlage biologisch aktiver Sekundärmetabolite	7
1.2.4. Tryptophan-abhängige Pigmentbiosynthese in <i>M. furfur</i>	8
1.3. Pityriasis versicolor.....	11
1.3.1. Klinisches Erscheinungsbild	11
1.3.2. Diagnostik	14
1.3.3. Epidemiologie	15
1.3.4. Pathogenese.....	16
2. PROBLEMSTELLUNG.....	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1. Vorarbeiten Dritter.....	20
3.1.1. cDNA Subtraktion.....	20
3.2. Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen.....	21
3.2.1. Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
3.2.2. Anzucht und Kultivierung von <i>Malassezia furfur</i>	23
3.3. Molekularbiologische Methoden.....	24
3.3.1. Isolation von Nukleinsäuren.....	24
3.3.2. Enzymatische Reaktionen an Nukleinsäuren	31
3.3.3. Gelelektrophorese.....	32
3.3.4. Reverser Northern Blot	34
3.3.5. PCR-Verfahren.....	38
3.3.6. Sequenzierung	43
3.3.7. Sequenzanalyse	44
3.3.8. Identifikation des Open Reading Frames von <i>mf_tam1</i> und <i>mf_sdh2</i> und Sequenzanalyse	46
3.3.9. Hypothetische Überlegungen zu MGL_2601 aus <i>M. globosa</i>	48
4. ERGEBNISSE.....	49
4.1. Untersuchungen zur differentiellen Expression Tryptophan-pigmentassoziierter Gene.....	49
4.1.1. Vorarbeiten Dritter	49

4.1.2.	Screening der 3 Stunden-Sequenzen	49
4.1.3.	BLAST Search und Sequenzabgleich	51
4.1.4.	Funktionelle Aspekte.....	67
4.2.	Überprüfung der Expression ausgewählter Sequenzen mittels semiquantitativer PCR.....	69
4.2.1.	Primerdesign.....	69
4.2.2.	Semiquantitative PCR	72
4.3.	Aufklärung und Untersuchung der Gesamtsequenzen und der Open Reading Frames von mf_tam1 und mf_sdh2.....	73
4.3.1.	Genomische Sequenz	74
4.3.2.	Open Reading Frames von mf_tam1 und mf_sdh2.....	79
4.3.3.	Untersuchung der hypothetischen Proteinsequenzen von Mf_Tam1 und Mf_Sdh2.....	81
4.3.4.	Hypothetische Überlegungen zu MGL_2601	87
5.	<u>DISKUSSION</u>	<u>89</u>
5.1.	Untersuchungen während der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese differenziell exprimierter Gene.....	90
5.2.	Identifikation und Untersuchung der genomischen Gesamtsequenz und des Open Reading Frames von mf_tam1 und mf_sdh2.....	97
5.3.	Bewertung der Ergebnisse im Zusammenhang.....	100
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>106</u>
7.	<u>SUMMARY.....</u>	<u>108</u>
8.	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>110</u>

1. EINLEITUNG

Die Pityriasis versicolor gehört zu den häufigsten erregerbedingten Dermatosen weltweit (Hay et al. 1998). Die Erkrankung besitzt verschiedene Charakteristika wie das Auftreten von hyperpigmentierter aber auch depigmentierter Läsionen, eine relative Unempfindlichkeit von Depigmentierungen gegenüber UV-Licht, Fluoreszenz der Läsionen im Woodlicht (311nm) und ein in Relation zur Pilzlast nur gering ausgeprägtes entzündliches Infiltrat.

Als Auslöser der Pityriasis versicolor gelten Hefen der Gattung *Malassezia*, in den gemäßigten Breiten vor allem *M. globosa* (Crespo-Erchiga und Florencio 2006; Gaitanis et al. 2006; Nakabayashi et al. 2000), während in tropischen Regionen auch *M. furfur* eine stärkere Rolle spielt (Krisanty et al. 2008; Miranda et al. 2006; Dutta et al. 2002). Diese Pilze gehören zur residenten Flora aller Warmblüter.

Die Pathogenese der Erkrankung ist bislang unklar. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet der von Mayser und Mitarbeitern entdeckte Tryptophan-abhängige Pigmentstoffwechsel in *M. furfur*, dessen Metabolite Eigenschaften aufweisen, die den Symptomen der Pityriasis versicolor entsprechen (Wroblewski et al. 2005; Krämer et al. 2005a; Krämer et al. 2005b; Krämer et al. 2004; Mayser und Pape 1998; Mayser et al. 1998b). Diese Pigmente konnten bislang jedoch nicht aus Läsionen der Pityriasis versicolor isoliert werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die mit der Pigmentbildung assoziiert sind. Es sollen molekularbiologische Werkzeuge entwickelt werden, die geeignet sind, die Zusammenhänge zwischen der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese und der Erkrankung aufzuklären. Außerdem wird diskutiert, ob aus den Erkenntnissen über die genetische Regulation des Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsels neue pathogenetische Konzepte und Therapieansätze für die Pityriasis versicolor hergeleitet werden können.

1.1. *Malassezia*-Hefen

1.1.1. Taxonomie

Die *Malassezia*-Hefen gehören zur residenten Flora der Warmblüter (Mayser et al. 2008; Raabe et al. 1998; Sloof 1970; Roberts 1969; Gustafson 1960). Eine Teleomorphe der *Malassezia*-Hefen ist bislang nicht bekannt. Aufgrund verschiedener Charakteristika wie Zellwandaufbau und Diazoniumblaureaktion wurden sie dem Phylum Basidiomycota

zugeordnet (Simmons und Ahearn 1987). Anhand neuer molekularbiologischer Erkenntnisse lassen sie sich dem Subphylum Ustilaginomycotina zuordnen (Begerow et al. 2000). Hier nehmen sie eine Stellung zwischen den Ustilaginomyceten und den Exobasidiomyceten ein (Hibbett et al. 2007), sie können keiner Klasse eindeutig zugeordnet werden (incertae sedis, ohne Zuteilung einer Klasse). Basierend auf physiologischen, morphologischen und genetischen Unterschieden lassen sich mittlerweile 13 *Malassezia*-Spezies voneinander abgrenzen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Derzeit bekannte *Malassezia*-Spezies und ihre Erstbeschreiber

Mit * gekennzeichnete Spezies wurden nur anhand molekularbiologischer Daten als eigenständige Spezies identifiziert.

<i>Malassezia</i>-Spezies	Erstbeschreiber	Referenzstamm (CBS)
<i>M. furfur</i>	(Baillon 1889)	CBS 1878
<i>M. pachydermatis</i>	(Dodge 1935)	CBS 1879
<i>M. sympodialis</i>	(Simmons und Gueho 1990)	CBS 7222
<i>M. globosa</i>	(Gueho et al. 1996)	CBS 7966
<i>M. sloofiae</i>	(Gueho et al. 1996)	CBS 7956
<i>M. restricta</i>	(Gueho et al. 1996)	CBS 7877
<i>M. obtusa</i>	(Gueho et al. 1996)	CBS 7976
<i>M. dermatis</i> *	(Sugita et al. 2002)	CBS 9169
<i>M. japonica</i> *	(Sugita et al. 2003)	CBS 9431
<i>M. yamatoensis</i> *	(Sugita et al. 2004)	CBS 9725
<i>M. nana</i> *	(Hirai et al. 2004)	CBS 9557
<i>M. equina</i> *	(Cabanes et al. 2007)	CBS 9969
<i>M. caprae</i> *	(Cabanes et al. 2007)	CBS 10434

1.1.2. Morphologie

Die Form der *Malassezia*-Hefen variiert zwischen den einzelnen Spezies von kugelförmig (2,5-5µm im Durchmesser) bis ellipsoid oder zylindrisch (Ø 1,5-3µm, Länge 2,5-8µm) (Mayser et al. 2008). Hyphenbildung durch *Malassezia*-Spezies kann gelegentlich *in vivo* und *in vitro* beobachtet werden und wird unter anderem mit der Pathogenese der Pityriasis versicolor in Zusammenhang gebracht (Gueho et al. 1996; Sloof 1970; Gordon 1951a; Gordon 1951b). Die Induktion der Hyphenbildung durch spezielle Kulturbedingungen ist jedoch schwierig und wurde nach Einführung der neuen Nomenklatur hauptsächlich für *M. sympodialis* (ATCC 44341 und ATCC 44031) beschrieben (Mayser et al. 2008; Saadatzadeh et al. 2001; Faergemann und Bernander 1981; Nazzaro-Porro et al. 1977).

Malassezia-Hefen besitzen eine relativ dicke Zellwand (0,12µm) mit einem lamellenartigen Aufbau (Mittag 1995; Breathnach et al. 1976; Keddie 1966; Swift und Dunbar 1965) und einem deutlich höheren Lipidanteil (~15%) als andere Hefen wie z.B. *Saccharomyces spp.* (1-2%) (Mayser et al. 2008; Thompson und Colvin 1970).

1.1.3. Physiologie

Die *Malassezia*-Spezies, mit Ausnahme von *M. pachydermatis*, gehören zu den wenigen obligat lipidabhängigen Mikroorganismen. Sie sind auf das Vorhandensein externer mittel- bis langkettiger Fettsäuren angewiesen (Mayser et al. 2008; Ashbee und Evans 2002; Porro et al. 1976; Wilde und Stewart 1968; Shifrine und Marr 1963; Benham 1939). Diese Lipiddependenz wird auf einen Defekt in der Synthese der Myristinsäure zurückgeführt (Shifrine und Marr 1963). *Malassezia*-Hefen sind nicht in der Lage, Zucker zu fermentieren (Benham 1939). Ansonsten stellen *Malassezia*-Hefen nur geringe Ansprüche an Nährstoffe und Wachstumsbedingungen. So benötigen sie weder Vitamine noch Spurenelemente noch Elektrolyte, und sie können Ammoniumsalze und eine Vielzahl von Aminosäuren als Stickstoffquellen verwenden (Mayser et al. 1998a). Obwohl sie in der Regel unter aeroben Bedingungen kultiviert werden, können sie auch unter mikroaeroben bis hin zu anaeroben Bedingungen überleben (Faergemann und Bernander 1981).

Interspezifische Unterschiede in Bezug auf Stoffwechsellösungen, wie zum Beispiel die Umsetzung verschiedener Fettsäuren, die Katalaseaktivität und die Kulturbedingungen, wie zum Beispiel die optimale Umgebungstemperatur, ermöglichen die Unterscheidung einzelner *Malassezia*-Spezies (Mayser et al. 1997a; Mayser et al. 1997b; Gueho et al. 1996; Guillot et al. 1996). Anhand dieser Unterschiede können isolierte *Malassezia*-Hefen identifiziert werden.

Mayser beschrieb 1998 erstmals die Bildung eines großen Spektrums von Pigmenten und Fluorochromen, wenn *M. furfur* mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle kultiviert wird (Mayser et al. 1998b). In geringerem Umfang wird dieses Phänomen ebenfalls bei *M. pachydermatis* beobachtet, während die anderen *Malassezia*-Spezies mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle keine Pigmentbildung, bzw. überhaupt kein Wachstum zeigen (Mayser et al. 2004). Eine detaillierte Darstellung der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese findet sich in Kapitel 1.2.

1.1.4. Kultur

Aufgrund der zunächst unbekanntenen Lipiddependenz der *Malassezia*-Hefen gelang die Kultur erstmalig Anfang des 20. Jahrhunderts (Benham 1939). Es eignen sich lipidbeschichtete Basalmedien wie Sabouraud-Dextrose-Agar oder spezielle lipidhaltige Medien, wie z.B. modifizierter Dixon (mDixon)- (Van Abbé 1964) oder Leeming-Notman-Agar (Leeming et al. 1989). Eine Anzucht in Flüssigmedien ist ebenfalls möglich, solange diese eine Lipidquelle enthalten.

Auf Agarplatten bilden die *Malassezia*-Spezies weiße bis cremefarben-gelbliche Kulturen mit fruchtig-hefigem Geruch (Labows et al. 1979; Van Abbé 1964). Luftmyzelbildung findet sich nicht. Die Oberflächenbeschaffenheit der Kolonien gilt teilweise als charakteristisch für die einzelnen Spezies (Gueho et al. 1996; Sloof 1970; Van Abbé 1964)

1.1.5. Molekularbiologie

Erst kürzlich entschlüsselt wurden die Genome von *M. restricta* und *M. globosa*, welche unter anderem als Erreger der Kopfschuppen gelten (Dawson Jr. 2007; Xu et al. 2007). Bis dahin gab es nur spärliche Informationen zur Genetik der *Malassezia*-Spezies. Bis heute existieren von *M. furfur*, auf welchem in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk liegt, lediglich Sequenzinformationen zu den ITS- (internal transcribed spacer) Regionen 1 und 2 (Makimura et al. 2000), einem Chitin-Synthase-2- (Kano et al. 1999) und einem Cytochrom-b-Gen (Biswas et al. 2001). Desweiteren sind die Gensequenzen von mittlerweile 13 Allergenen aus den *Malassezia*-Spezies beschrieben (Mayser et al. 2008; Limacher et al. 2007; Andersson et al. 2004; Rasool et al. 2000; Onishi et al. 1999; Lindborg et al. 1999; Yasueda et al. 1998; Schmidt et al. 1997), sechs davon finden sich auch in *M. furfur* (Andersson et al. 2003; Onishi et al. 1999; Yasueda et al. 1998). Kürzlich wurde die Gen- und Proteinsequenz einer Lipase aus *M. furfur* beschrieben (Brunke und Hube 2006). Insgesamt ist *M. furfur* molekularbiologisch kaum untersucht, es sind nur wenige molekularbiologische Methoden und Protokolle für diesen Organismus etabliert.

1.1.6. Epidemiologie

Obwohl die *Malassezia*-Hefen als Kommensale der Warmblüter vorkommen, zeigen sie zum Teil unterschiedliche Wirtspräferenzen (Mayser et al. 2008). So wird die lipophile, jedoch nicht obligat lipiddependente Hefe *M. pachydermatis* vorwiegend von der Haut und aus dem

äußeren Gehörgang domestizierter und wilder Säugetiere und Vögel isoliert, jedoch selten von menschlicher Haut (Chen und Hill 2005; Guillot und Bond 1999; Baxter 1976; Gustafson 1960). Die lipiddependenten *Malassezia*-Spezies werden zwar häufiger von menschlicher Haut isoliert, sie kommen jedoch auch bei Tieren vor (Gandra et al. 2008; Crespo et al. 2002a; Crespo et al. 2002b; Raabe et al. 1998; Bond et al. 1997; Bond et al. 1996). Die lipiddependenten Spezies *M. nana*, *M. equina* und *M. caprae*, welche auf molekularbiologischer Ebene enge Verwandtschaft zu *M. sympodialis* zeigen, wurden erstmals von der Haut von Tieren isoliert (Cabanes et al. 2007; Hirai et al. 2004).

Entsprechend ihrer Lipidabhängigkeit finden sich die *Malassezia*-Hefen am menschlichen Körper vorwiegend in den talgdrüsenreichen Arealen wie vorderer und hinterer Schweißrinne, an Brust und Rücken, behaartem Kopf, Stirn und Nasolabialrinne (Leeming et al. 1989; Faergemann et al. 1983; Roberts 1969). Die dichteste Besiedlung findet sich bei Menschen zwischen Pubertät und dem dreißigsten Lebensjahr, der Zeitspanne mit der höchsten Aktivität der Talgdrüsen (Faergemann und Fredriksson 1980; Cotterill et al. 1972), danach nimmt die Besiedlungsdichte wieder ab (Cunningham et al. 1992; Bergbrant und Faergemann 1988).

In den Veröffentlichungen finden sich unterschiedliche Angaben über die Häufigkeit, mit der die einzelnen *Malassezia*-Spezies von menschlicher Haut isoliert werden. *Malassezia globosa*, *M. restricta* und *M. sympodialis* scheinen am häufigsten auf gesunder Haut gefunden zu werden, die anderen Spezies deutlich seltener (Paulino et al. 2008; Sandstrom Falk et al. 2005; Tarazooie et al. 2004; Nakabayashi et al. 2000; Aspiroz et al. 1999). Diese Unterschiede können durch verschiedene Entnahme- und Kulturtechniken mit bedingt sein, aber auch durch geographische Gegebenheiten.

1.2. Tryptophan-abhängige Stoffwechselwege

1.2.1. Die Aminosäure Tryptophan und ihre Synthese

Tryptophan gehört neben Tyrosin und Phenylalanin zu den aromatischen der 20 proteinogenen Aminosäuren. Ebenso wie im schwächeren Maße auch das Tyrosin absorbiert Tryptophan UV-Licht mit einem Absorptionsmaximum bei 280nm. Für den Menschen ist Tryptophan eine essentielle Aminosäure, d.h. er kann selbst kein Tryptophan herstellen. Tryptophan dient dem menschlichen Organismus als Grundlage zur Synthese von Serotonin und Nicotinat (Vitamin B3). Es ist sowohl ketogen als auch glucogen, was bedeutet, dass das

Kohlenstoffgerüst des Tryptophans während des Abbaus sowohl in Acetyl-CoA als auch in Pyruvat überführt werden kann (Berg et al. 2003).

Tryptophan wird von Pflanzen und Mikroorganismen auf nahezu identische Weise synthetisiert. Gemeinsame Vorstufe für die drei aromatischen Aminosäuren ist Chorismat. Dieses wird ausgehend von Phosphoenolpyruvat (einem Zwischenprodukt der Glykolyse) und Erythrose-4-Phosphat (einem Zwischenprodukt des Pentosephosphatweges) synthetisiert. Über Anthranilat und Indol wird aus Chorismat Tryptophan hergestellt (Berg et al. 2003; Herrmann 1995; Radwanski und Last 1995; Miozzari et al. 1978).

1.2.2. Tryptophanabbau in Mikroorganismen

Mikroorganismen können Tryptophan über verschiedene Strategien abbauen. Teile der unterschiedlichen Abbauewege sind spezifisch für verschiedene Eukaryoten und Prokaryoten, es finden sich aber oft gemeinsame Teilschritte (Caspi et al. 2006). So verfügen neben den Säugetieren auch Pilze und zumindest einige Bakterien über die Fähigkeit, Tryptophan aerob zu Kynurenin bzw. Anthranilat abzubauen und davon ausgehend Nikotinsäure zu synthetisieren (Berg et al. 2003; Kurnasov et al. 2003a; Kurnasov et al. 2003b; Panozzo et al. 2002). Prokaryoten und Eukaryoten kann der „Anthranilat-Weg“ über unterschiedliche Teilschritte auch zur Energiegewinnung dienen (Caspi et al. 2006; Colabroy und Begley 2005). In Bakterien werden über den „Anthranilat-Weg“ auch Katechole gebildet (Bouknight und Sadoff 1975).

Ein weiterer Abbaueweg führt über die Desaminierung des Tryptophans zu Indol-3-Pyruvat in Bakterien, Pilzen und Pflanzen zu unterschiedlichen Stoffwechselprodukten. Während der Käsereifung mit verschiedenen *Lactobacillus*-Arten anfallende Aromastoffe, aber auch schlecht schmeckende und übel riechende Substanzen lassen sich auf Tryptophanabbauprodukte zurückführen (Gummalla und Broadbent 1999). *Saccharomyces cerevisiae* bildet über Indol-3-Pyruvat via Ehrlich-Weg den Fuselalkohol Tryptophol (Hazelwood et al. 2008). Das pflanzliche Auxin Indol-3-Essigsäure (IAA), welches auch von einigen Bakterien und Pilzen gebildet wird, entsteht aus Tryptophan über Indol-3-Pyruvat (Spaepen et al. 2007; Brandl und Lindow 1996; Basse et al. 1996; Badenoch-Jones et al. 1982; Kaper und Veldstra 1958). Die Rolle von Indol-3-Pyruvat im Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsel von *U. maydis* ist in Kapitel 1.2.4 dargestellt. IAA kann auch über die Decarboxylierung von Tryptophan zu Tryptamin und andere Stoffwechselwege hergestellt werden (Spaepen et al. 2007; Carreno-Lopez et al. 2000).

1.2.3. Tryptophan als Grundlage biologisch aktiver Sekundärmetabolite

Während der Primärstoffwechsel einer Zelle unmittelbar lebensnotwendige Stoffwechsellleistungen umfasst, dient der Sekundärstoffwechsel der Synthese von Substanzen, die für das Überleben der Art lediglich vorteilhaft sind, indem sie die Milieuanpassung und die Vermehrung begünstigen, sowie die Konkurrenzfähigkeit und Schadensabwehr verbessern. Zu Sekundärmetaboliten gehören beispielsweise Toxine, Pigmente und Duftstoffe. Oft gehen Sekundärmetabolite aus den Intermediaten des Primärstoffwechsels hervor.

Tryptophan kann als Ausgangssubstanz einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten dienen. Die in Kapitel 1.2.2 erwähnte Indolessigsäure (IAA) ist ein pflanzliches Wachstumshormon (Spaepen et al. 2007). Auch einige Phytoalexine, die von Pflanzen zur Abwehr pathogener Organismen produziert werden, leiten sich vom Tryptophan ab (Pedras et al. 2000), ebenso die Ommochrome, die Augenfarbstoffe von Insekten und Krustentieren (Oxford und Gillespie 1998). Auch zahlreiche Antibiotika und Zytotoxine basieren auf Tryptophan, darunter die Vincaalkaloide Strictosidin, Vincristin und Vinblastin aus *Catharanthus rosea* (Kutchan 1995), Staurosporin und Rebeccamycin aus diversen Actinomyceten (Bush et al. 1987; Omura et al. 1977) und Violacein aus *Chromobacterium violaceum* (Balibar und Walsh 2006).

Zu den pilzlichen, auf Tryptophan basierenden Sekundärmetaboliten zählen diverse Mykotoxine, wie die Fumitremorgene aus *Aspergillus fumigatus*, und die Ergotalkaloide, die aus *Claviceps purpurea*, dem Mutterkorn, gewonnen werden können (Keller et al. 2005). Zu den pharmakologischen Wirkungen der Ergotalkaloide gehören die Induktion von Krämpfen, Gefäßverengung und Halluzinationen, was die Symptomatik der Mutterkornvergiftungen erklärt. Die genetischen Grundlagen vieler dieser Stoffwechselwege sind inzwischen bekannt. Viele Abkömmlinge der Ergotalkaloide lassen sich mittlerweile synthetisieren. Sie finden Anwendung in der Therapie des Morbus Parkinson (z.B. Cabergolin, Pergolid), der Migräne (z.B. Ergotamin), von Durchblutungsstörungen (z.B. Ergotamin) und bis heute in der Geburtshilfe (Ergometrin) – woher das Mutterkorn seinen Namen hat. Ein als Halluzinogen bekanntes und seit 1966 in den USA, seit 1971 in Deutschland verbotenes Ergotalkaloid ist das erstmals 1938 durch Hofmann synthetisierte LSD (Lysergsäurediethylamid) (Hofmann 1979).

1.2.4. Tryptophan-abhängige Pigmentbiosynthese in *M. furfur*

In 1998 wurde durch Mayser et al. erstmals ein Tryptophan-abhängiger Pigmentstoffwechsel in *M. furfur* beschrieben. Kultiviert man *M. furfur* auf einem Mangelmedium, welches Tryptophan als einzige Stickstoffquelle enthält, wird ein bräunliches Pigmentgemisch mit grünlicher Fluoreszenz im UV-Licht gebildet (Mayser et al. 1998b). Dieses Pigmentgemisch kann über die Kopplung verschiedener Chromatographieverfahren in zahlreiche verschiedenfarbige Einzelsubstanzen und Fluorochrome aufgetrennt werden (Abbildung 1).

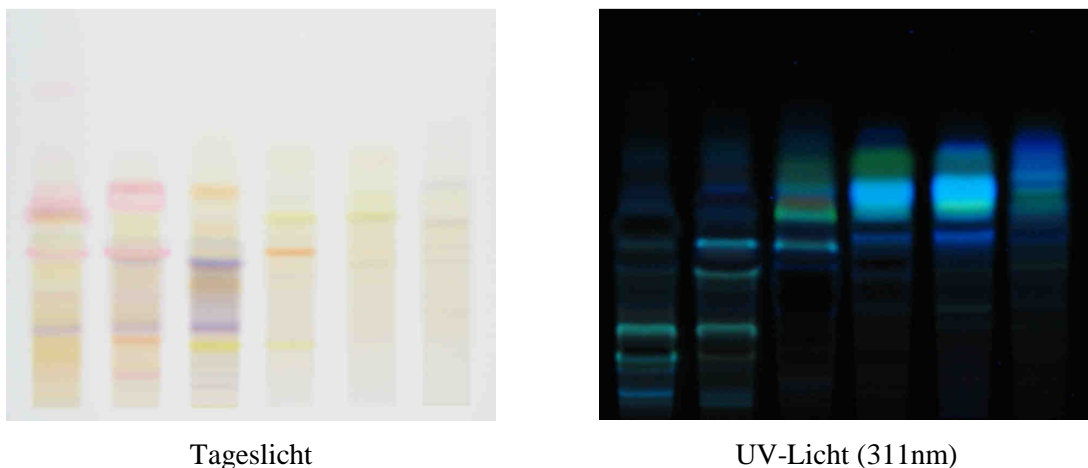


Abbildung 1: Dünnschichtchromatographische Auftrennung des Pigments von *M. furfur*

Mittels Bioassays, die auf Grundlage klinischer Charakteristika der Pityriasis versicolor entwickelt worden waren, konnten einige Metabolite identifiziert werden, die verschiedene Symptome der Pityriasis versicolor erklären können (Kapitel 1.3.4). Die Strukturformeln einiger dieser Substanzen sind in den Abbildungen 2 - 6 abgebildet. In seiner Dissertation entwarf Irlinger basierend auf Verfütterungsexperimenten mit radioaktiv markierten Tryptophanmolekülen Modelstoffwechselwege für einige Tryptophanmetabolite (Abbildung 7 und 8) (Irlinger et al. 2004; Irlinger 2002). Der genetische und enzymatische Hintergrund des Stoffwechselweges in *M. furfur* ist bislang unbekannt.

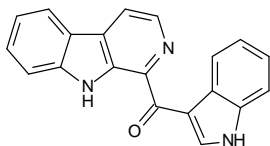


Abbildung 2: Pityriacitrin

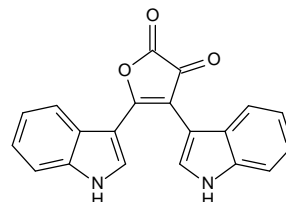


Abbildung 3: Pityrialacton

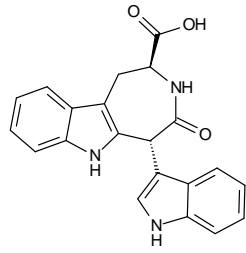


Abbildung 4: Malasseziaindol A

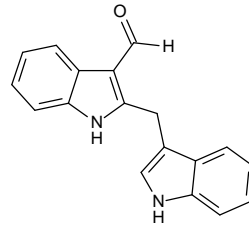


Abbildung 5: Malassezin

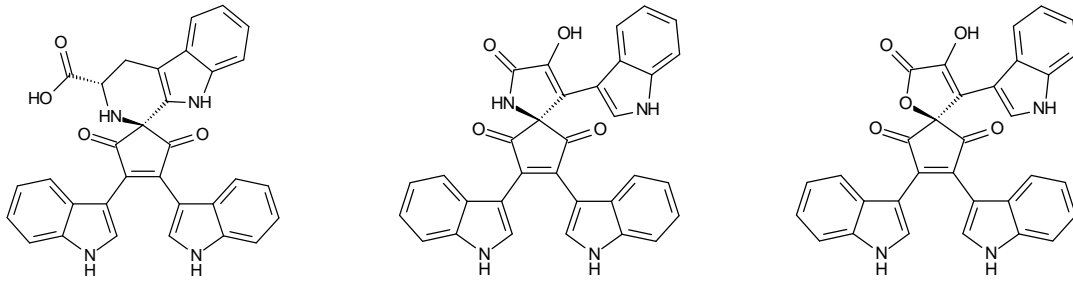


Abbildung 6: Pityriarubin A, B und C

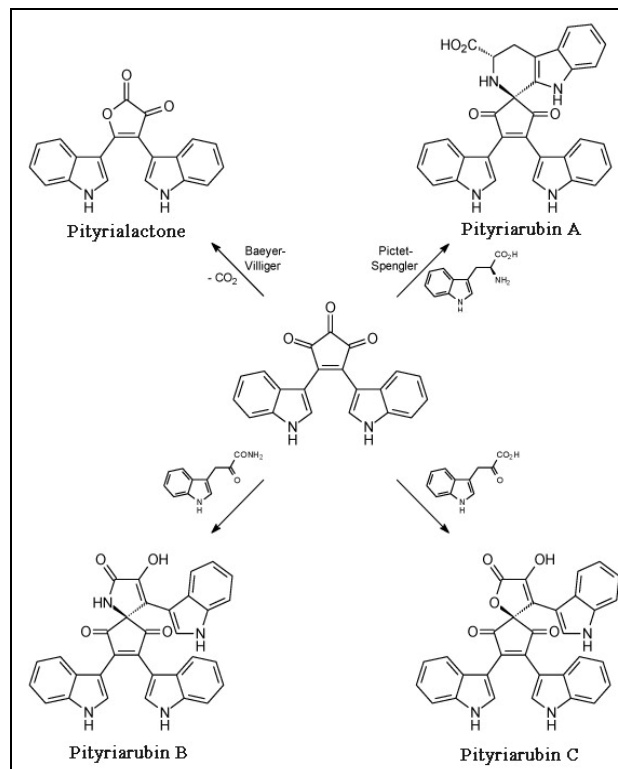


Abbildung 7: Modellstoffwechselweg für die Pityriarubine A, B und C und Pityrialacton

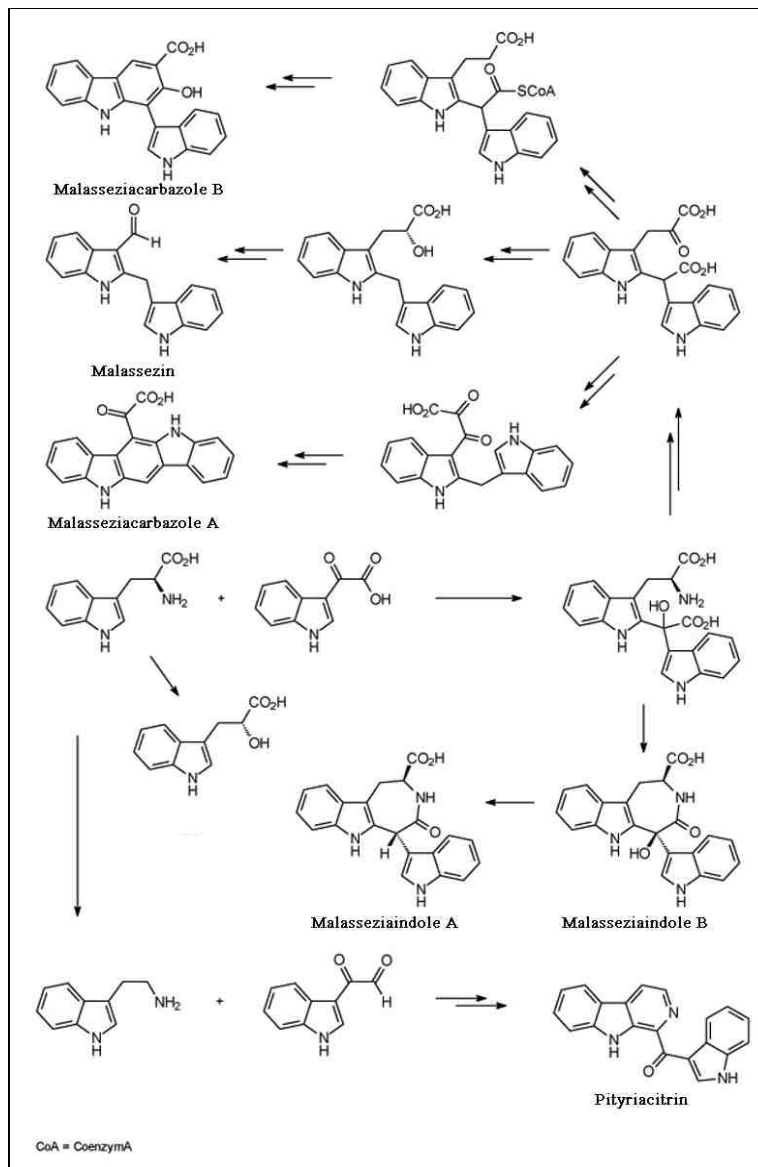


Abbildung 8: Modellstoffwechselweg Malassezin, die Malasseziaindole und -carbazole und Pityriacitrin (rechts)

Von den *Malassezia*-Spezies sind die *Malassezia furfur*-Stämme und einige *Malassezia pachydermatis*-Stämme zum Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsel befähigt (Mayser et al. 2004). Mittlerweile konnten vergleichbare Tryptophan-abhängige Pigmentstoffwechsel in *Ustilago maydis* (Schering 2007) und anderen Brandpilzen (Mayer 2007), *Candida glabrata* (Mayser et al. 2007), Cryptococcen (Chaskes et al. 2008), einigen Schwärzepilzen (Nies 2006) und einigen Bakterienarten, z.B. Klebsiellen (Paris und Magasanik 1981), nachgewiesen werden. In *Ustilago maydis* konnte gezeigt werden, dass Tryptophan hierzu durch das Schlüsselenzym Tam1, einer Tryptophan-Aminotransferase, in Indol-3-pyruvat überführt wird. Zumindest ein großer Anteil dieser Substanzen können anscheinend spontan aus Indol-3-pyruvat und Tryptophan entstehen (Zuther et al. 2008).

1.3. Pityriasis versicolor

1.3.1. Klinisches Erscheinungsbild

Die Pityriasis versicolor ist eine durch *Malassezia*-Hefen verursachte Dermatose. 1801 beschrieb Willan diese Erkrankung als erster und gab ihr den Namen (Willan 1801).

Klinisch können zwei Varianten der PV unterschieden werden: die mit Hyperpigmentierung einhergehende, „klassische“ Pityriasis versicolor (chromians) (Abbildung 9) und die hypo- bzw. depigmentierte Variante Pityriasis versicolor alba (Abbildung 10) (Crespo-Erchiga und Florencio 2006; Thoma et al. 2005; Gupta et al. 2002).

Die hyperpigmentierte PV ist durch das Auftreten rundlich-ovaler, teils konfluierender Makulae in den seborrhoischen Arealen gekennzeichnet (von Gudden 1853). Diese können ein breites Farbspektrum aufweisen. Es werden gelbliche, rötliche über bräunliche, bis ins Schwarze übergehende Läsionen beschrieben (Thoma et al. 2005; Gupta et al. 2003; Gupta et al. 2000; Sunenshine et al. 1998; Ruete 1928). Die Hyperpigmentierungen sind von einer kleieförmigen (pityriasiformen) Schuppung bedeckt. Die leichte Abstreifbarkeit der Schuppung von den Herden („Hobelspanphänomen“) ist charakteristisch für die Erkrankung (Besnier und Balzer 1882). Im Woodlicht (366nm) zeigen die hyperpigmentierten Herde eine gelb-grüne Fluoreszenz (Abbildung 11). Auch die klinisch nicht betroffene Umgebung der Herde kann fluoreszieren, was ein Fortschreiten der Erkrankung anzeigen kann (Gupta et al. 2002).

Der Übergang der Läsionen in langanhaltende Depigmentierungen nach Abheilung der hyperpigmentierten Form ist schon lange bekannt (von Gudden 1853). Diese depigmentierte Form wird als Pityriasis versicolor alba bezeichnet. In den meisten Fällen entwickeln sich die depigmentierten Läsionen spontan im Anschluss an die Hyperpigmentierungen, insbesondere unter dem Einfluss von UV-Licht (Thoma et al. 2005; el-Gothamy et al. 1975; Lockshin 1973; Adamson 1949). Gelegentlich wird die Pityriasis versicolor alba erst nach dem Sonnenbad durch Ausbleiben der üblichen Bräune bemerkt (Moynahan 1976). Die weißen Läsionen der Pityriasis versicolor alba sind im Gegensatz zu den Läsionen anderer depigmentierender Erkrankungen nicht empfindlicher gegenüber UV-Bestrahlung als gesunde Haut, sondern erweisen sich sogar als weniger anfällig für Sonnenbrand (Abbildung 10) (Larangeira de Almeida und Mayser 2006; Ruete 1933; Wertheim 1928; Kistiakovsky 1927). Die pityriasiforme Schuppung kann insbesondere bei älteren Läsionen fehlen (Thoma et al. 2005; Lockshin 1973).

Ein gleichzeitiges Vorkommen hypo- und hyperpigmentierter Herde ist möglich (Sunenshine et al. 1998; Ruete 1933). Ein Abheilen der Pityriasis versicolor chromians ist auch ohne zwangsläufiges Auftreten von Depigmentierungen möglich (el-Gothamy et al. 1975). Ebenso kann die Pityriasis versicolor alba ohne vorangehende Hyperpigmentierungen entstehen. Einige Autoren beschreiben Hypo- und Depigmentierungen sogar als eigenständige Variante der Erkrankung auf schwarzer Haut (Jeliffe und Jacobson 1954; Marples 1950; Pardo-Castello 1932). Bei Kindern überwiegt die mit Hypo- bzw. Depigmentierungen einhergehende Form (Bouassida et al. 1998).

In den gemäßigten Breiten wird die Erkrankung hauptsächlich wegen der kosmetischen Beeinträchtigung als störend erlebt (Gupta et al. 2002). Gelegentlich klagen Betroffene über Juckreiz und Brennen besonders beim Schwitzen (Crespo-Erchiga und Florencio 2006; Gupta et al. 2002; Borelli et al. 1991). Die Erkrankung neigt zu häufigen Rezidiven.



Abbildung 9: Pityriasis versicolor chromians



Abbildung 10: Pityriasis versicolor alba

Reduzierte Empfindlichkeit der Läsionen gegenüber UV-Licht (oben) bei ausbleibender Bräunung (unten)
(Larangeira de Almeida und Mayser 2006).

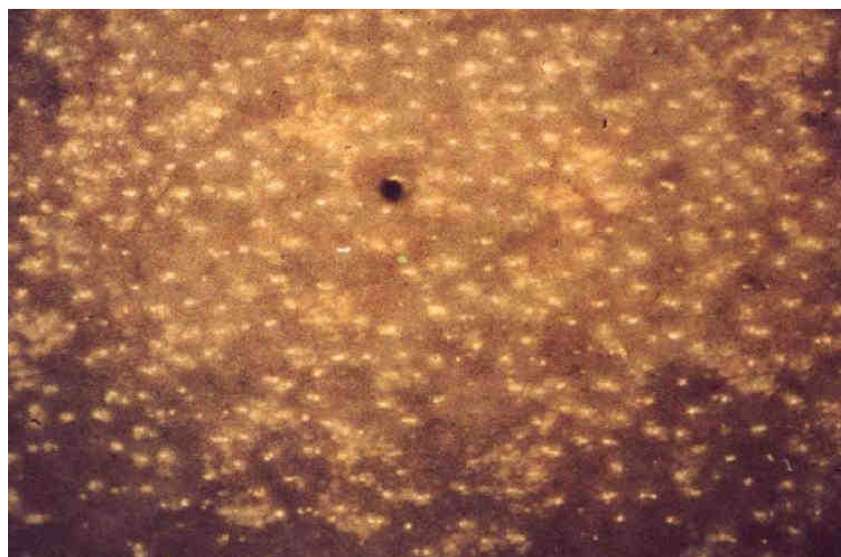


Abbildung 11: Fluoreszenz der Läsionen im Woodlicht (366nm)

1.3.2. Diagnostik

Die Diagnose der Pityriasis versicolor erfolgt überwiegend klinisch anhand der typischen Läsionen mit kleieförmiger Schuppung, Hobelspanphänomen und der charakteristischen Fluoreszenz im Wood-Licht. Entscheidend für die Diagnose ist der Pilznachweis im Nativpräparat aus läsionaler Haut. Während sich auf gesunder Haut vorwiegend Sprosszellen der *Malassezia*-Hefen finden, zeigt sich in der Mikroskopie der Pityriasis versicolor ein charakteristisches Bild: breite, kurze segmentierte Hyphen und traubenartigen Sporenhäufchen aus 10-30 Einzelsporen, auch bezeichnet als „spaghetti und meat-balls“. Hyphenbildung kann zwar auch in gesunder Haut beobachtet werden (Roberts 1969), findet sich hier jedoch wesentlich seltener als in erkrankter Haut, so dass bei entsprechender Klinik die Hyphen im Nativpräparat den entscheidenden Hinweis geben.

Die Anlage einer Pilzkultur ist zur Diagnosefindung nicht hilfreich, da sich *Malassezia*-Hefen als Bestandteil der residenten Flora auch auf gesunder Haut finden. Sie ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen StoffwechsellLeistungen einzelner Spezies, z.B. der Assimilation verschiedener Fettsäuren, zur Identifizierung der auslösenden Spezies von Bedeutung (Mayser et al. 1997a; Mayser et al. 1997b; Gueho et al. 1996; Guillot et al. 1996).

Differentialdiagnostisch kommen unter anderem Erythrasma, Chloasma, Pityriasis rosea oder Tinea corporis und das Sekundärstadium der Syphilis in Frage, bei der Pityriasis versicolor alba außerdem Pityriasis alba und Vitiligo. In tropischen Ländern muss die Pityriasis versicolor alba von Depigmentierungen bei Lepra abgegrenzt werden (Olumide et al. 1990).

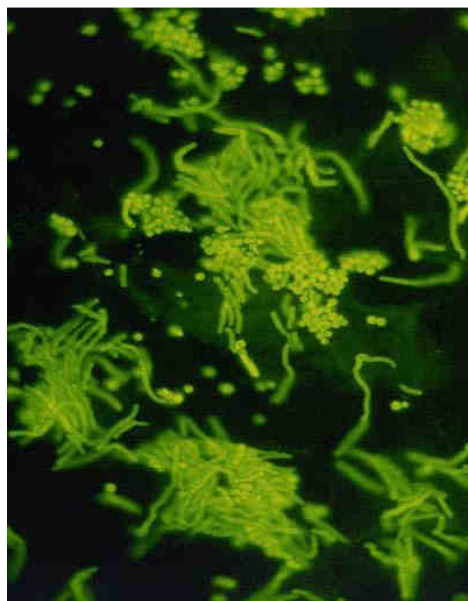


Abbildung 12: Nativpräparat der Pityriasis versicolor: Es finden sich Hyphen und Sprosszellen (Uvitex- 2B Färbung)

1.3.3. Epidemiologie

Die Pityriasis versicolor gehört zu den häufigsten, mit Pigmentverschiebungen einhergehenden Hauterkrankungen (Sunenshine et al. 1998) und ist eine der häufigsten erregerbedingten Dermatosen weltweit (Hay et al. 1998). Den Zusammenhang der Erkrankung mit einem Pilz als Erreger erkannte Eichstedt bereits 1846 (Eichstedt 1846). Die Häufigkeit der Erkrankung variiert saisonal und regional. So wird die Prävalenz der PV in tropischen Regionen mit bis zu 50% beziffert (Marples 1950). In den gemäßigten Klimazonen liegt bei 1-3% der dermatologischen Patienten eine PV vor, mit einem verstärkten Auftreten während der Sommermonate (Crespo-Erchiga und Florencio 2006; Gupta et al. 2003; Ashbee und Evans 2002; Sunenshine et al. 1998).

Am höchsten ist die Besiedlungsdichte der *Malassezia*-Hefen auf gesunder Haut postpubertärer Jugendlicher und junger Erwachsener beider Geschlechter; demgemäß hat die PV ihren Häufigkeitsgipfel in dieser Bevölkerungsgruppe (Crespo-Erchiga und Florencio 2006; Gupta et al. 2004; Gupta et al. 2002). Eine familiäre Häufung der PV weist auf genetische Einflüsse hin (Hafez und el-Shamy 1985; Burke 1961).

Das Auftreten der PV kann durch bestimmte Faktoren begünstigt werden. Dazu gehören eine anlagebedingte Hyperhidrose und das Tragen okklusiver Kleidung oder die Applikation fetthaltiger Kosmetika, welche zur Entstehung eines feucht-warmem Milieus, Änderungen in der CO₂-Spannung und des pH-Werts führen können (Gupta et al. 2002; Sunenshine et al. 1998; Faergemann 1989; Faergemann und Bernander 1979; King et al. 1978). Sportler scheinen eine erhöhte Neigung zur PV aufzuweisen (Conklin 1990; McDaniel 1977). Auch Allgemeinerkrankungen (Hashim und Elhassan 1994), Mangelernährung (Stein 1983) und die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Borelli et al. 1991) und Steroide scheinen das Auftreten der PV zu begünstigen (Ashbee und Evans 2002; Gupta et al. 2002; Burke 1961). Inwieweit die Entstehung und Intensität der PV durch Immunsuppression beeinflusst wird, ist umstritten. Verstärkte und atypische Verläufe wurden beobachtet (Daneshvar und Hashimoto 1987; Burkhart et al. 1981). Aly hingegen wies der PV eine Sonderstellung zu, da diese im Gegensatz zu anderen Pilzkrankungen bei AIDS nicht vermehrt aufträte (Aly und Berger 1996).

1.3.4. Pathogenese

Welche der verschiedenen *Malassezia*-Spezies Erreger der Pityriasis versicolor ist, ist umstritten. Zurzeit wird in den gemäßigten Klimazonen *M. globosa* als Hauptverursacher der Pityriasis versicolor angesehen (Crespo-Erchiga und Florencio 2006; Gaitanis et al. 2006; Nakabayashi et al. 2000), in den tropischen Regionen scheint auch *M. furfur* eine bedeutende Rolle zu spielen (Krisanty et al. 2008; Miranda et al. 2006; Dutta et al. 2002).

Die Pathogenese der Pityriasis versicolor ist nicht geklärt. Eine wichtige Rolle wird der Transformation der Organismen von der Hefeform ins Hyphenstadium zugeschrieben (Faergemann und Bernander 1979; McGinley et al. 1970). So liegt die Häufigkeit von Hyphen bei Pityriasis versicolor-Patienten in Läsionen bei 100%, in nicht-läsionaler Haut am Kopf bei 50% und am Stamm bei 42% (McGinley et al. 1970). Zwar können in Kultur vereinzelte Hyphen gelegentlich auch spontan beobachtet werden (Gueho et al. 1996), die Induktion ist jedoch schwierig und an aufwändige Kulturbedingungen geknüpft (Saadat-zadeh et al. 2001; Nazzaro-Porro et al. 1977). Außerdem konnte die Hyphenbildung *in vitro* bisher nicht in allen Spezies demonstriert werden.

Für die einzelnen Symptome der Pityriasis versicolor existieren verschiedene Erklärungsansätze:

1.3.4.1. Erklärungsmodelle für Hyperpigmentierung und Depigmentierung

Die Hyperpigmentierung der Läsionen der Pityriasis versicolor lange Zeit als eine entzündliche Reaktion auf die *Malassezia*-Hefen im Stratum corneum verstanden (Galadari et al. 1992; Dotz et al. 1985). In histologischen Untersuchungen der Erkrankung zeigt sich jedoch trotz der oft hohen Pilzlast kein oder nur ein sehr wenig entzündliches Infiltrat (Wroblewski et al. 2005; Sohnle und Collins-Lech 1978; el-Gothamy et al. 1975; Charles et al. 1973; Ruete 1933). Zudem lassen sich die unterschiedlichen farblichen Nuancen der Läsionen nicht befriedigend durch ein entzündliches Geschehen erklären.

Auch ein Vorhandensein abnormer Melanosomen und Melanozyten in läsionaler Haut wurde als Erklärungsansatz postuliert (Karaoui et al. 1981; Allen et al. 1976; Charles et al. 1973). Diese Beobachtungen wurden jedoch mittlerweile widerlegt. Neuere Untersuchungen haben keine Unterschiede in Größe und Anzahl von Melanosomen und Melanozyten in gesunder und in hyperpigmentierter Haut ergeben (Galadari et al. 1992). Gegen eine Beteiligung von Melanozyten spricht das Auftreten von Hyperpigmentierungen einer Pityriasis versicolor in

Läsionen von Vitiligo (Dotz et al. 1985), da in den Hautveränderungen bei Vitiligo gar keine Melanozyten mehr existieren.

Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der Beobachtung eines verdickten Stratum corneums und dem Vorliegen zahlreicher Pilzelemente in hyperpigmentierten Arealen (Galadari et al. 1992; Karaoui et al. 1981).

Allen diesen Ansätzen ist gemein, dass sie keine Erklärung für das Auftreten der Fluoreszenz der hyperpigmentierten Läsionen im UV-Licht bieten.

Auch für die hypopigmentierte Variante der Pityriasis versicolor existieren verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen wurden die Depigmentierungen lange Zeit als Pseudoleukoderm angesehen, das durch die physikalische Filterwirkung von Schuppen- und Pilzauflagerungen zustande kommt (Wertheim 1928; Kistiakovsky 1927). Das Sichtbarwerden der Depigmentierungen nach UV-Bestrahlung in vormals hyperpigmentierten Arealen, sowie das Fehlen eines Erythems in den betroffenen Gebieten nach UV-Bestrahlung trotz Reaktion der umgebenden Haut wurden als Argumente für das Vorliegen eines physikalischen UV-Filters gewertet. Da die Depigmentierungen jedoch auch in nicht belichteter Haut und in schwarzer Haut auftreten (Jeliffe und Jacobson 1954), bietet die physikalische Filterwirkung allein keine ausreichende Erklärung. Auch die trotz fehlender Schuppung und erfolgreicher Eradikation der Erreger oft nur sehr zögerlich einsetzende Repigmentierung und eine nachweisbare Schädigung der Melanozyten sprechen für das Vorliegen eines echten Leukoderms bei der Pityriasis versicolor alba (Thoma et al. 2005; Galadari et al. 1992).

Aufgrund histologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen wird eine Beeinflussung der Melanogenese durch den Erreger, bzw. seine Metabolite diskutiert (Galadari et al. 1992; el-Gothamy et al. 1975). Jung und Bohnert konnten eine Hemmung der Tyrosinase, dem Schlüsselenzym der Melaninbiosynthese, durch einen Extrakt aus Schuppen der Pityriasis versicolor nachweisen (Jung und Bohnert 1976). Diese Wirkung wurde auf Metabolite der *Malassezia*-Hefen, Dicarbonsäuren, insbesondere die Azelainsäure, zurückgeführt, welche als Inhibitoren der Tyrosinase fungieren (Nazzaro-Porro und Passi 1978). Spätere Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Azelainsäure keine Wirkung auf normale Melanozyten zeigt, und so eine Verursachung der Depigmentierungen bei Pityriasis versicolor unwahrscheinlich erscheint (Robins et al. 1985; Breathnach et al. 1984). Von de Luca wurde eine Schädigung der Melanozyten durch Lipoperoxide und ihren Nebenprodukten angenommen (De Luca et al. 1996). Da Lipoperoxidasen jedoch regelmäßig aus *Malassezia*-

Kulturen isoliert werden und die *Malassezia*-Hefen als Kommensale auf menschlicher Haut vorkommen, müsste eine Schädigung der Melanozyten mit daraus resultierender Depigmentierung bei jedem Menschen in mit *Malassezia*-Hefen besiedelten Arealen vorkommen.

1.3.4.2. Metabolite des Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsels als Erklärungsmodell für die Symptome der Pityriasis versicolor

Ein neuer Erklärungsansatz für die verschiedenen Charakteristika der Pityriasis versicolor könnte sich aus dem von Mayser et al. beschriebenen Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsel ergeben (Mayser et al. 1998b). So können die unterschiedlichen Farbschattierungen der Hyperpigmentierungen durch die variierenden Anteile der verschiedenfarbigen Einzelsubstanzen im Pigmentgemisch begründet sein. Außerdem zeigt das Pigmentgemisch eine gelblich-grüne Fluoreszenz im UV-Licht.

Verschiedene Metabolite können bei der Entstehung der Depigmentierungen eine Rolle spielen. Einige Substanzen, wie beispielsweise Keto-Malassezin, Malasseziaindol A und O52, zeigen *in vitro* eine Hemmung der Tyrosinase (Krämer et al. 2004; Thoma 2003; Dahms et al. 2002). Außerdem konnte mit Malassezin ein Arylhydrocarbonrezeptor-Agonist identifiziert werden, der Apoptose in menschlichen Melanozyten induzieren kann (Krämer et al. 2005b).

Auch für das fehlende, bzw. gering ausgeprägte entzündliche Infiltrat bietet der Tryptophan-abhängige Pigmentstoffwechsel eine Erklärung. Die Pityriarubine A, B und C sind selektive Inhibitoren des granulozytären Bursts und können darüber antiinflammatorisch wirksam sein (Krämer et al. 2005a).

Die im Vergleich mit anderen depigmentierenden Erkrankungen deutlich reduzierte Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht kann unter anderem durch Pityriacitrin bedingt sein. Pityriacitrin zeigt eine, wenn auch relativ schwache, UV-Filterwirkung (Gambichler et al. 2007; Mayser et al. 2002; Mayser und Pape 1998).

Bislang ist es nicht gelungen, die Pigmente aus Hautschuppen an Pityriasis versicolor Erkrankter zu isolieren. Auch ist der Tryptophan-abhängige Pigmentstoffwechsel nur in *M. furfur* und einigen *M. pachydermatis*-Stämmen beobachtet worden, so dass der Zusammenhang zwischen Pigmentsynthese und Pathogenese der Erkrankung noch nicht bewiesen werden konnte.

2. PROBLEMSTELLUNG

Hefen der Gattung *Malassezia* gelten als Erreger der Pityriasis versicolor, einer häufigen, mit Pigmentverschiebungen einhergehenden Dermatose. Der unlängst für *M. furfur* beschriebene Tryptophan-abhängige Pigmentstoffwechselweg bietet ein plausibles Erklärungsmodell für die verschiedenen Charakteristika der Erkrankung. Bisher konnte ein Zusammenhang des Pigmentstoffwechsels mit der Erkrankung jedoch nicht nachgewiesen werden. Zudem sind die *Malassezia*-Hefen bislang kaum molekularbiologisch untersucht.

Daraus ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Lassen sich mittels cDNA-Subtraktions-Verfahren während der Pigmentsynthese differentiell exprimierte Gene nachweisen?
2. Um was für Gene handelt es sich und finden sich Homologien zu Genen aus Pigment-/ Tryptophan-/ Indolalkaloidstoffwechselwegen anderer Organismen?
3. Gibt es Sequenzen, die in den Modellstoffwechselweg nach Irlinger et. al. eingeordnet werden können?
4. Lassen sich molekularbiologische Verfahren zur Expressionsanalyse differentiell exprimierter Sequenzen sowie Housekeeping-Gene erarbeiten?
5. Lassen sich Sequenzen identifizieren, die für eine Überprüfung in läsionaler Haut bei PV geeignet sind (stabile Expression über einen langen Zeitraum)?
6. Lassen sich bei einer interessanten Sequenz und einem Housekeeping-Gen genomische Sequenz und Open Reading Frame identifizieren?
7. Lassen sich gleichzeitig Grundlagen für weiterführende Untersuchungen wie die Erarbeitung eines Transformationssystems zur homologen Genrekombination für die *Malassezia*-Hefen erarbeiten?
8. Wie lassen sich die hier gewonnenen Ergebnisse in die Entschlüsselung der Pathogenese der Pityriasis versicolor integrieren?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Vorarbeiten Dritter

3.1.1. cDNA Subtraktion

Hort et al. haben unter Verwendung des PCR-Select cDNA Subtraction Kits (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F) eine cDNA-Subtraktion zur Ermittlung während der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese differentiell exprimierter Sequenzen publiziert (Hort et al. 2008). In Abbildung 13 ist eine Übersicht des Verfahrens abgebildet. Die cDNA-Subtraktion ermöglicht ohne Kenntnis des Genoms die selektive Amplifizierung solcher mRNA-Transkripte, die von der einen Population exprimiert werden (Tester), jedoch in einer Kontrollpopulation (Driver) nicht vorkommen. Ausgehend von der Annahme, dass *M. furfur* bei Pigmentbildung die Transkription von Genen hochreguliert, die in nicht pigmentbildenden Kulturen nicht oder kaum exprimiert werden, wurde als Testerpopulation *M. furfur* in Trp-Medium kultiviert und mit *M. furfur* in Arg-Medium als Driverpopulation verglichen.

Die Pigmentbildung der Trp-Kulturen wird nach etwa 12 Stunden sichtbar. Da die Hochregulation der beteiligten Gene schon deutlich früher beginnen muss, wurde die Subtraktion 3 Stunden und 5 Stunden nach Pigmentinduktion durchgeführt.

Hort et al. inserierten die bei den Subtraktionen anfallenden Sequenzen in TOPOII-Vektoren (Invitrogen, Mannheim, D) und transformierten sie in *Escherichia coli* (DH5 α , Invitrogen). Außerdem wurden aus einer gelelektrophoretischen Auftrennung der subtrahierten cDNAs prominente Banden ausgeschnitten und in *E. coli* transformiert. Da bei der Subtraktion neben den differentiell exprimierten cDNAs auch ein sogenannter Background aus nicht differentiell exprimierten Sequenzen zu erwarten ist (Gurskaya et al. 1996; Diatchenko et al. 1996), wurden die 5-Stunden-Sequenzen mittels reverse Northern Blot auf differentielle Expression gescreent und differentiell exprimierte Inserts sequenziert.

Bestandteil der vorliegenden Dissertation sind nun Screening und Sequenzierung der „3-Stunden-Klone“ und der Klone, die die ausgeschnittenen Banden trugen, darüber hinaus die Sequenzanalyse und die Abgleiche der Sequenzen beider Zeitpunkte in entsprechenden Gendatenbanken.

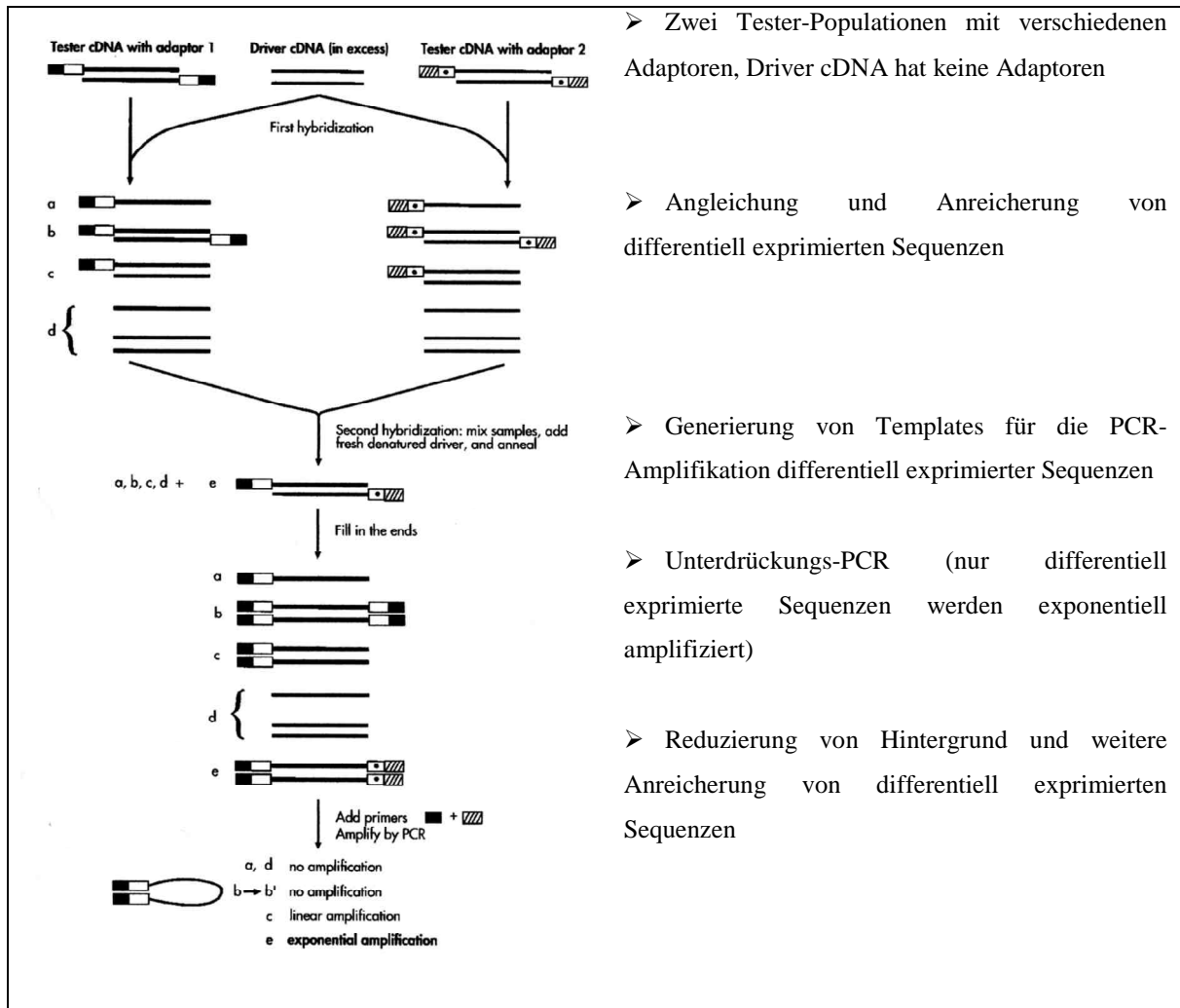


Abbildung 13: Schematische Darstellung der cDNA-Subtraktion

(Diatchenko et al. 1996)

3.2. Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen

Lebende, vermehrungsfähige Mikroorganismen wurden stets unter einer Laminar Airflow Sicherheitsarbeitsbank (Gerätetyp UVUB1200, Uniequip, Martinsried, D) unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Glasgegenstände (Schott, Mainz, D), Verbrauchsmaterialien und Lösungen und Medien wurden, soweit möglich, vor Benutzung autoklaviert (Autoklav 23, Melag, Berlin, D). Temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Millex Spritzenfilter, 0,22µm, Millipore, Schwalbach, D).

3.2.1. Anzucht und Kultivierung von *E. coli*

3.2.1.1. Festmedium

Freundlicherweise stellte Frau Dr. Hort die von ihr bereits in *E. coli* inserierten Sequenzen aus der nach 3 Stunden durchgeführten cDNA-Subtraktion für die weitere Untersuchung zur Verfügung. Da der verwendete TOPO II Vektor als Selektionsmarker eine Ampicillinresistenz enthält, wurden die Bakterien auf LB-Amp-Agar in Petrischalen (10cm Ø, Nunc, Roskilde, DK) verimpft. Es wurden frische Kulturen, die über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Heräus Typ B6200, Thermo Fisher Scientific, Bonn) herangezüchtet worden waren, verwendet.

LB-Amp-Agar (Amp.-Konzentration 50µg/ml)	100ml	Ampicillin-Stammlösung	1ml
LB-Agar* (Roth, Karlsruhe, D)	4g	Ampicillin-Natriumsalz (Roth)	50mg
Mit Aqua dest auf 100ml auffüllen		In 1ml Aqua dest lösen, sterilfiltrieren	
nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C		Aufbewahrung bei -20°C	
Ampicillin-Stammlösung	100µl		

*Zusammensetzung LB-Agar gemäß Herstellerangaben:
Trypton 10g/l, Yeast Extract 5g/l, NaCl 10g/l, Agar 15 g/l

3.2.1.1.1. Klonierung

Von der ursprünglichen LB-Amp-Agar-Platte mit den „3-Stunden-Transformanten“ und den „Gelbänden-Klonen“ wurden Einzelkolonien gepickt (Pipettenspitzen, Sarstedt, Nümbrecht, D) und auf durchgehend nummerierte Felder auf frischen LB-Amp-Platten verimpft. Diese Nummerierung wurde während aller Versuche beibehalten.

3.2.1.2. Flüssigmedium

In Flüssigmedium, LB-Amp-Broth, ebenfalls mit Ampicillin als Selektionsmarker, wurden die *E. coli* Bakterien über Nacht bei 37°C kultiviert.

LB-Amp-Broth	100ml
LB-Broth* (Roth)	2,5g
Mit Aqua dest auf 100ml auffüllen	
nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C	
Ampicillin-Stammlösung	100µl

*Zusammensetzung LB-Broth gemäß Herstellerangaben:
Trypton 10g/l, Yeast Extract 5g/l, NaCl 10g/l

3.2.1.3. Konservierung in Glycerinstocks

Die *E. coli*-Klone wurden in nummerierten 96-Well-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, D) konserviert. Dazu wurde jedes Well mit 100µl LB-Amp-Broth befüllt und mit je einem *E. coli*-Klon beimpft (Pipetten: Feinpipetten Research 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl und Feinpipetten Research Pro 0,5-10µl, 5-100µl, Eppendorf, Hamburg, D). Die Platten wurden bei 37°C über Nacht im Wasserbad (Typ 1092, GFL, Burgwedel, D) inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit Glycerin (85%) (Roth) im Verhältnis Glycerin : LB-Broth 1,5 : 1 versetzt und für eine Stunde auf Eis gestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70°C.

Sollte während der Übernachtskultur nicht genug gewachsen sein, wurden die entsprechenden Kulturen bei 4000rpm 5 Minuten zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wurde in 100µl LB-Broth gelöst und mit 150µl Glycerin überschichtet und wie oben beschrieben eingefroren.

Für spätere Arbeitsschritte wurde zur Wiederanzucht etwas Flüssigkeit aus den Glycerinstocks entnommen, auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2. Anzucht und Kultivierung von *Malassezia furfur*

3.2.2.1. Festmedien

Malassezia furfur CBS 7019 wurde auf modifiziertem Dixon-Agar angezüchtet (Gueho et al. 1996). Hierzu wurde von der ursprünglichen Agarplatte, bzw. aus in Flüssigstickstoff eingefrorenen Kulturen, mit einem sterilen Wattestäbchen (Karl Beese, Barsbüttel, D) etwas Pilzmaterial entnommen und gleichmäßig auf einer neuen Platte ausgestrichen.

Zur Erhaltung der Kulturen wurden die *Malassezia spp.* alle 2 Wochen neu ausgestrichen. Nach einigen Monaten wurden die alten Kulturen verworfen und die Pilze frisch aufgetaut.

mDixon-Agar	100ml
Malzextrakt (Merck)	3,6g
Ochsengalle(Merck)	2g
AgarAgar(Merck)	1,2g
Pepton (aus Casein) (Merck)	0,6g
Cycloheximid (Merck)	0,04g
Chloramphenicol-Stammlösung	0,8ml (5mg)
mit Aqua dest auf 100ml auffüllen	
nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C	
Tween 40 (Sigma-Aldrich, München, D)	1ml
Olivenöl (Apotheke des Universitätsklinikums)	400µl

Chloramphenicol-Stammlösung	50ml
Chloramphenicol (Merck)	312,5mg
In 50ml Aqua dest lösen, sterilfiltrieren	
sterilfiltrieren	

3.2.2.2. Flüssigmedien

Für 400 ml 1b-Flüssigkultur wurden 5-8 Platten 2-5 Tage alter Dixon-Kulturen mit einem sterilen Metallspatel entnommen, mit 10 ml 0,9% NaCl-Lösung (B. Braun, Melsungen, D) gewaschen (3.500rpm für 5min.) und die Pellets zunächst im 1b-Glycinflüssigmedium gelöst. Nach 2-5 Tagen konnten diese Kulturen für Versuche verwendet werden. Sollten Kulturen in Pigmentinduktionsmedium (1b-Trp-Medium) bzw. 1b-Arg-Medium überführt werden, wurden je 200ml Glycinkultur für 400ml Trp-/Arg-Medium abzentrifugiert und in 10 ml 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und anschließend im entsprechenden Medium gelöst.

1b-Flüssigmedium	100ml
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,1g
MgSO ₄ (Merck)	0,05g
15mM der jeweiligen Aminosäure	
mit Aqua dest auf 100ml auffüllen	
nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C	
Chloramphenicol-Stammlsg.	2ml (0,0125g)
Tween 80 (Sigma-Aldrich)	3ml

1b-Gly-Flüssigmedium	100ml
1b-Flüssigmedium	100ml
15mM Glycin (Sigma-Aldrich)	0,11g

1b-Arg-Flüssigmedium	100ml
1b-Flüssigmedium	100ml
15mM Arginin (Sigma-Aldrich)	0,26g

1b-Trp-Flüssigmedium	100ml
1b-Flüssigmedium	100ml
15mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich)	0,3g

3.3. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden gemäß Sambrook et. al (Sambrook und Russel 2001) durchgeführt.

3.3.1. Isolation von Nukleinsäuren

3.3.1.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidextraktion wurde mit *E. coli* Zellen aus 1 ml LB-Broth durchgeführt. Dazu wurde der jeweilige Klon gepickt und über Nacht in 1 ml (Safelock Tubes, Eppendorf) LB-Broth bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Die Kulturen wurden für 25 sek bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde durch vortexen (Vortex Genie, Bender & Hobein, Zürich, CH) in 300µl „P1“-Lösung resuspendiert, welcher zur Elimination von RNA zuvor RNase A zugesetzt worden war. Nach Zugabe der Lösung „P2“ wurden die Zellen durch vorsichtiges Schütteln lysiert. Anschließend wurden die hochmolekulare

genomische DNA und die Proteine durch Zugabe von Kaliumacetat-Lösung „P3“ und anschließender Zentrifugation für 5min bei 13.000 rpm gefällt. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde mittels Zentrifugation für 10min bei 13.000rpm in 0,8vol.% Isopropanol (Merck) gefällt. Das Pellet wurde in 70% Ethanol (Roth) gewaschen (5min. bei 13.000rpm), luftgetrocknet und anschließend in 20µl H₂O aufgenommen.

P1 (RNase-A-Lösung) 200ml		P2 (Lysis-Lösung) 200ml	
50mM Tris-HCl (Roth)	1,21g	200mM NaOH (Merck)	40ml 1M NaOH
10mM EDTA (Sigma)	0,74g	1% SDS (Merck)	20ml SDS 10%
mit Aqua dest auf 200 ml auffüllen		mit Aqua dest auf 200 ml auffüllen	
pH mit NaOH auf 8,0 einstellen			
Nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C			
0,01% RNase A (Sigma)	0,02g	P3 (Präzipitations-Lösung) 200ml	
		3M Kaliumacetat (Roth)	58,89g
		pH mit NaOH auf 5,5 einstellen	
		mit Aqua dest auf 200 ml auffüllen	

3.3.1.2. Isolation von genomischer DNA aus *Malassezia*-Hefen

3.3.1.2.1. Phenol-Chloroform-Methode

Von einer 2-5 Tage alten *Malassezia*-Kultur in Glycin-Flüssigmedium wurden 5-10ml abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500µl Aqua dest gelöst und für 5 sek zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet im restlichen Wasser mittels Vortex resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Lysis-Solution und 300µg salzsäuregewaschenen Glassbeads (Sigma-Aldrich) wurde das Gemisch kurz gevortext und 200µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth) zugefügt. Nach Überprüfung, dass beim Vortexen keine Flüssigkeit aus dem Tube austrat, wurde die Probe für 30 min. gevortext und 200µl TE-Puffer hinzugefügt. Die Probe wurde bei 13.000rpm für 5min zentrifugiert, und die obere Phase in ein neues 1,5ml Tube überführt. Die enthaltene DNA wurde in 96% Ethanol (Riedel-de Haen, Seelze, D) für 1 Stunde bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die Probe für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Ein RNase-Verdau wurde durchgeführt, indem das Pellet in 400µl TE-Puffer gelöst wurde, 3µl RNase A-Lösung zugegeben wurde und das Gemisch für 30 min bei 37°C im geschüttelt wurde (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Im Anschluss wurde die DNA mit 10µl einer 4M Ammoniumacetat-Lösung in 1ml 96% Ethanol für mindestens 30 min bei -20°C präzipitiert. Eine Lagerung der Probe bei -20° über Nacht war ebenfalls möglich. Abschließend wurde die Probe für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 50µl Aqua dest aufgenommen.

1M Tris pH 8,0	200ml
1M Tris-HCl	31,52g
mit Aqua dest auf 100 ml auffüllen	
mit NaOH pH auf 8,0 einstellen	
mit Aqua dest auf 200 ml auffüllen	

5M NaCl	100ml
5M NaCl	29,2g
mit Aqua dest auf 100 ml auffüllen	

Lysis-Solution	100ml
2% TritonX 100 (Sigma)	2ml
1% SDS	10ml SDS 10x
100mM NaCl (Roth)	2ml 5M NaCl
10mM Tris (Roth)	1ml 1M Tris, pH8
1mM EDTA	200µl 0,5M EDTA
mit Aqua dest auf 100 ml auffüllen	

TE 10x	500ml
1M Tris-HCl	78,8
0,01 M EDTA	18,6g
pH mit NaOH auf 7,5-8,0 einstellen	
mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen	

4M Ammoniumacetat-Lösung	100ml
4M Ammoniumacetat (Roth)	30,8g
mit Aqua dest auf 100 ml auffüllen	

0,5M EDTA	100ml
0,5M EDTA	18,6g
pH auf 8,0 einstellen	
mit Aqua dest auf 100ml auffüllen	

3.3.1.2.2. Qiagen QIAamp DNA Mini Kit

Das Qiagen QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) wurde gemäß Herstellerangaben verwendet. Eine reiskorngroße Menge Pilzkultur wurde in 180µl ATL-Puffer mittels Vortex suspendiert. Nach Zugabe von 20µl Proteinase K wurde die Zellwandlyse für mindestens 30 min bei 56°C im Thermomixer durchgeführt. Zwischendurch wurde die Probe wiederholt gevortext. Die Probe wurde kurz anzentrifugiert, um Partikel vom Rand des Tubes abzulösen, und 200µl AL-Puffer dazugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurde die Probe bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Ethanol 96% wurde das komplette Gemisch inklusive aller festen Bestandteile auf ein Säulchen gegeben und bei 8000rpm für 1min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einem Collection-Tube aufgefangen und verworfen. Nach Zugabe von 500µl AW1-Puffer, Zentrifugation bei 8000rpm für 1min und nochmaligem Verwerfen des Durchflusses, wurden 500µl AW2-Puffer auf das Säulchen gegeben. Nach Zentrifugation bei 13.000rpm für 3 min. wurde das Säulchen in einem neuen C-Tube noch einmal für 1min. bei 13.000rpm zentrifugiert und in ein sauberes 2ml Tube gesetzt, da keine Reste von AW2-Puffer in der DNA enthalten sein dürfen. Die DNA wurde für 5 min. bei RT mit 100µl Aqua dest. aus dem Säulchen gelöst, zur Sicherheit das Säulchen noch einmal mit 100µl Aqua dest für 15min stehen gelassen und die restliche DNA durch Zentrifugation bei 8000rpm für 1min heraus gewaschen. Dieses Protokoll ergab jedoch eine geringere Ausbeute als die Phenol-Chloroform-Methode und wurde nur verwendet, wenn in kurzer Zeit eine geringe Menge DNA benötigt wurde.

3.3.1.3. Isolation von Gesamt-RNA aus *Malassezia furfur*

Verschiedene Protokolle wurden auf ihre Anwendbarkeit bei *M. furfur* überprüft, da dieser Organismus bislang molekularbiologisch kaum untersucht ist. Entsprechend mussten gängige Protokolle und Herstellerprotokolle, zum einen an den Organismus, zum anderen aber auch an die Gegebenheiten und Möglichkeiten unseres Labors angepasst werden. Da aus der Gesamt-RNA mRNA isoliert werden sollte, wurde bei der Entwicklung des Protokolls Wert auf die Isolation möglichst großer Mengen möglichst reiner RNA gelegt.

Der Umgang mit RNA erforderte besondere Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination mit RNasen. So mussten alle Arbeitsflächen, Pipetten und Geräte regelmäßig mit RNase AWAY (Roth) abgewischt und die Handschuhe häufig gewechselt werden. Außerdem wurden RNase freie Pipettenspitzen mit Filter (MultiGuard, Roth) verwendet. Die Verbrauchsmaterialien mussten die Herstellerangabe „RNase frei“ tragen. Selbst angesetzte Puffer und Lösungen, sowie das Aqua dest. wurden nach Möglichkeit mit DEPC (Roth) behandelt. Die RNA wurde zwischen den einzelnen Arbeitsschritten stets auf Eis gestellt, um einer Degradierung bestmöglich entgegenzuwirken.

Folgende Protokolle wurden geprüft:

1. Hot Phenol
2. PeqGold RNAPure Herstellerprotokoll
3. PeqGold RNAPure für *C. glabrata* modifiziert

3.3.1.3.1. Hot Phenol

Es wurden 50 ml abzentrifugierte und bei -70°C gelagerte Flüssigkultur in einem 2ml Tube in 440 μl TE aufgetaut. Es wurden 60 μl 10%SDS und 500 μl auf 65°C erwärmtes Phenol (Roth) zugegeben und das Gemisch für 10min. bei 65°C im Thermoblock geschüttelt. Das Tube wurde in Flüssigstickstoff gegeben, bis das Phenol auskristallisierte. Anschließend wurde bei 10.000rpm für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und die Prozedur mit heißem Phenol, Flüssigstickstoff und Zentrifugation wiederholt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt, mit dem gleichen Volumen PCI gemischt und für 5 min bei RT stehen gelassen. Das Gemisch wurde mit 10.000rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 0,8 vol.% Isopropanol und 2 μl Glykogen (40 μg) (Roche, Mannheim, D) versetzt, 10min zentrifugiert und mit Ethanol 70% gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 20 μl RNase freiem Wasser aufgenommen und bei -70°C gelagert.

3.3.1.3.2. PeqGold RNAPure Herstellerprotokoll

Die Hälfte einer 50ml Flüssigkultur, die abzentrifugiert und bei -70°C gelagert worden war, wurde mit 5ml PeqGold RNAPure (PeqLab, Erlangen, D) gemischt und auf vier 2ml Eppendorf Tubes aufgeteilt. Es wurden ungefähr 0,3g säuregewaschene Glassbeads zugefügt und 15 min. gevortext. Die Probe wurde für 5 min bei RT stehen gelassen und für 10min bei 11.600rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und 0,2ml Chloroform (Merck) je eingesetztem Milliliter PeqGold RNAPure zugegeben. Die Proben wurden für 15sek kräftig geschüttelt und für 5-10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 5min bei 11.600rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Tube überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit dem gleichen Volumen Isopropanol, dem $20\mu\text{g}$ Glykogen pro ml eingesetztem PeqGold RNAPure beigefügt wurden. Die Proben wurden für 15min bei 4°C inkubiert und anschließend für 10min bei 11.600rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal in Ethanol 70% gewaschen und bei 11.600rpm und 4°C für 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in $20\mu\text{l}$ RNase freiem Wasser gelöst.

3.3.1.3.3. PeqGold RNAPure für *C. glabrata* modifiziert

Das für *C. glabrata* modifizierte Protokoll entsprach weitgehend dem PeqGold Herstellerprotokoll. Jedoch wurde die Probe nach Homogenisierung durch Vortexen mit den Glassbeads statt für 5min für 15min bei Raumtemperatur stehen gelassen, und die erste Zentrifugation wurde auf 15min verlängert. Außerdem wurde nach Zugabe des Isopropanols auf eine Inkubation für 15min verzichtet.

3.3.1.3.4. Optimiertes Protokoll

Die oben beschriebenen Verfahren ergaben entweder zu wenig oder sogar komplett degradierte RNA. Ausgehend vom Herstellerprotokoll von PeqGold RNAPure wurde für die Isolation von RNA aus *M. furfur* das folgende Protokoll erarbeitet: Je 50ml Flüssigkultur von *M. furfur* wurden in 50ml Cellstar-Polypropylenröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, D) abzentrifugiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C . Ein tiefgefrorenes Zellpellet aus 50ml Kultur wurde in $760\mu\text{l}$ Lysis-Solution und $40\mu\text{l}$ Proteinase K-Stammlösung suspendiert und auf vier 2ml Tubes aufgeteilt. Die Zellwandlyse wurde bei 65°C für 15min im Thermomixer durchgeführt und auf Eis gestoppt. Die Proben wurden mit je 1ml PeqGold RNAPure versetzt, per Vortex gemischt und 15min bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurden die Proben wieder gut gemischt und für 15min bei 11.200rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Tube überführt und die gleiche Menge Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) beigefügt. Nach gründlichem Vortexen wurden die Proben bei 11.200rpm für 10min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Tube überführt und die RNA mit 0,8 vol.% Isopropanol gefällt. Da nur geringe Mengen RNA zu erwarten waren, wurden den Proben 3,5µl Glykogen (70U pro ml PeqGold RNAPure) zugefügt. Die Proben wurden für 10min bei 11.200rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol, dem 0,05% DEPC zugesetzt waren, für 15min bei 13.000rpm gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets an der Luft wurde es in 20µl Aqua dest. aufgenommen. Mit diesem Protokoll konnte RNA mit einer für die reverse-Transkriptase-PCR ausreichenden Qualität isoliert werden.

Proteinase K-Stammlösung	5ml
20mg/ml Proteinase K (Roth)	100mg
in 5ml Aqua dest lösen	

3.3.1.4. DNase-Verdau und Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA

Die gelöste RNA wurde vorsichtig mit 30µl DNase-Verdau-Mix gemischt und der Verdau für 20-25min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Beendigung des Verdaus wurden 47,5µl Aqua dest und 2,5µl Proteinase K (50µg) beigefügt und die Reaktion im Thermoblock bei 55°C für 15-20 min geschüttelt. Die RNA wurde mit 500µl PCI extrahiert, mit 0,8 vol.% Isopropanol präzipitiert und zweimal mit 1ml Ethanol 70% mit DEPC 0,05% gewaschen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde es in 20µl Aqua dest aufgenommen und die Eluate derselben Kultur jeweils zusammengefasst. Die RNA wurde bei -70°C aufbewahrt. Eine Probe der Gesamt-RNA wurde jeweils mit ITS-Primern in einer non-RT-PCR auf persistierende Kontamination mit gDNA überprüft.

DNase-Verdau-Mix	50µl Reaktion	Finale Konzentration
10x DNase Puffer (Roche)	5µl	1x
DNase (Roche)	2µl	20U (0,4U/µl)
RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas St. Leon-Rot)	0,5µl	20U (0,4U/µl)
RNA	20µl	
Aqua dest	Auf 50µl	

3.3.1.5. Isolation von mRNA

Aus der Gesamt-RNA wurde mRNA mit dem PolyATtract-Kit (Promega, Mannheim, D) gemäß Herstellerangaben isoliert. Dieses Kit basiert auf der Hybridisierung der PolyA-Enden der mRNA an biotinylierte Oligo(dT)s und der Bindung dieser Hybride an Streptavidin-gekoppelter paramagnetischer Partikel unter stringenten Bedingungen. Während diese Partikel mit einem Magneten polarisiert werden können, verbleiben rRNA und DNA in Lösung und können entsprechend abpipettiert werden.

Es wurden 50µg Gesamt-RNA, was meist der kompletten isolierten Gesamt-RNA entsprach, mit RNase-freiem Aqua dest auf 500µl aufgefüllt und bei 65°C für 10 min denaturiert. Zur RNA wurden 13µl SSC 20x und 3µl biotinylierte Oligo(dT) gemischt und das Gemisch auf RT abgekühlt. Währenddessen wurden die Streptavidin-gekoppelten paramagnetischen Partikel (SA-PMPs) dreimal mit je 300µl SSC 0,5x gewaschen und in 100µl SSC 0,5x resuspendiert. Die Oligo(dT)-mRNA-Hybride wurden vorsichtig mit den SA-PMPs gemischt. Damit sich die Hybride an die SA-PMPs anlagern konnten, wurde das Gemisch für 10min bei RT stehen gelassen und gelegentlich durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Im magnetischen Ständer wurden die restliche DNA und rRNA in der Lösung von den an die SA-PMPs angelagerten Hybriden getrennt. Diese Lösung wurde aufbewahrt bis sicher war, dass die mRNA-Isolation erfolgreich war. Die Partikel wurden viermal mit je 300µl SSC 0,1x gewaschen. Die mRNA wurde in zwei Schritten mit 100µl und 150µl RNase-freiem Aqua dest aus den SA-PMPs gelöst. Von diesen 250µl wurden 70µl zur photometrischen Konzentrationsbestimmung eingesetzt und anschließend aufbewahrt. Die mRNA wurde bei -70°C aufbewahrt.

3.3.1.6. Photometrische Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die Absorption im Photometer (UV Photometer GeneRay, Whatman Biometra, Göttingen) bei 260nm bestimmt. Dabei entsprach eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50µg/ml, bzw. einer Konzentration einzelsträngiger DNA oder RNA von 40µg/ml. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration der DNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

$$\text{Konzentration der RNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

Durch Messung der Absorption bei 280nm kann eine Aussage über die Reinheit der RNA getroffen werden. Liegt der Quotient von A_{260}/A_{280} unter 1,8, so ist die Probe mit Proteinen oder Phenol verunreinigt.

Zur Messung der isolierten Nukleinsäuren wurden 3,5µl DNA bzw. RNA mit 66,5µl TE-Puffer verdünnt und in UV-Küvetten (mikro, Plastibrand, Brand GmbH, Wertheim, D) eingesetzt.

3.3.2. Enzymatische Reaktionen an Nukleinsäuren

3.3.2.1. Restriktionsverdau

Es wurden 1µg gDNA bzw. 1µl Plasmid-DNA in einen Restriktionsverdau eingesetzt. Die isolierten Plasmide wurden auf die erfolgreiche Insertion einer differentiellen Sequenz überprüft. Dazu wurde ein Restriktionsverdau mit Eco R1 für 2h bei 37°C durchgeführt. Nach Beendigung des Verdau wurde der gesamte Reaktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert (Kapitel 3.3.3).

Für die Inverse PCR wurde 1µg genomische DNA enzymatisch mit einem Restriktionsenzym verdaut, welches keine Schnittstelle innerhalb der bekannten Sequenz aufwies. Zur Deaktivierung des Restriktionsenzym wurde das Reaktionsgemisch für 15min auf 65°C erhitzt. Da nicht jedes Enzym hitzedeaktivierbar war, wurde die geschnittene DNA mittels phenolischer Extraktion (Kapitel 3.3.1.2.1) aus dem Reaktionsgemisch isoliert und das gewonnene Pellet in die Ligationsreaktion eingesetzt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Restriktionsverdau	20µl Reaktion	Finale Konzentration
10x Enzypuffer (Promega)	2µl	1x
Restriktionsenzym (Promega)	0,5µl	5U (0,25U/µl)
BSA (Promega)	0,2µl	0,1µg/µl
DNA / Plasmid	1µg / 1µl	
Aqua dest	Auf 20µl	

Tabelle 2: Verwendete Restriktionsenzyme

Versuch	Enzym
Plasmid-Verdau und Inverse PCR	EcoR I
Inverse PCR	BamH I
Inverse PCR	Bgl II
Inverse PCR	Xba I
Inverse PCR	Hind III
Inverse PCR	Kpn I

3.3.2.2. Ligation

Die verdaute gDNA wurde in Aqua dest gelöst und über Nacht bei 4°C durch T4-Ligase (Invitrogen) ligiert. Eine starke Verdünnung begünstigt die für die inverse PCR (Kapitel 3.3.5.6) gewünschte Ligation innerhalb eines Moleküls. Nach Beendigung der Ligationsreaktion wurde die DNA mit 1ml EtOH reinst und 20µl Ammoniumacetat für 30 min bei -20°C ausgefällt. Das Pellet wurde in 20µl Aqua dest gelöst.

Ligase-Mix	500µl Reaktion	Finale Konzentration
Verdaute gDNA	20µl	1µg
T4 Ligase 5x Puffer (Invitrogen)	100µl	1x
T4 DNA Ligase (Invitrogen)	10µl	50U (0,1U/µl)
Aqua dest	Auf 500	

3.3.3. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe. Dazu wurden entweder enzymatisch verdaute gDNA oder Plasmid-DNA, cDNA oder PCR-Produkte mit Ladepuffer versetzt und in einzelne Taschen eines 1% Agarose-Gels (Invitrogen) gegeben. Für DNA wurde als Kontrolle eine 1kb plus DNA Leiter (Invitrogen) verwendet. Gel und Laufpuffer enthielten 1xTBE. Das Gel war mit Ethidiumbromid (Roth) in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml versetzt. An das Gel wurde eine Spannung von 3-5V/cm angelegt (Powersupply PS305T, Whatman Biometra), dabei gilt die Entfernung zwischen Anode und Kathode, nicht die Länge des Gels. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald die DNA-Fragmente genügend aufgetrennt waren, d.h. wenn der Ladepuffer in der großen Kammer (Horizon 25.11, Whatman Biometra, Göttingen) etwa 4-5cm weit gelaufen war, in der kleinen Gelkammer (Horizon 58, Whatman Biometra) 2-3cm. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht betrachtet (Geldokumentationssystem BDA Digital, Whatman Biometra), fotografiert (Kamera Canon Powershot G2, Krefeld) und mittels Geldokumentationssoftware (Geldokumentation, BioDoc Analyse, Whatman Biometra) gespeichert.

TBE 10x	500ml
0,89M Tris	54g
0,89M Borsäure (Merck)	27,5g
0,02 M EDTA	3,7g
mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen	

Ficoll-Blau	25ml
25% Ficoll 400 (Pharmacia, Freiburg)	6,25g
Bromophenolblau (Sigma)	1 Spatelspitze
mit Aqua dest auf 25 ml auffüllen	

Ladepuffer B	1ml
Ficoll-Blau	400µl
mit Aqua dest auf 1ml auffüllen	

3.3.3.1. Isolation von DNA aus Agarosegelen oder Reaktionsgemischen

Zur Isolation von DNA aus Agarosegelen oder Reaktionsgemischen wurde ein DNA-Extraktionskit der Firma Fermentas gemäß Herstellerangaben verwendet. Dieses Kit basiert auf einem modifizierten Protokoll nach Vogelstein und Gillespie (Vogelstein und Gillespie 1979). Die Nukleotide werden bei einer hohen Konzentration von Salzen selektiv an speziell präparierte Silica-Partikel gebunden und in mehreren Waschschrritten von Kontaminationen gereinigt.

Das Reaktionsgemisch wurde mit dem dreifachen Volumen Binding Solution versetzt und nach Zugabe von 5µl Silica-Partikel für 5min bei 55°C inkubiert. Das Gemisch wurde für 5sek bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Silica-Partikel-DNA-Gemisch wurde viermal mit 500µl eiskalter Washing Solution für 5sek bei 13.000rpm gewaschen. Zwischendurch sollte das Pellet vollständig gelöst sein. Nach dem letzten Waschschrritt wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Zur Elution der DNA wurde das Pellet in Aqua dest gelöst, für 5min bei 55°C inkubiert und bei 13.000rpm für 5sek zentrifugiert. Das Eluat wurde abgenommen und aufbewahrt und der Elutionsschrritt wiederholt. Mitgenommene Silica-Partikel konnte man durch Zentrifugation für 30sek bei 13.000rpm entfernen. Die Prozeduren zur Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen und Reaktionsgemischen unterscheiden sich lediglich im vorangehenden Schritt zu Entfernung der Agarose bei den Gelen. Zur Isolation der DNA aus einem Agarosegel wurde nach Abschluss der Gelelektrophorese unter möglichst kurzzeitiger Visualisierung im UV-Licht ein Gelstück herausgeschnitten, welches die gewünschte DNA-Bande enthielt. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde die Agarose in 0,5 Volumen TBE-Conversion-Buffer gemischt mit 4,5 Volumen Binding Buffer für 5 min bei 55°C aufgelöst und die DNA wie beschrieben aufgereinigt. Die erhaltene DNA wird in Aqua dest, Tris (10mM, pH 8,5) oder TE-Puffer gelöst.

10mM Tris pH 8,5	200ml
10mM Tris-HCl	0,32g
In Aqua dest lösen	
mit NaOH pH auf 8,5 einstellen	
mit Aqua dest auf 200 ml auffüllen	

3.3.3.2. Alternatives Protokoll zur Isolation von DNA aus Agarosegelen und Reaktionsgemischen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit einer abgewandelten Phenol-Chloroform-Methode. Das Gelstückchen, welches das gewünschte DNA-Fragment enthielt, wurde zunächst in 400µl TE-Puffer für 10min bei 70°C erwärmt und mit einem sterilen Wattestäbchen zerkleinert. Es wurden 400µl PCI (25:24:1) zugegeben und das Gemisch für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Tube überführt, der Phenolschritt wiederholt und die obere Phase erneut in ein neues Tube überführt. Anschließend wurde die DNA für mindestens 30min bei -20°C mit 20µl 4M Ammoniumacetat-Lösung in 1ml reinem Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation bei 13.000rpm für 5min wurde das Pellet in 1ml 70% Ethanol für 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen und für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in Aqua dest aufgenommen.

3.3.4. Reverser Northern Blot

Da das Ergebnis des cDNA Subtraktionsverfahrens nicht nur differentiell exprimierte Sequenzen enthält, muss ein Screening der klonierten Sequenzen erfolgen. Die 3-Stunden-Sequenzen wurden mittels reverse Northern Blot auf ihre differentielle Expression überprüft. Der reverse Northern Blot basiert auf dem Prinzip des von Edwin Southern entwickelten Southern Blot (Southern 1975). Die Bezeichnung „reverser Northern“ kommt durch die Verwendung von in cDNA umgeschriebener RNA als Template zustande, im Gegensatz zu genomischer DNA / PCR-Produkten beim Southern Blot und RNA beim Northern Blot.

3.3.4.1. Gelelektrophorese

Zunächst wurden das komplette Produkt einer Kolonie-PCR im Verhältnis 5:1 mit Ladepuffer „B“ vermischt und gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel fotografiert. Als Standard wurde eine DIG-gelabelte DNA-Leiter (DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled, Roche) verwendet.

Um die doppelsträngige DNA im Gel in Einzelstränge aufzutrennen, wurde das Gel 2x 15 min in Denat-Lösung denaturiert und dann 30 min. in Neutral-Lösung neutralisiert. Vor dem Aufbau des eigentlichen Blots wurde das Gel in 20x SSC äquilibriert.

Denat-Lsg.	Il	Neutral-Lsg.	Il	SSC 20x	Il
0,5M NaOH	0,5l	1M Tris-HCl	157,6g	0,3M NaCitrat (Roth)	88,23g
1,5M NaCl	87,66g	mit Aqua dest auf 700ml auffüllen		3M NaCl	175g
mit Aqua dest auf 1l auffüllen		pH mit NaOH auf 7,4 einstellen		mit Aqua dest auf 1l auffüllen	
		mit Aqua dest auf 1l auffüllen			

3.3.4.2. Blotting

Das Gel wurde mit den Taschen nach unten auf eine in 20x SSC getränkte Brücke aus 3MM Chromatographiepapier (Whatman, Dassen) gelegt. Die beiden Enden der Brücke reichten in mit 20x SSC gefüllte Behälter, so dass die Brücke während des gesamten Transfers mit 20x SSC getränkt blieb. Um ein Vorbeilaufen der Salzlösung zu verhindern, wurden die Ränder des Gels mit Frischhaltefolie (Melitta Toppits, Minden) bedeckt. Auf das Gel wurde ein entsprechend großes Stück positiv geladene Nylonmembran (Roche) gelegt, auf die Membran 2 in 20x SSC getränkte Stücke 3MM Chromatographiepapier und darauf wiederum ein Stapel Papiertücher, die mit einem Gewicht beschwert wurden. Nach einer Transferzeit von 16-20 Stunden wurde die Membran in 2x SSC gewaschen und bei 80°C für 2 Stunden gebacken, um die DNA auf der Membran zu binden. Anschließend wurde die Membran in eine Plastiktüte (autoklavierbare Entsorgungsbeutel, Roth) eingeschweißt und entweder bei 4° gelagert oder direkt weiterverwendet.

3.3.4.3. Dig-Labeling der Sonden

Als Sonden dienten unsubtrahierte aber bereits Adaptor-ligierte cDNAs nach dem ersten PCR-Schritt aus der Subtraktion. Dabei wurde cDNA aus der 3-Stunden-Tryptophankultur als Positivsonde und cDNA aus der 3-Stunden-Argininkultur als Negativsonde verwendet.

1µl der unsubtrahierten cDNA wurden in die Reaktion eingesetzt. Die PCR beinhaltete 12-15 Zyklen à 30sek bei 94°C, 30sek bei 68°C und 90sek bei 72°C. Abschließend wurde die Probe auf 4°C gekühlt.

PCR-Mix für Labeling	DIG-	25µl PCR-Reaktion	finale Konzentration
10x PCR-Puffer (Clontech)		2,5µl	1x
dNTPs (Dig-gelabelt: ungelabelt 2:3) (Roche)		2,5µl	0,2mM dNTPs 0,07mM DIG 11dUTP
Nested Primer 1 (10µM)		1µl	0,4µM
Nested Primer 2R (10µM)		1µl	0,4µM
50x BD Advantage cDNA-Polymerase (Clontech)		0,5µl	1x
Aqua dest			Auf 25µl
Template		1µl	

Nested Primer1	5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
Nested Primer 2R	5'-AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'

3.3.4.4. Hybridisierung

Die Membranen wurden zunächst mit der Argininsonde hybridisiert, gestrippt und dann mit der Tryptophansonde hybridisiert. Die Membran wurde mit 42°C warmem Dig Easy Hyb (Roche) in eine Rollerflasche (Schott) gegeben und für 1 Stunde bei 42°C im Hybridisierungsofen (Typ 7601, GFL) prähybridisiert. Falls eine frische Dig-gelabelte Sonde verwendet werden sollte, wurde diese 5 min. in 95° heißem Wasser denaturiert, anschließend sofort auf Eis gestellt und in 68°C warmes Dig Easy Hyb gegeben. Bereits verwendete Sonden wurden auf 68°C erwärmt. Die Prähybridisierungsflüssigkeit wurde abgegossen und aufbewahrt, da sie bis zu dreimal wiederverwendet wurde. Nach Zugabe der Hybridisierungsflüssigkeit wurden die Membranen über Nacht mit den Sonden bei 42°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgegossen und bei -20°C aufbewahrt, sie konnte bis zu fünfmal verwendet werden. Die Membran wurde zunächst zweimal für 5min bei Raumtemperatur in Low Stringency Buffer und anschließend zweimal für 15 min bei 68°C mit High Stringency Buffer (vorgewärmt) gewaschen.

Low Stringency Buffer	500ml	High Stringency Buffer	500ml	SDS 10x	500ml
2x SSC	50ml SSC 20x	0,1x SSC	2,5ml SSC 20x	10% SDS	10g
0,1% SDS	5ml SDS 10%	0,1% SDS	5ml SDS 10%	mit Aqua dest auf 500ml auffüllen	
mit Aqua dest auf 500ml auffüllen		mit Aqua dest auf 500ml auffüllen			

3.3.4.1. Chemilumineszenz-Detektion

Die Membran wurde für 5 min bei Raumtemperatur in Washing Buffer gewaschen und mit Blocking Solution für 60 min geblockt. Anschließend wurde die Membran für 30min mit Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal für 10 min mit Washing Buffer gewaschen und 5 min in Detection Buffer äquilibriert. Die Membran wurde in einen aufgeschnittenen Entsorgungsbeutel gelegt und 500µl Chemilumineszenz-Lösung (Roche) gleichmäßig auf der Membran verteilt. Der Beutel wurde schnell zugeklappt und die Chemilumineszenz-Lösung für 5 min einwirken gelassen. Dann wurde die Membran in einen neuen Beutel gegeben und der Beutel zugeschweißt. Die Membranen konnten eingeschweißt im Dunkeln bei 4°C für mehrere Monate gelagert werden.

Die Lichtemission der Chemilumineszenz gefärbten Membranen nahm während 24 Stunden zu, aber bereits nach ca. einer halben Stunde reichte die Emission zur Schwärzung eines Lumifilms (Roche). Die Kontaktzeit von Membran und Lumifilm in einer Röntgenkassette betrug 10-60 Minuten. Anschließend wurde der Film für etwa 5 min in Entwicklerlösung

(Adefo-Chemie, Dietzenbach) getaucht, zwischengewässert und 10 min ins Fixierbad (Adefo-Chemie) gelegt und zwischendurch leicht geschüttelt. Der Film wurde unter fließend Wasser abgespült, noch einmal 20 min gewässert und an der Luft getrocknet. Die Lumifilme wurden eingescannt und die Hybridisierungsmuster der Arginin-Sonde mit denen der Tryptophan-Sonde verglichen.

Maleic Acid Buffer	1l
0,1M Maleinsäure (Roth)	11,6g
0,15M NaCl	8,766g
Mit Aqua dest auf 700ml auffüllen	
pH mit NaOH auf 7,5 einstellen	
Mit Aqua dest auf 1l auffüllen	

Detection Buffer	1l
0,1 M Tris-HCl	15,76g Tris-HCl
0,1M NaCl	5,84g NaCl
Mit Aqua dest auf 700ml auffüllen	
pH mit NaOH auf 9,5 einstellen	
Mit Aqua dest auf 1l auffüllen	

Wasch-Lsg.	100ml
Maleic Acid Buffer	99,7ml
Tween 20 (Sigma)	3ml

Antibody-Lsg. (1:10 ⁴)	20 ml
Anti-DIG-Antikörper	2µl
Blocking Solution	20ml Blocking Solution 1x

Blocking Lsg. (10x)	100ml
Blocking Pulver (Roche)	10g
Mit Maleic Acid Buffer auf 100ml auffüllen	
Auf Heizblock lösen, dann autoklavieren	

3.3.4.2. Stripping der Dig-gelabelten DNA-Sonde

Die Membran durfte vor dem Strippen nicht trocknen. Nach der Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran mit Aqua dest abgespült und zweimal bei 37°C mit Stripping-Solution gewaschen. Die Membran wurde dann für fünf Minuten in 2x SSC geschüttelt und anschließend entweder feucht eingeschweißt oder direkt prähybridisiert. Gestrippte Membranen wurden zwei Stunden lang prähybridisiert.

Stripping-Lsg.	500ml
0,2M NaOH	100ml NaOH 1M
0,1% SDS	5ml SDS 10%
Mit Aqua dest auf 500ml auffüllen	

3.3.5. PCR-Verfahren

3.3.5.1. Standard-PCR

Standard-PCR-Mix	25µl	finale Konzentration
10x PCR-Puffer (Invitrogen)	2,5µl	1x
MgCl ₂ (50mM) (Invitrogen)	0,75µl	1,5mM
dNTPs (10mM) (Promega)	0,5µl	0,2mM
Primer forward (10µM)	0,5µl	0,2µM
Primer reverse (10µM)	0,5µl	0,2µM
Taq-Polymerase (Invitrogen)	0,1µl	0,5U
Aqua dest	Auf 25µl	

Standard PCR Programm	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Gesamte PCR	105°C Deckel des Gerätes		
Initiale Denaturierung	94°C	2 min.	1 x
Denaturierung	94°C	30 sek.	} 35 x
Primeranlagerung (Annealing)	Primerabhängig	30 sek.	
Sequenzverlängerung (Elongation)	72°C	1 min.	
Finale Elongation	72°C	10 min.	1 x
Kühlung	4°C	∞	1 x

3.3.5.2. Kolonie-PCR

Mit jedem der 3-Stunden-E. coli-Klone wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Primer sind mit ihren Annealingtemperaturen in Tabelle 3 angeführt.

Für die Kolonie-PCR wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein wenig Bakterienmaterial von einer Übernachtskultur gepickt und in 15µl Aqua dest. gelöst. Die Bakterienzellen wurden für 5 min. bei 94°C aufgebrochen. Anschließend wurde der Standard- PCR-Mix vorsichtig untergemischt und die PCR gestartet.

Tabelle 3: Primer für die Kolonie-PCR

Primer Name	Annealing Temperatur	Sequenz
Nested Primer1	} 55	5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
Nested Primer 2R		5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

3.3.5.3. Reverse Transkriptase PCR

Für die cDNA-Synthese wurden 2,5ng mRNA bzw. 500ng Gesamt-RNA pro 10µl cDNA-Synthese-Reaktion eingesetzt, d.h. für einen 30µl cDNA-Ansatz wurden 7,5ng mRNA bzw. 1,5µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit RNase freiem Aqua dest auf 15µl eingestellt und mit 1,5µl Oligo(dT)₁₅-Primern (Promega) und 1,5µl dNTPs gemischt. Um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen, wurde das Gemisch für 5min auf 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt, um eine erneute Ausbildung der

Sekundärstrukturen zu vermeiden. Nach Zugabe von 6µl 5x First Strand Puffer (Invitrogen), 3µl DTT (Invitrogen) und 1,5µl RNase Inhibitor, wurde das Reaktionsgemisch für 2min auf 42° C eingestellt und 1,5µl SuperScriptII Reverse Transkriptase (Invitrogen) beigefügt. Die cDNA-Synthese fand für 90 min bei 42°C statt. Zur Beendigung der Reaktion wurde sie für 15 min auf 70°C erhitzt und dann auf 4°C abgekühlt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.3.5.4. Degenerate PCR

Da zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Dissertation keine Sequenzinformationen zu Housekeeping-Genen aus *M. furfur* vorlagen, die als interner Standard für die weiteren Versuche verwendet werden konnten, mussten diese zunächst mittels degenerate PCR ermittelt werden. Als Zielsequenz wurde die Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase (das *sdh2*-Gen) ausgewählt.

Um eine unbekannte Gensequenz in einem Organismus aufzuklären, kann eine „degenerierte PCR“ angewendet werden. Da die meisten Aminosäuren durch mehrere Nukleotidtriplets kodiert werden, können sich auch hochkonservierte Proteinregionen in verschiedenen Organismen in ihrer Nukleotidsequenz voneinander unterscheiden. Tryptophan wird beispielsweise nur durch das Codon „TGG“, Leucin dagegen durch die Codons „CTT“, „CTC“, „CTA“, „CTG“, „TTA“ und „TTG“ kodiert (Tabelle 4, in Anlehnung an Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) 1985). Die vereinfachte Schreibweise für die unspezifischen Nukleotide ist in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 4: Standard Codons der Aminosäuren

Anzahl der Codons	Aminosäure	Abk.	Codon	Vereinfacht/ „Wobble“-Codon
1	Met	M	ATG	ATG
1	Trp	W	TGG	TGG
2	Tyr	Y	TAT TAC	TAY
2	Phe	F	TTT TTC	TTY
2	Cys	C	TGT TGC	TGY
2	Asn	N	AAT AAC	AAY
2	Asp	D	GAT GAC	GAY
2	Gln	Q	CAA CAG	CAR
2	Glu	E	GAA GAG	GAR
2	His	H	CAT CAC	CAY
2	Lys	K	AAA AAG	AAR
3	Ile	I	ATT ATC ATA	ATH
4	Gly	G	GGT GGC GGA GGG	GGN
4	Ala	A	GCT GCC GCA GCG	GCN
4	Val	V	GTT GTC GTA GTG	GTN
4	Thr	T	ACT ACC ACA ACG	ACN
4	Pro	P	CCT CCC CCA CCG	CCN
6	Leu	L	CTT CTC CTA CTG TTA TTG	YTN
6	Ser	S	TCT TCC TCA TCG AGT AGC	WSN
6	Arg	R	CGT CGC CGA CGG AGA AGG	MGN
3	STOPP	.	TAA TAG TGA	TRR

Tabelle 5: Vereinfachte Schreibweise der Nukleotide

Nukleotide	Vereinfachte Schreibweise
G/A	R
T/C	Y
A/C	M
G/T	K
G/C	S
A/T	W
A/C/T	H
G/T/C	B
G/C/A	V
G/A/T	D
G/A/T/C	N

3.3.5.4.1. Primerdesign für degenerate PCR

Für das Design der degenerierten Primer wurde eine NCBI tblastn-Suche (Proteinsequenz gegen in Aminosäuresequenz übersetzte Nukleotidsequenzen) mit der Sequenz von UM00844, Sdh2, dem Succinatdehydrogenase [ubiquinone] Iron-Sulfur-Protein, mitochondrial precursor, aus der mips MUMDB (Munich Information Centre for Protein Sequences, mips *Ustilago maydis* Data Base, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) durchgeführt. Diese Sequenz und 9 ihrer BLAST-Treffer wurden in MegAlign (Lasergene Version 5, DNASTAR, Madison, USA) und Geneious (Version 4.5.4, Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland) geladen und im Clustal W-Mode angeglichen. Die Konsensussequenz wurde in EditSeq (Lasergene Version 5, DNASTAR) in die Nukleotidsequenz übersetzt. Aus den Regionen, die als konserviert angezeigt wurden, wurden Primer designt und mittels IDT SciTools OligoAnalyser 3.0 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) überprüft. Die Sequenzen der Primer sowie die ermittelten Annealingtemperaturen sind in Tabelle 18 angeführt.

3.3.5.4.2. Degenerate PCR

Die degenerate PCR wurde mit gDNA und mit cDNA im Standard-PCR-Programm durchgeführt. In Abweichung vom Standard PCR-Mix wurden statt 0,2 µM Primer 0,5µM Primer in die Reaktion eingesetzt. Für die verwendeten Primer wurden die optimalen PCR-Bedingungen anhand gelelektrophoretischer Überprüfung der PCR-Produkte ermittelt. Zeigte die PCR mehrere Banden in der Gelelektrophorese, wurden die prominentesten Banden ausgeschnitten und aufgereinigt, als Template in die PCR eingesetzt und anschließend zur Sequenzierung gegeben. Anhand derjenigen erhaltenen Sequenzen, die im NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) eine deutliche Ähnlichkeit zu annotierten

Succinatdehydrogenase-Sequenzen zeigten, wurden mit der IDT SciTools PrimerQuestSM-Software (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) Primer für die semiquantitative PCR und die inverse PCR design (Tabelle 19 und Tabelle 20).

3.3.5.5. Semiquantitative PCR

Mittels semiquantitativer PCR sollte die Expression einiger pigmentassoziierter Sequenzen über einen Zeitverlauf von 2 Wochen untersucht werden. Zunächst wurden Standards und entsprechende Primer erarbeitet. Als erster Standard wurde eine Sequenz aus *M. furfur* mit signifikanter Ähnlichkeit zur Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase verwendet (mf_sdh2). Eine Teilsequenz dieses Gens war mittels degenerate PCR und die Gesamtsequenz mittels inverse PCR bestimmt worden (Kapitel 3.3.5.6). Als zweiter Standard wurde die ITS1-Region verwendet (Makimura et al. 2000), obwohl in der Literatur nichts bezüglich der Verwendung dieser Regionen als interne Standards zu finden war. Die Expression des ITS-Gens zeigte sich ähnlich konstant wie die Expression von mf_sdh2.

Die Primer für die differentiell exprimierten Sequenzen 302, 315, 348/540 und 366 waren anhand der ermittelten Teilsequenzen (Kapitel 3.3.7) mittels IDT SciTools PrimerQuestSM-Software design worden. Zunächst mussten für jeden Primer Annealingtemperatur und Zyklenzahl ermittelt werden. In Tabelle 19 sind Sequenz, Annealingtemperatur und Zyklenzahl der jeweiligen Primer angeführt.

Aus Trp- und Arg-Kulturen wurde nach 3h, 5h, 48h und 14d die GesamtRNA und daraus die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in die semiquantitative PCR eingesetzt. In jede 10µl-PCR-Reaktion wurde 1µl Template mit 9µl PCR-Mix gemischt. Die Probe wurde initial für 3min bei 94°C denaturiert, dann folgten je nach Primer die ermittelte Zyklenzahl mit Denaturierung für 30sek bei 94°C, Annealing für 30sek und Elongation bei 72°C für 1min. Nach einer finalen Elongation für 10min bei 72°C wurde die Probe auf 4°C abgekühlt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert.

3.3.5.6. Inverse PCR

Zur Aufklärung der gesamten genomischen Sequenz der Iron-Sulfur-Einheit einer Succinatdehydrogenase (hier mf_sdh2), welche in der vorliegenden Arbeit als Housekeeping-Gen verwendet wurde, und der gesamten genomischen Sequenz der Sequenz mit Ähnlichkeit zu einer Tryptophan-Aminotransferase (hier mf_tam1) wurde die Inverse PCR eingesetzt. Das Prinzip der Inversen PCR ist in Abbildung 14 dargestellt. Bis zur vollständigen

Sequenzaufklärung waren mehrere Durchgänge mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Primerpaaren notwendig. Die Sequenzen und Annealing-Temperaturen der Primer für die einzelnen Schritte sind in Tabelle 20 aufgeführt, die einzelnen Restriktionsenzyme in Tabelle 2. Die Primer wurden mit der IDT SciTools PrimerQuestSM-Software oder „manuell“ anhand der Sequenz designt und anschließend durch die IDT SciTools OligoAnalyser 3.0-Software überprüft. Die Restriktionsenzyme wurden mit der NEB Cutter Software (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) auf Schnittstellen innerhalb der jeweiligen Sequenz überprüft.

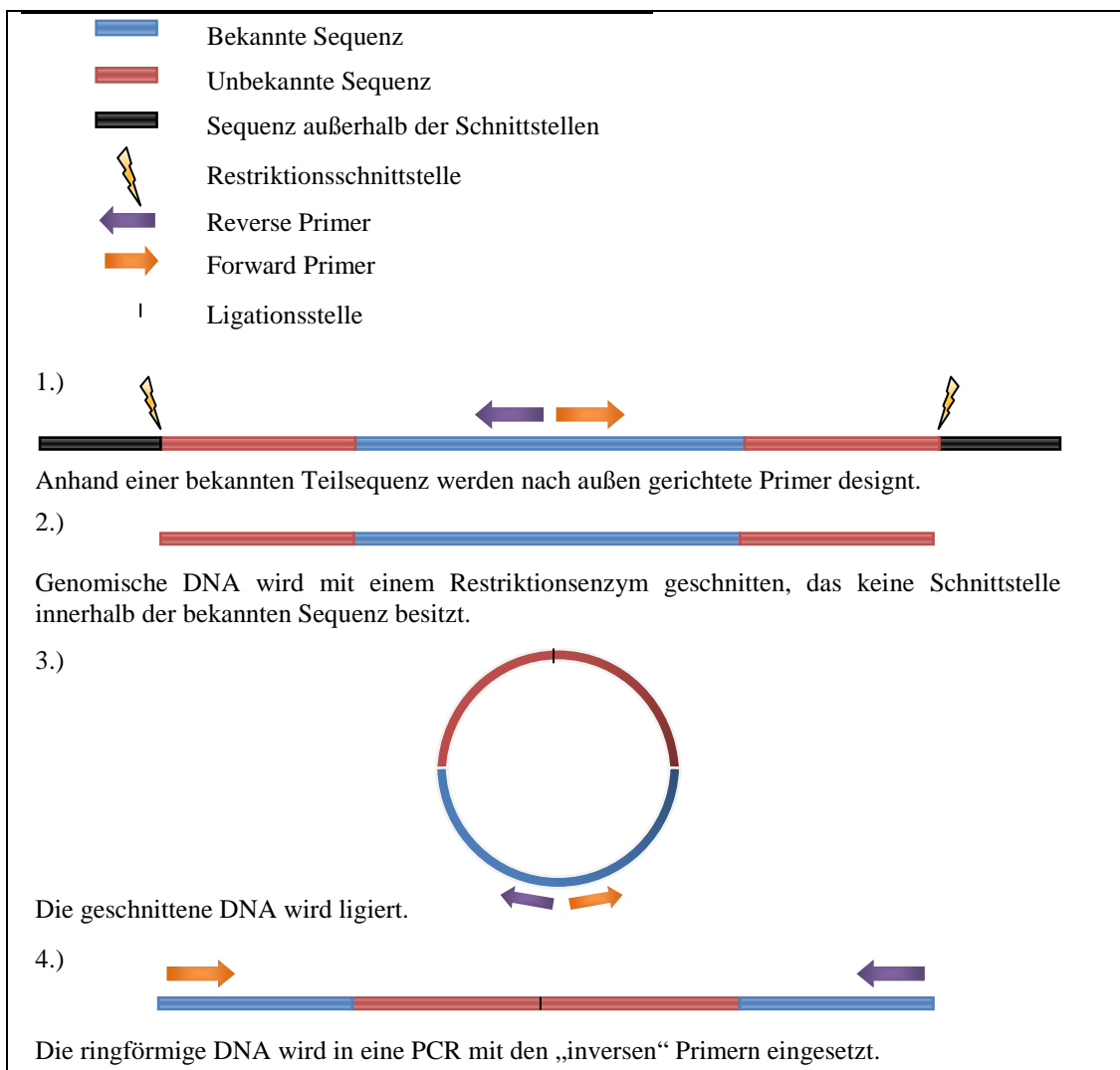


Abbildung 14: Schematische Darstellung der inverse PCR

3.3.5.6.1. Inverse PCR 1

In die erste inverse PCR wurden 2µl der verdauten und zirkularisierten DNA eingesetzt und eine PCR nach folgendem Schema durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 94°C für 3min, 35 Zyklen mit Denaturierung für 1min bei 94°C, 1min bei dem Primer entsprechender

Annealingtemperatur und Elongation für 2min bei 72°C. Nach der finalen Elongation bei 72°C für 10min wurde die Reaktion auf 4°C abgekühlt. Für die Inverse PCR1 für mf_tam1 wurde immer das Primerpaar „146 inverse f und r“ verwendet. Für die erste Inverse PCR 1 für mf_sdh2 wurde das Primerpaar „Cbx inverse f und r“ verwendet, für alle nachfolgenden Inverse PCR 1-Reaktionen das Primerpaar „nested Cbx inverse f und r“. Sequenzen und Annealingtemperaturen der Primer sind in Tabelle 20 angeführt.

3.3.5.6.2. Inverse PCR 2 (Touchdown PCR)

Es wurden 0,5-1µl der Inverse PCR 1-Reaktion ohne Gelkontrolle in die Inverse PCR 2 (25µl PCR) eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 20 aufgeführt. Die Inverse PCR 2 wurde als Touchdown PCR durchgeführt. Diese begann mit einer initialen Denaturierung bei 94°C für 3 min. Es folgten 2 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 sek und 30 sek bei einer Annealingtemperatur, die ca. 3°C – 10°C über der errechneten Annealingtemperatur lag. Die Elongation erfolgte entsprechend für 1 min bei 72-75 °C. Danach erfolgten immer zwei Zyklen mit einer um 1-2 °C reduzierten Annealingtemperatur, bis diese 3°C – 10°C unter der errechneten lag. Mit dieser Annealingtemperatur wurden 20 Zyklen durchgeführt. Die Zyklen der Touchdown-PCR, in denen das Annealing oberhalb der errechneten Annealingtemperatur stattfand, sollten die Spezifität der PCR erhöhen und eine Fehlanlagerung der Primer reduzieren. Die finale Elongation wurde für 15 min durchgeführt, anschließend wurde die PCR auf 4°C gekühlt. Das PCR-Produkt aus der inversen PCR 2 wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die prominentesten Banden wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und zum Sequenzieren gegeben.

3.3.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide, die eine differentiell exprimierte Sequenz enthielten, wurde im Institut für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Das Cycle-Sequencing-Verfahren erfolgte nach dem Kettenabbruchprinzip nach Sanger (Sanger et al. 1977). Es wurden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide als Terminatoren verwendet. Als Primer für die forward-Reaktion wurde der Standardprimer M10 und als der Primer für die reverse-Reaktion der Standardprimer M11 eingesetzt.

Die übrigen Sequenzierungen wurden durch das SeqLab Labor (Göttingen) durchgeführt. Der DNA-Gehalt der aufgereinigten PCR-Produkte wurde UV-photometrisch bestimmt. Die benötigte DNA-Menge wurde eingestellt und zusammen mit 20pmol des jeweiligen forward

und reverse Primers gemischt. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde in Form eines Elektropherogramms als ABI-Trace-File mit der Extension *.ab1 elektronisch gespeichert.

3.3.7. Sequenzanalyse

3.3.7.1. Sequenzanalyse der differentiell exprimierten Sequenzen (3h und 5h)

3.3.7.1.1. Softwarebearbeitung der Sequenzdateien

Die ABI-Trace-Dateien der Sequenzierungsergebnisse der 3 Stunden- und der 5 Stunden-Sequenzen wurden im SeqMan-Programm (Lasergene Version 5, DNASTar) auf ihre Qualität überprüft, die Primersequenz-Fragmente bereinigt und die Sequenzen als Sequenz-Textfiles mit der Endung *.seq gespeichert. Diese Sequenz-Textfiles konnten im EditSeq-Programm bei Bedarf manuell korrigiert werden. Außerdem wurden die Sequenzen im SeqMan-Programm anhand von Sequenzüberschneidungen in Kontingente eingeteilt. Dies wurde zunächst für beide Zeitpunkte gesondert und anschließend mit den 3-Stunden- und den 5-Stunden-Sequenzen gemeinsam durchgeführt.

3.3.7.1.2. BLAST-Search

Die Sequenzen wurden sowohl in der NCBI (National Centre for Biotechnology Information)-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) als auch in der GenRE MIPS (Munich Information Center for Protein Sequence) *Ustilago Maydis* DataBase (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) auf Homologien überprüft. Während die NCBI-Datenbank Sequenzinformationen auf Nukleotid- und Proteinebene bakterieller, viraler und eukaryoter Organismen enthält, ist in der *Ustilago maydis*-Datenbank Sequenzinformation aus *Ustilago maydis* enthalten. Bei *U. maydis* handelt es sich um den nächsten pigmentbildenden Verwandten von *M. furfur*, dessen Genom komplett sequenziert ist. Die Sequenzen wurden zunächst im „tblastx“ (translated vs. translated)-BLAST-Programm abgeglichen. In diesem Modus wird die zu überprüfende Nukleotidsequenz automatisch in eine Aminosäuresequenz übersetzt und mit in der Datenbank enthaltenen übersetzten Sequenzen verglichen. Dabei ist das Programm in der Lage, alle sechs Leserahmen der Nukleotidsequenz simultan zu überprüfen. Nur Treffer mit einem e-value $\leq 1e-3$ wurden als Sequenzähnlichkeit gewertet. Die Aminosäuresequenz, die den besten Treffer in der BLAST-Suche ergab, wurde in der NCBI-Conserved-Domain-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) auf das Vorhandensein konservierter Proteindomänen überprüft. Außerdem wurde mit den Sequenzen auch eine „blastn“-Suche auf Nukleotid-Ebene durchgeführt.

3.3.7.1.3. Einteilung der BLAST-Search-Ergebnisse

Die Sequenzen wurden anhand der wahrscheinlichen Funktionen ihrer besten BLAST-Search-Ergebnisse oder ihrer konservierten Regionen in Anlehnung an den MIPS Yeast FunCat (<http://mips.gsf.de/projects/funcat>) sortiert (Ruepp et al. 2004; Mewes et al. 2000). Die Hauptkategorien des MIPS FunCat sind in Tabelle 6 aufgeführt. Außerdem wurden die Sequenzen zum einen anhand ihrer Ähnlichkeiten zu Sequenzen von *M. globosa* auf der einen Seite und ihrer Ähnlichkeiten zu *U. maydis* und anderen Organismen auf der anderen Seite eingeteilt.

Tabelle 6: Hauptkategorien des MIPS FunCat (Functional classification catalogue V2.0)

Metabolism	
01	Metabolism
02	Energy
04	Storage protein
Information pathways	
10	Cell cycle and DNA processing
11	Transcription
12	Protein synthesis
14	Protein fate (folding, modification and destination)
16	Protein with binding function or cofactor requirement (structural or catalytic)
18	Protein activity regulation
Transport	
20	Cellular transport, transport facilitation and transport routes
Perception and response to stimuli	
30	Cellular communication/signal transduction mechanism
32	Cell rescue, defense and virulence
34	Interaction with the cellular environment
36	Interaction with the environment (systemic)
38	Transposable elements, viral and plasmid proteins
Developmental processes	
40	Cell fate
41	Development (systemic)
42	Biogenesis of cellular components
43	Cell type differentiation
45	Tissue differentiation
47	Organ differentiation
Localization	
70	Subcellular localization
73	Cell type localization
75	Tissue localization
77	Organ localization
78	Ubiquitous expression
Experimentally uncharacterized proteins	
98	Classification not yet clear-cut
99	Unclassified proteins

3.3.7.1.4. Vergleich der 3-Stunden- und der 5-Stunden-Sequenzen

Die 3-Stunden- und die 5-Stunden-Sequenzen wurden im SeqMan-Programm anhand von Sequenzüberschneidungen in Kontingente eingeteilt. Die Konsensussequenzen wurden zusätzlich zu den Einzelsequenzen gegen die NCBI- und gegen die GenRe MIPS-Datenbanken geblastet. Die BLAST-Search-Ergebnisse der beiden Sequenzpools wurden miteinander verglichen. Auch die jeweiligen Einteilungen gemäß des MIPS Yeast FunCat der beiden Pools wurden vergleichend gegenübergestellt.

3.3.7.1.5. Einordnung identifizierter Sequenzen in Modellstoffwechselwege der Tryptophanmetabolite aus *M. furfur*

Auf Grund der oben erwähnten wahrscheinlichen Funktionen bzw. der konservierten Regionen wurden die Sequenzen in Modellstoffwechselwege für die verschiedenen Tryptophanmetabolite eingeordnet. Bei diesen Modellstoffwechselwegen (Abbildung 8) handelt es sich um theoretische Überlegungen von Irlinger et al basierend auf Verfütterungsversuchen mit radioaktiv-markierten Tryptophanmolekülen, Strukturaufklärungen der Metabolite und ihrer Zwischenstufen sowie Synthesversuche zu den verschiedenen Verbindungen (Irlinger et al. 2004; Irlinger 2002).

3.3.7.2. Sequenzanalyse der Sequenziererergebnisse aus der degenerate und der inverse PCR, Aufklärung der genomischen Sequenzen von *mf_sdh2* und *mf_tam1*

Die Sequenziererergebnisse der degenerate und der inverse PCR-Schritte wurden im tblastx-Modus und im blastn-Modus mit der NCBI Gendatenbank abgeglichen. Die BLAST-Search-Ergebnisse der degenerate PCR-Produkte wurden für das Design genspezifischer Primer verwendet.

Die Angleichung der in der inversen PCR neu ermittelten Sequenzfragmente an die bereits bekannte Sequenz erfolgte manuell. Die so erhaltenen Sequenzen wurden erneut mit der NCBI Gendatenbank abgeglichen. Anhand der erweiterten Sequenzen wurden für weitere Inverse PCR-Durchgänge neue Primer designt, bis die komplette genomische Sequenz der zu untersuchenden Gene vorlag, bzw. bis Sequenzanteile benachbarter Gene identifiziert waren.

3.3.8. Identifikation des Open Reading Frames von *mf_tam1* und *mf_sdh2* und Sequenzanalyse

Um die Open Reading Frames, d.h. die proteinkodierenden Anteile von *mf_tam1* und *mf_sdh2* mittels Standard-PCR (Kapitel 3.3.5.1) zu identifizieren, wurden anhand der genomischen Sequenzen Primer designt, die ausgehend von möglichen Start- und Stoppkodons amplifizierten. Hierbei wurde es sich zu nutze gemacht, dass ein Open Reading Frame (der proteinkodierende Teil eines Gens, welcher bei der Translation von der mRNA in Proteinsequenz übersetzt wird), in Eukaryoten bis auf sehr wenige Ausnahmen immer mit einem ATG, dem Startkodon, welches für ein Methionin kodiert, beginnt und mit TAA, TAG oder TGA, sogenannten Stoppkodons endet, an welchen die Translation abbricht. Der ein bestimmtes Protein kodierende Open Reading Frame muss also mit einem ATG beginnen,

eine nicht durch Stoppkodons unterbrochene Nukleotidsequenz beinhalten und an einem sinnvollen Punkt durch ein Stoppkodon terminiert werden. Derartige Sequenzen wurden für mf_sdh2 und mf_tam1 gesucht.

Sequenzen und Annealingtemperaturen der Primer sind in Tabelle 21 angeführt. Als reverser Primer für die cDNA-forward Primer für mf_tam1 wurde „146 inverse r“ eingesetzt und für die forward Primer für die cDNA-reverse Primer „146 inverse 3 f“. Als reverser Primer für die cDNA-forward Primer für mf_sdh2 wurde „nested Cbx inverse r“ eingesetzt und für die forward Primer für die cDNA-reverse Primer „nested Cbx inverse f“. Als Template wurden sowohl gDNA als auch cDNA aus einer 3 Stunden alten Tryptophan-Kultur eingesetzt. Die PCR-Produkte aus der cDNA-PCR wurden in der Gelelektrophorese mit denen aus der gDNA-PCR verglichen. Banden aus den cDNA-PCRs, die die erwartete Größe zeigten, wurden bei Vorliegen mehrerer Banden ausgeschnitten, aufgereinigt und zum Sequenzieren geschickt. Zur Kontrolle wurden auch PCR-Produkte aus gDNA sequenziert.

Durch Überprüfung aller Leserahmen der mit cDNA und gDNA amplifizierten PCR-Produkte durch tblastx-Suche auf Pilzsequenzen und Translation der Sequenzen in Aminosäuresequenzen im EditSeq-Programm wurden die wahrscheinlichsten Start- und Stoppkodons identifiziert.

Nach Vorliegen der möglichen Anfangs- und Endsequenz wurde der dazwischenliegende Bereich von cDNA aus einer 3 Stunden alten Tryptophan-Kultur durch überlappende PCRs mit den Primerpaaren „146 f“ und „146 b r“ (beide Tabelle 19) und „146 inverse f“ (Tabelle 20) und „Mf_tam1_End1 r“ (Tabelle 21) für mf_tam1 und den Primerpaaren „Mf_sdh2_start2 f“ und „Cbx inverse r“ und „Mala Cbx 2f“ und „Mf_sdh2_end1 r“ für mf_sdh2 amplifiziert und sequenziert. Die resultierenden Sequenzen wurden manuell zusammengefügt und mit der vorliegenden genomischen Sequenz verglichen. Auch wurden sie ausgehend von den identifizierten Startkodons mittels EditSeq-Programm in Proteinsequenz übersetzt und auf ihre Kontinuität und Übereinstimmung mit der im tblastx identifizierten Proteinsequenz überprüft.

Mit den übersetzten Proteinsequenzen der letztendlich identifizierten Open Reading Frames für mf_tam1 und mf_sdh2 wurden NCBI tblastn-Suchen durchgeführt. Die ermittelten Proteinsequenzen wurden in einer Datenbank abgeglichen mit in Aminosäuresequenzen übersetzten Nukleotidsequenzen. Die Suchergebnisse wurden auf pilzliche Sequenzen beschränkt. Mit dem Geneious-Programm wurden die wahrscheinlichen Proteinsequenzen von MF_Tam1- und MF_Sdh2 mit 10 BLAST-Treffern in einen graphischen Zusammenhang gebracht. Mit dem MegAlign-Programm wurde für MF_Tam1 ein Baumdiagramm erstellt.

Zur Überprüfung konservierter Regionen und funktioneller Einheiten der aus den Open Reading Frames resultierenden Proteinsequenzen mf_Tam1 und mf_Sdh2 wurde eine NCBI Conserved Domains-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) durchgeführt. Die NCBI Conserved Domains Database ermöglicht die Untersuchung neuer Proteinsequenzen anhand des Abgleichs mit bekannten Sequenzen und bekannten Proteinmodellen. Es wird das Vorhandensein konservierter Regionen sowie funktioneller Einheiten und die Zugehörigkeit zu Superfamilien und die Ähnlichkeit zu spezifischen Domänen überprüft und visualisiert. Darüberhinaus werden kurze Erläuterungen der Ergebnisse mit angezeigt (Marchler-Bauer et al. 2009; Marchler-Bauer et al. 2007; Marchler-Bauer et al. 2005).

3.3.9. Hypothetische Überlegungen zu MGL_2601 aus *M. globosa*

MGL_2601 ist die zu mf_tam1 und UM01804 homologe Sequenz aus *M. globosa*. Im NCBI ist MGL_2601, eine partielle mRNA-Sequenz, unter der Accession Nr. XM_001730167 hinterlegt. Das Genom von *M. globosa* ist als „whole genome shotgun sequence“ unter der Accession Nr. AAYY01000009 hinterlegt. Um die Sequenz aus *M. globosa* mit mf_tam1 aus *M. furfur* tiefergehend vergleichen zu können, wurde der Anteil der genomischen Sequenz aus *M. globosa*, in dem sich MGL_2601 befindet, im tblastx untersucht. Im EditSeq wurde die genomische Sequenz in allen möglichen Leserahmen in die Proteinsequenz übersetzt und mit den BLAST-Ergebnissen und der Proteinsequenz von Mf_Tam1 verglichen. Die genomische Sequenz wurde manuell editiert und um hypothetische Introns bereinigt, so dass die partielle mRNA-Sequenz MGL_2601 erweitert werden konnte. Die daraus resultierende Proteinsequenz und die Proteinsequenz von Mf_Tam1 wurden im NCBI Alignment BLAST (bl2seq, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) miteinander verglichen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Untersuchungen zur differentiellen Expression Tryptophan-pigmentassoziierter Gene

4.1.1. Vorarbeiten Dritter

Freundlicherweise stellte Frau Dr. Hort ihre Vorarbeiten zur Verfügung: Zur Identifikation während der Pigmentsynthese in *M. furfur* differentiell exprimierter Gene hatte sie cDNA Subtraktionen 3 Stunden und 5 Stunden nach Pigmentinduktion durchgeführt. Die differentiell exprimierten Sequenzen hatte sie in TOPO II-Vektoren inseriert und in *E. coli* Bakterien transformiert. Die Klone der 5h-Subtraktion waren von Frau Dr. Hort gescreent und die positiven Plasmide sequenziert worden. Etwa 600 Klone wurden gescreent; 91 Inserts konnten erfolgreich sequenziert werden.

4.1.2. Screening der 3 Stunden-Sequenzen

Das Screening der Sequenzen der 3h-Subtraktion war ein Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Etwa 900 Klon-Kolonien wurden vereinzelt und mittels Kolonie-PCR und reversem Northern Blot auf differentiell exprimierte Sequenzen überprüft. Ein Beispiel für die Darstellung differentieller Expression im reversen Northern Blot ist in Abbildung 15 dargestellt.

Aus den positiven Klonen wurden die Plasmide extrahiert und diese auf die erfolgreiche Insertion der differentiell exprimierten Sequenzen überprüft (ein Beispiel zeigt Abbildung 16). Insgesamt wurden 79 Sequenzen aus dem 3h-Kontingent erfolgreich sequenziert.

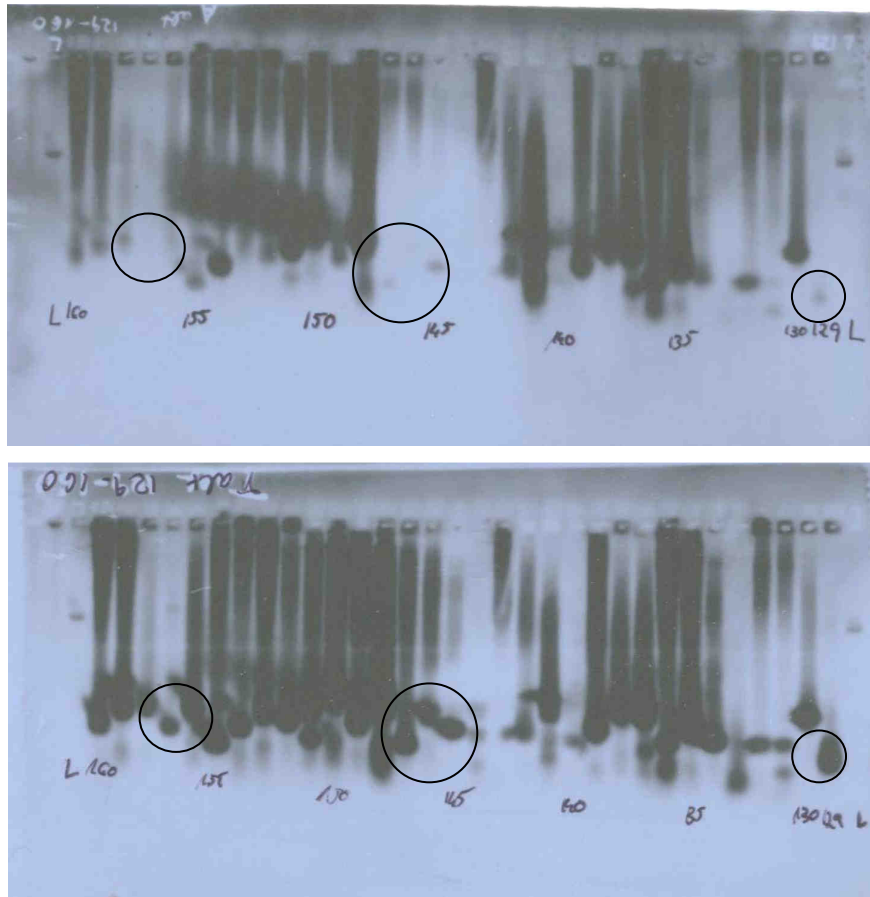


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Hybridisierung der 3h-Sequenzen 129 – 160.
 Oben: Argininsonde. Unten: Tryptophansonde. Man erkennt die unterschiedlich starke Bindung der Sonden.
 Einige Sequenzen, wie z.B. 129, 145, 146 (später 302), 147, 156 und 157 hybridisieren nahezu nur mit der Tryptophan-Sonde.

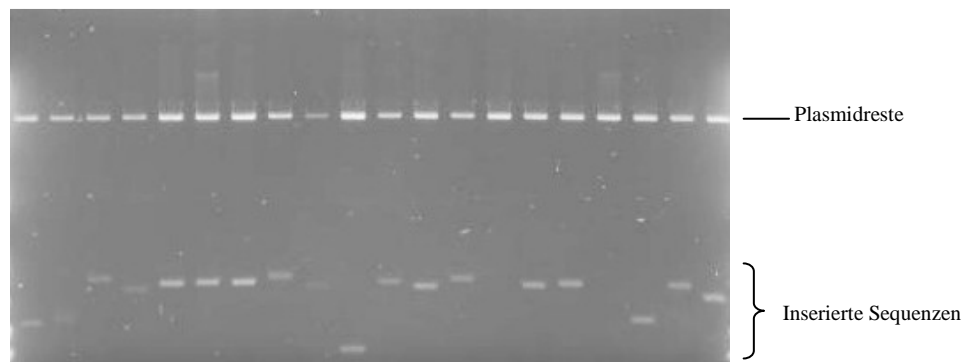


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung eines Verdaus extrahierter Plasmide.
 Aus Klonen, die eine Sequenz enthielten, welche im reversen Northern Blot nur mit der Tryptophan-Sonde hybridisierte, wurden die Plasmide extrahiert und diese mit EcoRI verdaut.

4.1.3. BLAST Search und Sequenzabgleich

Mit jeder Sequenz beider Kontingente wurde eine translated vs. translated BLAST-Suche (tblastx) sowohl in der NCBI Datenbank, als auch in der GenRe MIPS *U. maydis* Datenbank durchgeführt. In Tabelle 7 (3 Stunden) und Tabelle 8 (5 Stunden) sind die Ergebnisse der tblastx Suche in Anlehnung an den MIPS Yeast FunCat (Ruepp et al. 2004; Mewes et al. 2000) anhand ihrer wahrscheinlichen Funktionen eingeteilt. Zur Übersichtlichkeit sind die Sequenzen entsprechend dieser Einteilung nummeriert. Abweichungen von der Reihenfolge sind durch Änderungen der Ergebnisse in späteren BLAST-Suchen begründet. Mit Sternchen markierte Sequenzen ergaben keinen Treffer in der NCBI Datenbank, dafür aber in der GenRe MIPS Datenbank.

Tabelle 7: Einteilung der BLAST-Search-Ergebnisse der 3-Stunden-Sequenzen anhand ihrer hypothetischen Funktionen.

Sequenzen, die keinen Treffer in der NCBI Datenbanken ergaben, aber in der GenRe MIPS *U. maydis* Datenbank, sind mit * gekennzeichnet.

Seq. Nr.	Bester Treffer Gen Nummer	Hypothetische Funktion
Metabolism		
Amino acid / nitrogen metabolism		
301	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1168	Chorismate synthase
302	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2601	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase
303	<i>Aspergillus terreus</i> ATEG_01774	Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases
304	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0703	Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases
305	<i>Ustilago maydis</i> UM05632	Iron-Sulfur cluster nifU-like protein scaffold protein
306	<i>Oryza sativa</i>	Isopropylmalate/ homocitrate/ citramalate synthases
307	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1477	ATP phosphoribosyl-transferase
308	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1477	ATP phosphoribosyl-transferase
309	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0551	Asparagine synthase B (glutamine-hydrolyzing)
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism		
310	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2663	Long chain acyl-CoA dehydrogenase
311	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2663	Long chain acyl-CoA dehydrogenase
312	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3742	phosphatidylserine decarboxylase
313	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2336	Esterase/lipase
314	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3209	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase and related prenyltransferases
315	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0310	Cytochrome P450, C-22 sterol-desaturase
316	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1929	Isopentenyl diphosphate isomerase
317	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2702	Malic enzyme (Malate dehydrogenase)
Carbohydrate and C-compound metabolism		
318	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4274	L-Lactate 2-monooxygenase (LMO) FMN-binding domain
319	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0092	Phosphoglycerate mutase
320	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980 SS1G_10803	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III
321*	<i>Ustilago maydis</i> UM11539	related to SNF8
365	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3995	Glycosyltransferase family 28 N-terminal domain
Metabolism others		
322	<i>Ustilago maydis</i> 5 UM02703	Fructose-1,6-bisphosphatase
323	<i>Arthrobacter sp.</i>	Predicted epimerase, PhzC/PhzF homolog

324	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2010	Pyridoxine biosynthesis enzyme
325*	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM00567	related to B2-aldehyde-forming enzyme
Energy		
326	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4076	Transaldolase A/B
Cell Cycle		
353*	<i>Ustilago maydis</i> UM04487	Karyogamy Protein
Transcription		
327	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	RimL, Acetyltransferase (GNAT) family
328	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4188	related to mRNA guanylyltransferase
329	<i>Nematostella vectensis</i>	Histone H3
330	<i>Aspergillus niger</i> An08g06960	Histone H3
331	<i>Ustilago maydis</i> h4 gene for histone 4	Histone H4
332	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3511	Histone H4
333	<i>Ustilago maydis</i> h4 gene for histone 4	Histone H4
334	<i>Ustilago maydis</i> h4 gene for histone 4	Histone H4
364a	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1942	Helix-turn-helix XRE-family like proteins
Protein synthesis		
335	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3246	Asx tRNA synthetase (AspRS/AsnRS) class II core domain
336	<i>Cryptococcus neoformans</i> CNM01460	TCTP, Translationally controlled tumour protein
337	<i>Ustilago maydis</i> UM11719	Ribosomal protein S4E
338	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0281	Ribosomal protein S6e
339	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0281	Ribosomal protein S6e
340	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0281	Ribosomal protein S6e
341	<i>Ustilago maydis</i> UM00867	Ribosomal protein S8
342	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2944	Ribosomal Protein S10
343	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1652	Ribosomal Protein S23
344	<i>Neurospora crassa</i> 40S ribosomal protein S23	Ribosomal protein S23
345	<i>Ustilago maydis</i> UM11135	Ribosomal protein S27
346	<i>Coccidioides immitis</i> CIMG_05425	Ribosomal protein L3
347	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2147	Ribosomal protein L11
348	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2147	Ribosomal protein L11
349	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3166	Ribosomal Protein L37ae
Protein fate		
350	<i>Malassezia furfur</i>	18S ribosomal RNA gene
351	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0599	Eukaryotic aspartyl protease
352	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1910	Serine/Threonine protein kinase
354	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1502	GroEL_like type I chaperonin
355	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0788	Component of SCF ubiquitin ligase and anaphase-promoting complex
356	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2996	Ubiquitin activating enzyme (E1)
357	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ubiquitin
Cellular transport		
358	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2787	Fe-S cluster assembly scaffold protein
359	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2751	Eukaryotic porin
360	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2587	related to GLE2 - required for nuclear pore complex structure and function / WD40 repeats
361	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3780	Importin beta-related nuclear transport receptor
362	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0542	V-type ATPase 116kDa subunit family
363*	<i>Ustilago maydis</i> UM04736	snf7, conserved hypothetical protein involved in vacuolar transport
Cell rescue / Stress response		
364b	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Hemoglobin-like flavoprotein
Unclassified proteins		
366	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0063	no match found
367	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0063	no match found
368	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0063	no match found
369	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0754	Uncharacterized Zn ribbon-containing protein
No significant similarity		
370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379		

Tabelle 8: Einteilung der BLAST-Search-Ergebnisse der 5 Stunden-Sequenzen anhand ihrer hypothetischen Funktionen.

Sequenzen, die keinen Treffer in der NCBI Datenbanken ergaben, aber in der GenRe MIPS *U. maydis* Datenbank, sind mit * gekennzeichnet.

Seq. Nr.	Bester Treffer Gen Nummer (Accession Nr.)	Hypothetische Funktion
Metabolism		
Amino acid / nitrogen metabolism		
501	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2109	Glutathione S-Transferase
502	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0780	Cystein desulfurase and related enzymes (nifS)
503	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> SS1G_00355	2-Nitropropane dioxygenase (NPD)
504	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024	Iron-Sulfur cluster nifU-like protein
505	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0320	Citrate synthase
506	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4035	Mitochondrial aconitase A swivel domain
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism		
507	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0279	Lipase (class 3).
508	<i>Malassezia furfur</i> secreted lipase 1 precursor (LIP1)	Secretory lipase
509	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1574	Acid sphingomyelinase
Carbohydrate and C-compound metabolism		
510	<i>Ustilago maydis</i> UM10062	Flavin-binding monooxygenase-like
511	<i>Ustilago maydis</i> UM10062	Flavin-binding monooxygenase-like
512	<i>Ustilago maydis</i> UM10062	Flavin-binding monooxygenase-like
513	<i>Ustilago maydis</i> UM10062	Flavin-binding monooxygenase-like
514	<i>Ustilago maydis</i> UM10062	Flavin-binding monooxygenase-like
515	<i>Ustilago maydis</i> UM11922	Chitin deacetylase
516	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4190	Glycerate dehydrogenase
517	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4179	Phosphoglycerate kinase
Metabolism others		
518	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4159	Pyruvate-/ Indolepyruvate decarboxylase
519	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1313	NMT1/THI5 like, Thiamin biosynthesis
520	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2660	Rare lipoprotein A (RlpA)-like double-psi beta-barrel, B2-aldehyde forming enzyme
521	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1057	Rare lipoprotein A (RlpA)-like double-psi beta-barrel
522	<i>Rhodococcus</i> sp.	Methylase involved in ubiquinone/ menaquinone biosynthesis
523	<i>Arthrobacter</i> sp.	Methylase involved in ubiquinone/ menaquinone biosynthesis
Energy		
524*	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM11830	NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I
525	<i>Candida albicans</i> cytochrome C gene (CYC1) gene	Cytochrome c2
526*	<i>Ustilago maydis</i> UM11938	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4
527	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3419	Isocitrate lyase
Cell Cycle		
528	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0337	Cyclin
Transcription		
529	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0308	Transcription factor Tfb4
530	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3680	SAM-dependent methyltransferases related to tRNA (uracil-5-)-methyltransferase
531	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3950	Ribonuclease T2
532*	<i>Ustilago maydis</i> UM02059	DNA-directed RNA polymerase III
Protein biosynthesis		
533	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3353	Seryl-tRNA synthetase (SerRS) class II
Protein fate		
534	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0815	Serine carboxypeptidase
535	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3953	Family of activating enzymes (E1) of ubiquitin-like proteins
536	<i>Pleurotus ostreatus</i> putative ubiquitin (ubq1)	Ubiquitin
537	<i>Ustilago maydis</i> UM06118	related to Tripeptidyl-peptidase I precursor
591	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1964	Protein-disulfide isomerase

Protein activity regulation		
538	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3887	Patched family; related to Sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein
539	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3887	Patched family
Cellular transport		
540	<i>Ustilago maydis</i> UM05471	Fe-S cluster assembly scaffold protein, HesB-like domain
541	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1200	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain
542	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1200	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain
543	<i>Ustilago maydis</i> UM06292	Vacuolar protein sorting-associated protein 26
544	<i>Ustilago maydis</i> UM00508	ATP synthase subunit C
545	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0527	Syntaxin / SNARE domain
546	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0527	Syntaxin / SNARE domain
547	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0527	Syntaxin / SNARE domain
548	<i>Ustilago maydis</i> UM06138	Dipeptide/tripeptide permease
549	<i>Ustilago maydis</i> UM06138	Dipeptide/tripeptide permease
550	<i>Aspergillus niger</i> An01g11630	Preprotein translocase subunit Sss1
551	<i>Ustilago maydis</i> UM03718	SURF4
552	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2422	Ferric reductase
Cellular communication / signal transduction		
553	<i>Ustilago hordei</i> G-alpha subunit (FIL1) gene	G protein alpha subunit (FIL1)
Biogenesis of cellular components		
554	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3753	Actin depolymerisation factor/cofilin -like domains
Cell rescue / Stress response		
555	<i>Mycobacterium sp.</i>	Flavodoxin reductases (ferredoxin-NADPH reductases) family 1
556	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2367	Methioninsulfoxid-Reduktase
557	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2367	Methioninsulfoxid-Reduktase
558	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2367	Methioninsulfoxid-Reduktase
559	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2367	Methioninsulfoxid-Reduktase
560	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2207	Protein phosphatase 2A regulatory B subunit
561	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0846	Cytochrome c peroxidase
Unclassified Proteins		
562	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3153	Function unknown
563	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3153	Function unknown
564	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3153	Function unknown
565	<i>Ustilago maydis</i> UM03923	Function unknown
566*	<i>Ustilago maydis</i> UM11139	Function unknown
567*	<i>Ustilago maydis</i> UM11139	Function unknown
568*	<i>Ustilago maydis</i> UM11139	Function unknown
569	<i>Ustilago maydis</i> UM02672	DUF1690; Protein of unknown function
570	<i>Ustilago maydis</i> UM11131	Function unknown
571	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Function unknown
586	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0759	Function unknown
No significant similarity		
572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 587, 588, 589, 590		

Die meisten Proteine konnten aufgrund ihrer Funktionen in mehr als eine Kategorie des MIPS Yeast FunCat eingeteilt werden. Für die vorliegenden Tabellen (Tabelle 7 und Tabelle 8) wurde für jede Sequenz nur eine dominante Funktion zur Einteilung ausgewählt.

Neben den wahrscheinlichen Funktionen der Sequenzen wurde besonderes Augenmerk auf ihre Ähnlichkeit zu Sequenzen aus *M. globosa* und *U. maydis* gelegt. *M. globosa* ist zwar der nächste Verwandte von *M. furfur* mit einem sequenzierten Genom, jedoch konnte im Gegensatz zu *U. maydis* in vitro die Pigmentbildung bisher nicht induziert werden. In den

Tabellen 9 - 11 sind für die 3 Stunden-Sequenzen und in den Tabellen 12 - 14 für die 5 Stunden-Sequenzen sowohl die Ergebnisse der tblastx-Suche als auch der blastn-Suche in Bezug auf ihre Ähnlichkeit zu Sequenzen aus *M. globosa* dargestellt.

Tabelle 9: 3 Stunden Kategorie 1: *Malassezia globosa* als bester Treffer (NCBI).

E= e-value, I=Identity, S= Similarity. Mit * markierte Sequenzen: Kein bester oder zweitbesten Treffer in der NCBI Datenbank, aber Treffer in der MIPS *U. maydis* Datenbank. Fett gedruckt: Gleiches Ergebnis für tblastx-Suche und blastn-Suche.

Seq. Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) in <i>M. globosa</i> (Accession Nr.)	E I; S	Bester Treffer translated BLAST in anderen Organismen (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolism						
Amino acid / nitrogen metabolism						
301	MGL_1168 (XM_001731848)	4e-76 77%; 86%	<i>Ustilago maydis</i> UM01402 (XM_752456)	2e-70 74%; 82%	Chorismate synthase	<i>Ustilago maydis</i> UM01402 (1e-52; 73%)
302	MGL_2601 XM_001730167	2e-43 64%; 86%	<i>Ustilago maydis</i> UM01804 (XM_752858)	7e-39 62%; 79%	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase	<i>Ustilago maydis</i> UM01804 (2e-04; 69%)
304	MGL_0703 (XM_001732058)	6e-12 49%; 61%	<i>Ustilago maydis</i> UM11720* (no accession no.)	3e-12 55%; 65%	Cystathionine beta-lyases/ cystathionine gamma-synthases	No significant similarity
307	MGL_1477 (XM_001731242)	8e-63 75%; 87%	<i>Ustilago maydis</i> UM11807 (XM_757071)	1e-45 65%; 76%	ATP phospho-ribosyl-transferase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1477 (4e-53; 72%)
308	MGL_1477 (XM_001731242)	1e-90 80%; 88%	<i>Ustilago maydis</i> UM11807 (XM_757071)	4e-76 73%; 84%	ATP phospho-ribosyl-transferase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1477 (2e-83; 70%)
309	MGL_0551 (XM_001732724)	1e-53 81%; 89%	<i>Ustilago maydis</i> UM00311 (XM_751365)	5e-48 77%; 83%	Asparagine Synthase B	<i>Podospora anserina</i> (PODANSg8830) (3e-70; 82%)
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism						
310	MGL_2663 (XM_001730229)	2e-89 82%; 91%	<i>Ustilago maydis</i> UM01466 (XM_752520)	7e-80 74%; 85%	Long chain acyl-CoA dehydrogenase	<i>Ustilago maydis</i> UM01466 (3e-73; 72%)
311	MGL_2663 (XM_001730229)	3e-91 83%; 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM01466 (XM_752520)	2e-81 74%; 87%	Long chain acyl-CoA dehydrogenase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2663 (8e-80; 74%)
312	MGL_3742 (XM_001729223)	4e-63 66%; 79%	<i>Ustilago maydis</i> UM02799 (XM_753853)	2e-59 61%; 78%	Phosphatidyl-serine decarboxylase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3742 (8e-36; 67%)
313	MGL_2336 (XM_001730488)	3e-46 63%; 76%	<i>Petroleum-degrading bacterium</i> HD-1 Esterase HDE (AB029896)	1e-06 60%; 68%	Esterase/lipase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2336 (5e-05; 64%)
314	MGL_3209 (XM_001729613)	3e-37 79%; 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM01450 (XM_752504)	5e-28 55%; 76%	4-hydroxybenzoate poly-prenyltransferase and related enzymes	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (9e-13; 70%)
315	MGL_0310 (XM_001732483)	7e-36 84%; 89%	<i>Ustilago maydis</i> UM00350 (XM_751404)	8e-27 77%; 87%	Cytochrome P450, C-22 sterol-desaturase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0310 (3e-36; 77%)
316	MGL_1929 (XM_001730878)	5e-91 77%; 86%	<i>Adonis aestivalis</i> (EF489296)	2e-87 73%; 86%	Isopentenyl diphosphate isomerase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1929 (2e-76; 71%)
317	MGL_2702 (XM_001730268)	1e-63 75%; 85%	<i>Ustilago maydis</i> UM11919 (XM_753360)	4e-47 73%; 86%	Malic enzyme	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2702 (1e-51; 72%)

Carbohydrate and C-compound metabolism						
318	MGL_4274 (XM_001728533)	1e-42 77%; 89%	<i>Aspergillus oryzae</i> (NW_001884664)	9e-31 61%; 75%	L-Lactate 2-mono- oxygenase (LMO) FMN-binding domain	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4274 (1e-39; 75%)
319	MGL_0092 (XM_001732265)	5e-66 80%; 88%	<i>Ustilago maydis</i> UM05339 (XM_756393)	6e-62 70%; 87%	Phosphoglycerate mutase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0092 (7e-74; 75%)
365	MGL_3995 (XM_001728776)	3e-30 55%; 82%	<i>Ustilago maydis</i> UM11491* (XM_753929)	5e-04 46%; 57%	Glycosyltrans- ferase family 28	No significant similarity
Metabolism others						
324	MGL_2010 (XM_001730959)	6e-66 89%; 96%	<i>Ustilago maydis</i> UM03824 (XM_754878)	2e-58 79%; 90%	Pyridoxine biosynthesis enzyme	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2010 (7e-74; 75%)
Energy						
326	MGL_4076 (XM_001728689)	3e-32 68%; 82%	<i>Ustilago maydis</i> UM04138 (XM_755192)	6e-27 68%; 75%	Transaldolase A/B	<i>Malassezia globosa</i> MGL_4076 (3e-43; 77%)
Transcription						
328	MGL_4188 (XM_001728657)	2e-61 70%; 81%	<i>Ustilago maydis</i> UM04881 (XM_755935)	2e-53 65%; 80%	related to mRNA guanylyltransferase	<i>Ustilago maydis</i> UM04881 (5e-20; 72%)
332	MGL_3511 (XM_001729424)	3e-46 93%; 95%	<i>Neurospora crassa</i> OR74A (XM_951504)	9e-46 86%; 92%	Histone H4	<i>Ustilago maydis</i> histone H4 UM02710 (1e-99; 87%)
364a	MGL_1942 (XM_001730891)	9e-14 75%; 88%	<i>Nidula niveotomentosa</i> MBF 1 (tcf gene) (AM497800)	2e-11 88%; 92%	Helix-turn-helix XRE-family like proteins	Uncultured <i>Desulfobacteraceae</i> <i>bacterium</i> 16S rRNA gene (1e-22; 88%)
Protein synthesis						
335	MGL_3246 (XM_001729650)	7e-77 78%; 87%	<i>Ustilago maydis</i> UM04442 (XM_755496)	4e-71 74%; 87%	Asx tRNA syn- thetase (AspRS/ AsnRS) class II	<i>Ustilago maydis</i> UM04442 (5e-103; 79%)
338	MGL_0281 (XM_001732454)	3e-92 95%; 97%	<i>Ustilago maydis</i> UM00659 (XM_751713)	1e-90 87%; 94%	Ribosomal protein S6e	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0281 (1e-147; 86%)
339	MGL_0281 (XM_001732454)	4e-97 93%; 97%	<i>Ustilago maydis</i> UM00659 (XM_751713)	1e-90 85%; 93%	Ribosomal protein S6e	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0281 (4e-153; 86%)
340	MGL_0281 (XM_001732454)	1e-13 88%; 97%	<i>Oryza sativa</i> (AK108193)	2e-11 82%; 91%	Ribosomal protein S6e	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0281 (5e-25; 84%)
342	MGL_2944 (XM_001729906)	3e-62 94%; 98%	<i>Ustilago maydis</i> UM03237 (XM_754291)	3e-54 85%; 96%	Ribosomal Protein S10	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2944 (9e-117; 86%)
343	MGL_1652 (XM_001731417)	3e-81 94%; 97%	<i>Cryptococcus neoformans</i> CNG04360 (XM_572112)	2e-72 85%; 93%	Ribosomal Protein S23	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1652 (8e-143; 88%)
347	MGL_2147 (XM_001730641)	1e-11 80%; 85%	<i>Nematostella vectensis</i> (XM_001641997)	4e-07 72%; 81%	Ribosomal protein L11	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2147 (3e-32; 81%)
348	MGL_2147 (XM_001730641)	1e-11 80%; 85%	<i>Anthopleura elegantissima</i> (DQ314616)	3e-07 69%; 81%	Ribosomal protein L11	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2147 (3e-32; 81%)
349	MGL_3166 (XM_001729570)	7e-38 82%; 93%	<i>Ustilago maydis</i> UM11412 (XM_753572)	2e-41 91%; 94%	Ribosomal Protein L37ae	<i>Ustilago maydis</i> UM11412 (1e-42; 80%)
Protein fate						
351	MGL_0599 (XM_001732772)	2e-38 48%; 63%	<i>Ustilago maydis</i> UM11908 (XM_753096)	4e-36 39%; 63%	Eukaryotic aspartyl protease	No significant similarity
352	MGL_1910 (XM_001730859)	2e-45 88%; 94%	<i>Ustilago maydis</i> UM05544 (XM_756598)	1e-41 81%; 90%	Serine/Threonine protein kinase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1910 (1e-41; 75%)
354	MGL_1502 (XM_001731267)	4e-47 83%; 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM05831 (XM_756885)	4e-46 84%; 90%	GroEL_like type I chaperonin	<i>Ustilago maydis</i> UM05831 (2e-58; 79%)

355	MGL_0788 (XM_001732143)	2e-54 86%; 90%	<i>Tribolium castaneum</i> LOC655935 (XM_962490)	3e-53 78%; 84%	Component of SCF ubiquitin ligase and anaphase-pro- moting complex	<i>Culex pipiens</i> <i>quinquefasciatus</i> RING- box protein 1A (9e-77; 85%)
356	MGL_2996 (XM_001729958)	1e-27 75%; 83%	<i>Oryza sativa</i> (AK110124)	4e-24 71%; 91%	Ubiquitin activating enzyme (E1)	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2996 (1e-27; 74%)
Cellular transport						
358	MGL_2787 (XM_001729749)	1e-29 70%; 91%	<i>Ustilago maydis</i> UM05471 (XM_756525)	1e-25 87%; 92%	Fe-S cluster assembly scaffold protein	<i>Ustilago maydis</i> UM05471 (1e-19; 76%)
359	MGL_2751 (XM_001730317)	9e-41 93%; 98%	<i>Ustilago maydis</i> UM05662 (XM_756716)	1e-31 77%; 89%	Eukaryotic porin	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2751 (3e-69; 84%)
360	MGL_2587 (XM_001730153)	4e-95 87%; 94%	<i>Ustilago maydis</i> UM03762 (XM_754816)	8e-67 72%; 82%	related to GLE2 - required for nuclear pore complex structure & function	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2587 (5e-70; 73%)
361	MGL_3780 (XM_001728940)	3e-57 94%; 97%	<i>Ustilago maydis</i> UM02859 (XM_753913)	3e-51 84%; 94%	Importin beta- related nuclear transport receptor	<i>Ustilago maydis</i> UM02859 (5e-80; 81%)
362	MGL_0542 (XM_001732715)	8e-42 88%; 96%	<i>Ustilago maydis</i> UM00630 (XM_751684)	8e-29 68%; 82%	V-type ATPase 116kDa subunit family	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0542 (1e-72; 86%)
Unclassified proteins						
366	MGL_0063 (XM_001732236)	9e-29 52%; 77%	<i>Ustilago maydis</i> UM00102 (XM_751156)	1e-24 49%; 68%	no match found	No significant similarity
367	MGL_0063 (XM_001732236)	3e-24 50%; 74%	<i>Ustilago maydis</i> UM05528 (XM_756582)	1e-18 41%; 60%	no match found	No significant similarity
368	MGL_0063 (XM_001732236)	9e-25 48%; 71%	<i>Ustilago maydis</i> UM00102 (XM_751156)	4e-18 44%; 65%	no match found	No significant similarity
369	MGL_0754 (XM_001732109)	9e-46 86%; 92%	<i>Candida albicans</i> CaO19.13944 (XM_707070)	2e-25 68%; 78%	Uncharacterized Zn ribbon-containing protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0754 (4e-43; 76%)

Tabelle 10: 3 Stunden Kategorie 2: *Malassezia globosa* unter den 100 besten Treffern, jedoch nicht als bester Treffer (NCBI).

E= e-value, I= Identity, S= Similarity. Mit * markierte Sequenzen: Kein bester oder zweitbeste Treffer in der NCBI Datenbank, aber Treffer in der MIPS *U. maydis* Datenbank. Fett gedruckt: Gleiches Ergebnis für tblastx-Suche und blastn-Suche.

Seq. Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) (Accession Nr.)	E I; S	Bester Treffer translated BLAST in <i>M. globosa</i> (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolism						
Amino acid / nitrogen metabolism						
303	<i>Aspergillus terreus</i> ATEG_01774 (XM_001209139)	2e-41 57%; 72%	MGL_0703 (XM_001732058)	2e-31 67%; 80%	Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0703 (1e-17; 71%)
305	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	3e-12 40%; 52%	MGL_3024 (XM_001729986)	9e-12 43%; 50%	Iron-Sulfur cluster nifU-like protein scaffold protein	<i>Macaca fascicularis</i> androgen receptor (2e-18; 96%)
306	<i>Oryza sativa</i> (AK119950)	6e-59 80%; 90%	MGL_1091 (XM_001731771)	2e-57 77%; 86%	Isopropylmalate/homocitrate/ citramalate synthases	<i>Oryza sativa</i> (5e-68; 79%)
Carbohydrate and C-compound metabolism						
320	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> SS1G_10803 (XM_001588306)	4e-43 54%; 72%	MGL_0654 (XM_001732009)	2e-37 64%; 77%	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0654 (9e-24; 66%)
Metabolism others						
322	<i>Ustilago maydis</i> UM02703 (XM_753757)	1e-37 62%; 79%	MGL_0335 (XM_001732508)	4e-36 81%; 89%	Fructose-1,6-bisphosphatase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0335 (5e-30; 70%)
323	<i>Arthrobacter</i> sp. FB24 (CP000454)	1e-19 56%; 73%	MGL_0881 (XM_001731561)	8e-13 45%; 63%	Predicted epimerase, PhzC/PhzF homolog	No significant similarity
Transcription						
329	<i>Nematostella vectensis</i> (XM_001640386)	2e-77 92%; 95%	MGL_3512 (XM_001729425)	2e-76 95%; 97%	Histone H3	<i>Ustilago maydis</i> histone H3 UM02709 (4e-134; 86%)
331	<i>Ustilago maydis</i> h4 gene for histone 4 (AJ646896)	3e-49 95%; 97%	MGL_2855 (XM_001729817)	8e-44 96%; 97%	Histone H4	<i>Ustilago maydis</i> histone H4 UM02710 (5e-106; 87%)
333	<i>Ustilago maydis</i> h4 gene for histone 4 (AJ646896)	3e-50 96%; 98%	MGL_2855 (XM_001729817)	8e-45 97%; 98%	Histone H4	<i>Ustilago maydis</i> histone H4 UM02710 (4e-107; 88%)
334	<i>Ustilago maydis</i> h4 gene for histone 4 (AJ646896)	3e-50 96%; 98%	MGL_2855 (XM_001729817)	8e-45 97%; 98%	Histone H4	<i>Ustilago maydis</i> histone H4 UM02710 (5e-106; (87%)
Protein synthesis						
336	<i>Cryptococcus neoformans</i> CNM01460 (XM_568453)	4e-28 79%; 85%	MGL_1433 (XM_001731198)	6e-27 80%; 87%	TCTP, Translationally controlled tumour protein	<i>Cryptococcus neoformans</i> CNM01460 (9e-56; 79%)
337	<i>Ustilago maydis</i> UM11719 (XM_753768)	3e-24 83%; 92%	MGL_3501 (XM_001729414)	2e-23 87%; 95%	Ribosomal protein S4E	<i>Ustilago maydis</i> UM11719 (6e-31; 80%)
341	<i>Ustilago maydis</i> UM00867 (XM_751921)	1e-49 81%; 91%	MGL_3348 (XM_001729261)	1e-48 81%; 92%	Ribosomal protein S8	<i>Ustilago maydis</i> UM00867 (2e-76; 82%)
344	<i>Neurospora crassa</i> 40S ribosomal protein S23 (XM_951162)	3e-23 84%; 91%	MGL_1652 (XM_001731417)	2e-22 91%; 93%	Ribosomal protein S23	<i>Neurospora crassa</i> (2e-51; 90%)
345	<i>Ustilago maydis</i> UM11135 (XM_752689)	6e-42 87%; 93%	MGL_3168 (XM_001729572)	2e-26 98%; 98%	Ribosomal protein S27	<i>Ustilago maydis</i> UM11135 (3e-46; 83%)
346	<i>Coccidioides immitis</i> RS CIMG_05425 (XM_001245983)	3e-69 69%; 88%	MGL_2060 (XM_001731009)	1e-67 77%; 82%	Ribosomal protein L3	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2060 (2e-139; 80%)
Protein fate						
357	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Z99161)	2e-48 94%; 98%	MGL_3832 (XM_001728992)	1e-47 96%; 98%	Ubiquitin	<i>Podospora anserina</i> (PODANSg6264) (9e-89; 87%)

Tabelle 11: 3 Stunden Kategorie 3: Kein Treffer in *Malassezia globosa* (NCBI).

E= e-value, I= Identity, S= Similarity. Mit * markierte Sequenzen: Kein bester oder zweitbesten Treffer in der NCBI Datenbank, aber Treffer in der MIPS *U. maydis* Datenbank. Fett gedruckt: Gleiches Ergebnis für tblastx-Suche und blastn-Suche.

Seq. Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolism				
Carbohydrate and C-compound metabolism				
321*	<i>Ustilago maydis</i> UM11539 (XM_755692)	3e-05 32%; 50%	related to SNF8	No significant similarity
Metabolism others				
325*	<i>Ustilago maydis</i> UM00567 (XM_751621)	2e-04 31%; 56%	related to B2-aldehyde-forming enzyme	No significant similarity
Cell Cycle				
353*	<i>Ustilago maydis</i> UM04487 (XM_753121)	6e-06 33%; 48%	Karyogamy Protein	No significant similarity
Transcription				
327	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435 (AP006716)	4e-45 40%; 61%	RimL, Acetyltransferase (GNAT) family	No significant similarity
330	<i>Aspergillus niger</i> An08g06960 (XM_001392774)	7e-09 72%; 77%	Histone H3	<i>Aspergillus niger</i> An08g06960 (1e-22; 83%)
Protein synthesis				
350	<i>Malassezia furfur</i> (AY623429)	2e-123 99%; 99%	18S ribosomal RNA gene	<i>Malassezia furfur</i> (0.0; 98%)
Cellular Transport				
363*	<i>Ustilago maydis</i> um04736 (XM_755790)	1e-09 41%; 60%	snf7, involved in vacuolar transport	No significant similarity
Cell rescue / Stress response				
364b	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (CP000480)	1e-15 52%; 63%	Hemoglobin-like flavoprotein	No significant similarity
No significant similarity				
	370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379			No significant similarity

Tabelle 12: 5 Stunden Kategorie 1: *Malassezia globosa* als bester Treffer (NCBI).

E= e-value, I= Identity, S= Similarity. Mit * markierte Sequenzen: Kein bester oder zweitbesten Treffer in der NCBI Datenbank, aber Treffer in der MIPS *U. maydis* Datenbank. Fett gedruckt: Gleiches Ergebnis für tblastx-Suche und blastn-Suche.

Seq. Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) in <i>M. globosa</i> (Accession Nr.)	E I; S	Bester Treffer translated BLAST in anderen Organismen (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolism						
Amino acid / nitrogen metabolism						
501	MGL_2109 (XM_001731058)	6e-24 46%; 67%	<i>Ustilago maydis</i> UM04801* (XM_755855)	5e-08 37%; 56%	Glutathione S-Transferase	No significant similarity
502	MGL_0780 (XM_001732135)	4e-32 87%; 95%	<i>Ustilago maydis</i> UM05776 (XM_756830)	6e-28 74%; 90%	Cystein desulfurase & related enz. (nifS)	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0780 (3e-42; 80%)
504	MGL_3024 (XM_001729986)	7e-56 88%; 95%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	3e-52 82%; 92%	Iron-Sulfur cluster nifU-like protein	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (9e-47; 73%)
505	MGL_0320 (XM_001732493)	1e-19 77%; 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM01627 (XM_752681)	9e-16 66%; 85%	Citrate synthase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0320 (5e-36; 85%)
506	MGL_4035 (XM_001728816)	2e-14 82%; 85%	<i>Ustilago maydis</i> UM02899 (XM_753953)	1e-13 71%; 80%	Mitochondrial aconitase A swivel domain	<i>Ustilago maydis</i> UM02899 (7e-22; 79%)
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism						
507	MGL_0279 (XM_001732452)	2e-18 75%; 91%	<i>Ustilago maydis</i> UM02116 (XM_753170)	2e-10 55%; 65%	Lipase (class 3).	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0279 (2e-05; 71%)
509	MGL_1574 (XM_001731339)	3e-11 61%; 77%	<i>Neurospora crassa</i> NCU06697 (XM_955919)	3e-05 47%; 64%	Acid sphingomyelinase	No significant similarity
Carbohydrate and C-compound metabolism						
516	MGL_4190 (XM_001728659)	7e-12 72%; 83%	<i>Ustilago maydis</i> UM05170 (XM_756224)	5e-07 55%; 69%	Glycerate dehydrogenase	<i>Platanus x acerifolia</i> (7e-31; 100%)
517	MGL_4179 (XM_001728648)	1e-25 85%; 98%	<i>Ustilago maydis</i> UM04871 (XM_755925)	7e-24 82%; 92%	Phosphoglycerate kinase	<i>Ustilago maydis</i> UM04871 (2e-38; 81%)
Metabolism others						
518	MGL_4159 (XM_001728628)	1e-35 49%; 70%	<i>Candida albicans</i> pyruvate decarboxylase CaO19_2877 (XM_710440)	2e-27 45%; 69%	Pyruvate-/ Indolepyruvate decarboxylase	No significant similarity
519	MGL_1313 (XM_001731078)	5e-24 66%; 77%	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> SPCC1223 (NM_001023338)	7e-20 57%; 73%	NMT1/THI5 like, Thiamin biosynthesis	<i>Ustilago maydis</i> UM00816 (4e-15; 77%)
520	MGL_2660 (XM_001730226)	2e-13 60%; 85%	<i>Ustilago maydis</i> UM01022 (XM_752076)	5e-09 55%; 71%	Rare lipoprotein A (RlpA)-like double-psi beta-barrel, B2-aldehyde forming enzyme	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0337 (3e-09; 73%)
521	MGL_1057 (XM_001731737)	5e-20 63%; 75%	<i>Ustilago maydis</i> UM12184 (XM_753315)	1e-19 58%; 75%	Rare lipoprotein A (RlpA)-like double-psi beta-barrel	No significant similarity
Energy						
527	MGL_3419 (XM_001729332)	5e-19 80%; 88%	<i>Fomitopsis palustris</i> FPICL1 isocitrate lyase (AB079254)	1e-18 80%; 86%	Isocitrate lyase	<i>Oryza sativa</i> (1e-40; 90%)
Cell Cycle						
528	MGL_0337 (XM_001732510)	8e-37 93%; 100%	<i>Ustilago maydis</i> alternative cyclin Pcl1 UM11928 (XM_753756)	7e-27 80%; 90%	Cyclin	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0337 (2e-43; 80%)
Transcription						
529	MGL_0308 (XM_001732481)	1e-20 55%; 75%	<i>Ustilago maydis</i> UM00922* (XM_751976)	4e-15 43%; 63%	Transcription factor Tfb4	No significant similarity

530	MGL_3680 (XM_001729161)	5e-41 67%; 85%	<i>Ustilago maydis</i> UM03063 (XM_754117)	5e-28 73%; 82%	SAM-dependent methyltransferases related to tRNA - methyltransferase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3680 (6e-15; 68%)
531	MGL_3950 (XM_001728904)	1e-29 51%; 69%	<i>Botryotinia fuckeliana</i> BC1G_14317 (XM_001546930)	5e-26 50%; 69%	Ribonuclease T2	No significant similarity
Protein biosynthesis						
533	MGL_3353 (XM_001729266)	7e-126 93%; 97%	<i>Oryza sativa</i> (AK107679)	1e-115 86%; 93%	Seryl-tRNA synthetase (SerRS) class II	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3353 (3e-155; 81%)
Protein fate						
534	MGL_0815 (XM_001732170)	1e-14 50%; 75%	<i>Magnaporthe grisea</i> MG09538 (XM_364693)	2e-05 60%; 65%	Serine carboxypeptidase	No significant similarity
535	MGL_3953 (XM_001728907)	1e-04 50%; 65%	<i>Ustilago maydis</i> UM05739* (XM_756793)	7e-05 47%; 61%	Family of activating enzymes (E1) of ubiquitin-like proteins	No significant similarity
591	MGL_1964 (XM_001730913)	2e-04 62%; 62%	<i>Ustilago maydis</i> UM01883* (XM_752937)	2e-04 53%; 59%	Protein-disulfide isomerase	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene (9e-15; 76%)
Protein activity regulation						
538	MGL_3887 (XM_001728841)	3e-61 73%; 87%	<i>Ustilago maydis</i> UM02576 (XM_753630)	4e-39 51%; 74%	Patched family; related to Sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3887 (9e-43; 73%)
539	MGL_3887 (XM_001728841)	3e-61 72%; 87%	<i>Ustilago maydis</i> UM02576 (XM_753630)	4e-39 51%; 74%	Patched family	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3887 (7e-43; 73%)
Cellular transport						
541	MGL_1200 (XM_001731880)	2e-18 72%; 93%	<i>Ustilago maydis</i> UM01740 (XP_757887)	2e-10 55%; 74%	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain	<i>Belgica antarctica</i> (9e-05; 100%)
542	MGL_1200 (XM_001731880)	1e-18 72%; 93%	<i>Ustilago maydis</i> UM01740 (XP_757887)	1e-10 55%; 74%	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain	No significant similarity
545	MGL_0527 (XM_001732700)	1e-05 80%; 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM12108* (XM_751654)	4e-09 90%; 100%	Syntaxin / SNARE domain	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0527 (6e-11; 80%)
546	MGL_0527 (XM_001732700)	3e-06 76%; 86%	<i>Ustilago maydis</i> UM12108* (XM_751654)	4e-10 87%; 100%	Syntaxin / SNARE domain	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0527 (7e-11; 80%)
547	MGL_0527 (XM_001732700)	1e-05 80%; 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM12108* (XM_751654)	4e-09 90%; 100%	Syntaxin / SNARE domain	<i>Malassezia globosa</i> MGL_0527 (6e-11; 80%)
552	MGL_2422 (XM_001730574)	3e-15 40%; 61%	<i>Ustilago maydis</i> UM11604 (XM_751436)	1e-05 30%; 48%	Ferric reductase	No significant similarity
Biogenesis of cellular components						
554	MGL_3753 (XM_001729234)	8e-34 86%; 95%	<i>Ustilago maydis</i> UM04314 (XM_755368)	4e-28 75%; 88%	Actin depolymerisation factor	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3753 (1e-34; 76%)
Cell rescue / Stress response						
556	MGL_2367 (XM_001730519)	1e-52 82%; 88%	<i>Ustilago maydis</i> UM01728 (XM_752782)	6e-44 79%; 88%	Methioninsulfoxid-Reduktase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2367 (1e-32; 72%)
557	MGL_2367 (XM_001730519)	1e-52 82%; 88%	<i>Ustilago maydis</i> UM01728 (XM_752782)	6e-44 79%; 88%	Methioninsulfoxid-Reduktase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2367 (1e-32; 72%)
558	MGL_2367 (XM_001730519)	6e-41 85%; 87%	<i>Ustilago maydis</i> UM01728 (XM_752782)	3e-33 84%; 90%	Methioninsulfoxid-Reduktase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2367 (1e-30; 75%)
559	MGL_2367 (XM_001730519)	5e-30 76%; 76%	<i>Ustilago maydis</i> UM01728 (XM_752782)	4e-24 60%; 65%	Methioninsulfoxid-Reduktase	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2367 (8e-21; 70%)

560	MGL_2207 (XM_001730359)	7e-51 92%; 95%	<i>Oryza sativa</i> (AK107284)	2e-47 84%; 91%	Protein phosphatase 2A regulatory B subunit	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2207 (2e-52; 77%)
561	MGL_0846 (XM_001731526)	3e-06 64%; 79%	<i>Ustilago maydis</i> UM02377 (XM_753431)	1e-04 55%; 63%	Cytochrome c peroxidase	No significant similarity
Unclassified Proteins						
562	MGL_3153 (XM_001729557)	5e-10 46%; 62%	<i>Ustilago maydis</i> UM03923 (XM_754977)	4e-07 50%; 58%	Function unknown	No significant similarity
563	MGL_3153 (XM_001729557)	3e-08 45%; 60%	<i>Ustilago maydis</i> UM03923 (XM_754977)	4e-07 50%; 58%	Function unknown	No significant similarity
586	MGL_0759 (XM_001732114)	7e-04 81%; 95%	No match found		Function unknown	No significant similarity

Tabelle 13: 5 Stunden Kategorie 2: *Malassezia globosa* unter den 100 besten Treffern, jedoch nicht als bester Treffer (NCBI).

E= e-value, I= Identity, S= Similarity. Mit * markierte Sequenzen: Kein bester oder zweitbesten Treffer in der NCBI Datenbank, aber Treffer in der MIPS *U. maydis* Datenbank. Fett gedruckt: Gleiches Ergebnis für tblastx-Suche und blastn-Suche.

Seq. Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) (Accession Nr.)	E I; S	Bester Treffer translated BLAST in <i>M. globosa</i> (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolism						
Amino acid / nitrogen metabolism						
503	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> SS1G_00355 (XM_001598219)	6e-08 78%; 85%	MGL_3253 (XM_001729657)	8e-07 70%; 92%	2-Nitropropane dioxygenase (NPD)	<i>Chaetomium globosum</i> CHGG_08930 (5e-14; 80%)
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism						
508	<i>Malassezia furfur</i> secreted lipase 1 precursor (LIP1) (DQ155666)	1e-127 98%; 98%	MGL_1311 (XM_001731076)	1e-58 48%; 65%	Secretory lipase	<i>Malassezia furfur</i> secreted lipase 1 precursor (LIP1) (0.0; 99%)
Carbohydrate and C-compound metabolism						
510	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (XM_753207)	2e-29 73%; 84%	MGL_4008 (XM_001728789)	1e-17 54%; 70%	Flavin-binding monooxygenase-like	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (4e-16; 71%)
511	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (XM_753207)	2e-29 73%; 84%	MGL_4008 (XM_001728789)	1e-17 54%; 70%	Flavin-binding monooxygenase-like	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (4e-16; 71%)
512	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (XM_753207)	1e-26 73%; 83%	MGL_4008 (XM_001728789)	6e-17 56%; 73%	Flavin-binding monooxygenase-like	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (4e-16; 71%)
513	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (XM_753207)	1e-26 73%; 83%	MGL_4008 (XM_001728789)	6e-17 56%; 73%	Flavin-binding monooxygenase-like	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (4e-16; 71%)
514	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (XM_753207)	6e-27 73%; 84%	MGL_4008 (XM_001728789)	7e-18 56%; 73%	Flavin-binding monooxygenase-like	<i>Ustilago maydis</i> UM10062 (3e-17; 71%)
515	<i>Ustilago maydis</i> UM11922 (XM_753743)	4e-50 77%; 81%	MGL_0816 (XM_001732171)	3e-48 63%; 77%	Chitin deacetylase	<i>Ustilago maydis</i> UM11922 (2e-26; 80%)
Energy						
525	<i>Candida albicans</i> cytochrome C gene (CYC1) (CAU57896)	2e-07 71%; 90%	MGL_3743 (XM_001729224)	7e-05 70%; 92%	Cytochrome c2	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> CC1G_10735 (8e-17; 85%)

Protein fate						
536	<i>Pleurotus ostreatus</i> putative ubiquitin (ubq1) (AJ416499)	7e-120 93%; 96%	MGL_1040 (XM_001731720)	2e-95 96%; 100%	Ubiquitin	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> OSTLU_26775 (7e-177; 83%)
Cellular transport						
540	<i>Ustilago maydis</i> UM05471 (XM_756525)	2e-16 94%; 100%	MGL_2787 (XM_001729749)	2e-15 86%; 97%	Fe-S cluster assembly scaffold protein, HesB-like domain	<i>Ustilago maydis</i> UM05471 (5e-14; 77%)
543	<i>Ustilago maydis</i> UM06292 (XM_757346)	3e-41 78%; 92%	MGL_1608 (XM_001731373)	7e-41 72%; 83%	Vacuolar protein sorting-associated protein 26	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1608 (8e-46; 76%)
544	<i>Ustilago maydis</i> UM00508 (XM_751562)	1e-34 70%; 81%	MGL_1143 (XM_001731823)	1e-27 93%; 98%	ATP synthase subunit C	<i>Ustilago maydis</i> UM00508 (1e-85; 87%)
548	<i>Ustilago maydis</i> UM06138 (XM_757192)	2e-12 53%; 77%	MGL_3042 (XM_001730004)	3e-07 62%; 85%	Dipeptide/tripeptide permease	No significant similarity
549	<i>Ustilago maydis</i> UM06138 (XM_757192)	2e-12 53%; 77%	MGL_3042 (XM_001730004)	3e-07 62%; 85%	Dipeptide/tripeptide permease	No significant similarity
550	<i>Aspergillus niger</i> An01g11630 (XM_001389536)	1e-09 83%; 96%	MGL_1800 (XM_001730749)	4e-07 82%; 92%	Preprotein trans- locase subunit Sss1	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> CC1G_01841 (6e-15; 82%)
551	<i>Ustilago maydis</i> UM03718 (XM_754772)	2e-87 82%; 90%	MGL_0097 (XM_001732270)	6e-82 79%; 90%	SURF4	<i>Oryza sativa</i> (5e-128; 75%)
Cellular communication / signal transduction						
553	<i>Ustilago hordei</i> G-alpha subunit (FIL1) (U76672)	3e-29 72%; 86%	MGL_0613 (XM_001732270)	1e-28 85%; 93%	G protein alpha subunit (FIL1)	<i>Hypocrea jecorina</i> G- alpha protein (1e-22; 76%)
Cell rescue / Stress response						
555	<i>Mycobacterium sp.</i> MCS (CP000384)	1e-12 61%; 80%	MGL_2992 (XM_001729954)	2e-06 45%; 65%	Flavodoxin reductases (ferredoxin-NADPH reductases) family 1, flavoheprotein	No significant similarity
Unclassified Proteins						
564	<i>Ustilago maydis</i> UM03923 (XM_754977)	2e-17 54%; 66%	MGL_3153 (XM_001729557)	1e-13 40%; 58%	Function unknown	No significant similarity
565	<i>Ustilago maydis</i> UM03923 (XM_754977)	6e-15 56%; 67%	MGL_3153 (XM_001729557)	7e-12 39%; 59%	Function unknown	No significant similarity

Tabelle 14: 5 Stunden Kategorie 3: Kein Treffer in *Malassezia globosa* (NCBI).

E= e-value, I= Identity, S= Similarity. Mit * markierte Sequenzen: Kein bester oder zweitbeste Treffer in der NCBI Datenbank, aber Treffer in der MIPS *U. maydis* Datenbank. Fett gedruckt: Gleiches Ergebnis für tblastx-Suche und blastn-Suche.

Seq. Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolism				
Metabolism others				
522	<i>Rhodococcus sp.</i> RHA1 (CP000431)	4e-08 58%; 65%	Methylase involved in ubiquinone/ menaquinone biosynthesis	No significant similarity
523	<i>Arthrobacter sp.</i> FB24 (CP000454)	4e-08 38%; 52%	Methylase involved in ubiquinone/ menaquinone biosynthesis	No significant similarity
Energy				
524*	<i>Ustilago maydis</i> UM11830 (XM_751719)	6e-07 70%; 72%	NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I	No significant similarity
526*	<i>Ustilago maydis</i> UM11938 (XM_754059)	9e-04 88%; 100%	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4	<i>Ustilago maydis</i> UM11938 (6e-09; 90%)
Transcription				
532*	<i>Ustilago maydis</i> UM02059 (XM_753113)	4e-12 76%; 84%	DNA-directed RNA polymerase III	<i>Ustilago maydis</i> UM02059 (7e-12; 80%)
Protein fate				
537	<i>Ustilago maydis</i> UM06118 (XM_757172)	4e-32 62%; 76%	related to Tripeptidyl-peptidase I precursor	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> S53 protease (prt53A) (2e-04; 67%)
Unclassified protein				
566*	<i>Ustilago maydis</i> UM11139 (No accession number)	4e-09 51%; 78%	Function unknown	No significant similarity
567*	<i>Ustilago maydis</i> UM11139 (No accession number)	5e-09 51%; 78%	Function unknown	No significant similarity
568*	<i>Ustilago maydis</i> UM11139 (No accession number)	1e-09 52%; 78%	Function unknown	No significant similarity
569	<i>Ustilago maydis</i> UM02672 (XM_753726)	3e-09 38%; 72%	DUF1690; Protein of Unknown function	No significant similarity
570	<i>Ustilago maydis</i> UM11133 (XM_755275)	2e-05 43%; 62%	Function unknown	No significant similarity
571	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CP000744)	2e-04 36%; 41%	Function unknown	No significant similarity
No significant similarity				
579	No significant similarity			<i>Malassezia globosa</i> MGL_1920 (5e-04; 79%)
590	No significant similarity			<i>Cucumis sativus</i> 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase (5e-04; 93%)
572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 587, 588, 589				No significant similarity

Die Sequenzen wurden anhand der stärksten Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus *M. globosa*, *U. maydis*, anderen Organismen und keinen bekannten Sequenzen in vier Kategorien eingeteilt. Diese sind in Abbildung 17 für die tblastx-Ergebnisse und die blastn-Ergebnisse der 3h-Sequenzen und in Abbildung 18 für die Ergebnisse der 5h-Sequenzen dargestellt. Während bei den tblastx-Ergebnissen Sequenzen aus *M. globosa* als bester Treffer insbesondere innerhalb des 3h-Kontingents vorherrschten, änderte sich das Verhältnis beim blastn-Search zugunsten „no similarity“ (keine Übereinstimmung). In der blastn-Suche gab es unter den 3h-

Sequenzen häufiger *U. maydis* als besten Treffer (17) als in der tblastx-Suche (12), während es sich mit *M. globosa* als bestem Treffer in beiden Kontingenten umgekehrt verhielt (3h: tblastx: 45 / blastn: 29, 5h: tblastx: 40 / blastn: 21).

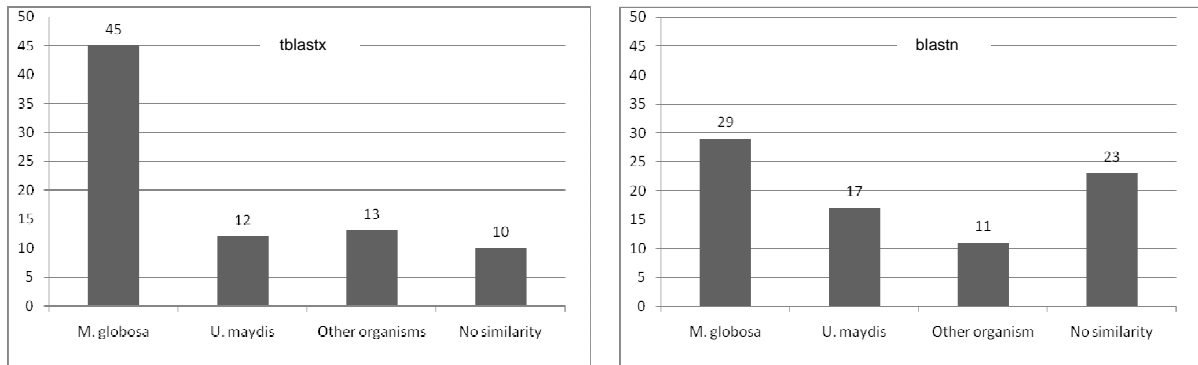


Abbildung 17: Verteilung der translated-BLAST-Ergebnisse (tblastx) (links) und der nucleotid-BLAST-Ergebnisse (blastn) (rechts) der 3h-Sequenzen

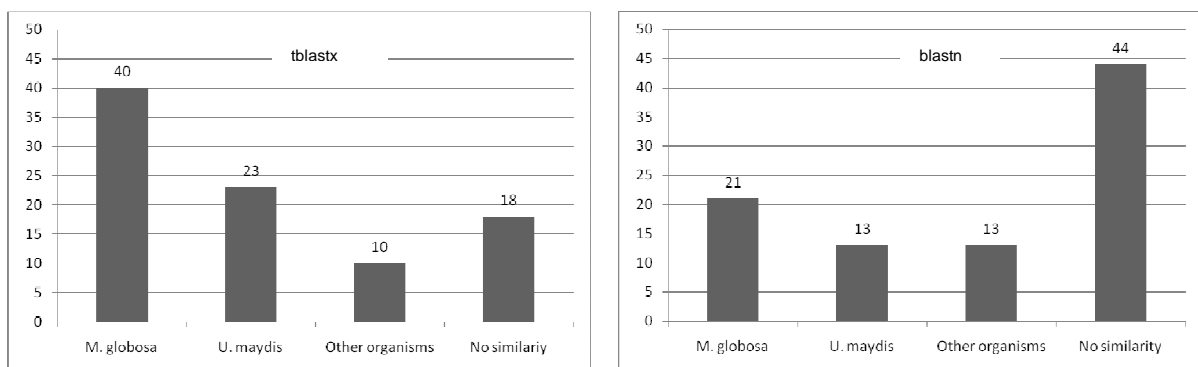


Abbildung 18: Verteilung der translated-BLAST-Ergebnisse (tblastx) (links) und der nucleotid-BLAST-Ergebnisse (blastn) (rechts) der 5h-Sequenzen

Die Sequenzen der 3h- und der 5h-Kontingente waren durch die SeqMan-Software anhand ihrer Sequenzüberschneidungen zunächst gesondert und anschließend gemeinsam in Gruppen eingeteilt worden. Das 3h-Kontingent konnte in 64 Gruppen eingeteilt werden, von denen 54 nur eine Sequenz enthielten, d.h. keine Redundanzen vorlagen. Die übrigen Gruppen, welche jeweils zwei oder mehr Sequenzen enthielten, sind in Tabelle 15 aufgeführt. Neben der BLAST-Suche mit den Einzelsequenzen wurden auch mit den abgeglichenen Gesamtsequenzen tblastx-Suchen durchgeführt. Dabei ergaben einige der Einzelsequenzen trotz Sequenzüberschneidungen nicht zwangsläufig gleiche Ergebnisse im BLAST-Search. Das 5h-Kontingent konnte in 72 Gruppen eingeteilt werden, von denen 62 Gruppen Einzelsequenzen enthielten. Die Gruppen, die Sequenzen mit Überschneidungen enthielten, sind in Tabelle 16 aufgeführt. Im 5h-Kontingent ergaben Einzel- und Gesamtsequenzen stets die gleichen Ergebnisse in der tblastx-Suche.

Tabelle 15: Sequenzüberschneidungen im 3h-Kontingent.

Gruppe	Sequenzen	BLAST-Ergebnis der Einzelsequenzen	BLAST-Ergebnis der Gesamtsequenzen
1	331, 332, 333, 334	Histone H4	Histone H4
2	366, 367, 368, 377	366, 367, 368: MGL_0063 377: no significant similarity	MGL_0063
3	371, 373, 379	no significant similarity	no significant similarity
4	303, 375	303: Cystathionine beta-lyases/gamma-synthases 375: no significant similarity	Cystathionine beta-lyases/ gamma-synthases
5	307, 308	ATP phosphoribosyltransferase	ATP phosphoribosyltransferase
6	310, 311	Long chain acyl-CoA dehydrogenase	Long chain acyl-CoA dehydrogenase
7	338, 339	Ribosomal protein S6e	Ribosomal protein S6e
8	325*, 353*	325: B2-aldehyde-forming enzyme 353: Karyogamy Protein	B2-aldehyde-forming enzyme
9	343, 344	Ribosomal protein S12	Ribosomal protein S12
10	347, 348	Ribosomal protein L11	Ribosomal protein L11

Tabelle 16: Sequenzüberschneidungen im 5h-Kontingent.

Gruppe	Sequenzen	BLAST-Ergebnis der Einzelsequenzen	BLAST-Ergebnis der Gesamtsequenzen
1	510, 511, 512, 513, 514	Flavin-binding monooxygenase	Flavin-binding monooxygenase
2	556, 557, 558, 559	methionine sulfoxide reductase SelR	methionine sulfoxide reductase SelR
3	562, 563, 564, 565	UM03923, function unknown	UM03923, function unknown
4	545, 546, 547	Syntaxin, vesicular transport protein	Syntaxin, vesicular transport protein
5	566, 567, 568	Um11139, function unknown	Um11139, function unknown
6	522, 523	2-polyprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinol methylase	2-polyprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinol methylase
7	538, 539	Related to Sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein	Related to Sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein
8	541, 542	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain
9	548, 549	POT (proton-dependent oligopeptide transport) family	POT (proton-dependent oligopeptide transport) family
10	582, 583	No significant similarity	No significant similarity

In Tabelle 17 sind die redundanten Sequenzen aus beiden Kontingenten angeführt. Es zeigt sich, dass die tblastx-Suche mit den Einzelsequenzen aus Gruppe C zu verschiedenen Ergebnissen führt. Gruppe D enthält Sequenzen ohne signifikante Ähnlichkeit zu einer bekannten Sequenz.

Neben den gleichen BLAST-Ergebnissen der Gruppen A (HesB-like domain) und B (Ubiquitin) konnten noch zweimal gleiche BLAST-Ergebnisse durch Sequenzen beider Kontingente ohne Sequenzüberschneidungen erzielt werden. Diese waren ein Iron-Sulfur cluster nifU-like Protein (Seq 305 und 504) und ein Flavohämoprotein (Seq. 364 und 555).

Insgesamt konnten also vier BLAST-Ergebnisse mit Sequenzen beider Kontingente erzielt werden.

Tabelle 17: Sequenzüberschneidungen von 3h- und 5h-Sequenzen.

Gruppe	Seq. 3h	Seq. 5h	BLAST-Ergebnis der Einzelsequenzen	BLAST-Ergebnis der Gesamtsequenzen
A	358	540	HesB-like domain	HesB-like domain
B	357	536	ubiquitin (ubq1)	ubiquitin
C	363	504	363: conserved hypothetical protein involved in vacuolar transport 504: Iron-Sulfur cluster nifU-like protein	Iron-Sulfur cluster nifU-like protein
D	371, 373, 379	576	No significant similarity	No significant similarity

4.1.4. Funktionelle Aspekte

4.1.4.1. Einteilung anhand des MIPS FunCat und verschiedenen Stoffwechselwegen

Die differentiell exprimierten Sequenzen wurden anhand der wahrscheinlichen Funktion des besten BLAST-Ergebnisses gemäß des MIPS functional catalogues (Ruepp et al. 2004; Mewes et al. 2000) eingeteilt. In Abbildung 19 sind die einzelnen Kategorien der 3h- bzw. der 5h-Sequenzen anteilig dargestellt.

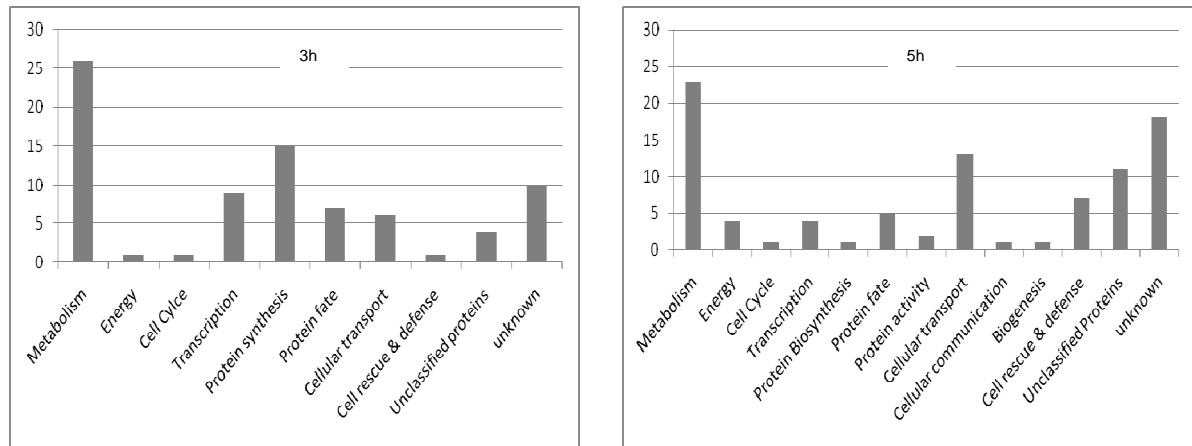


Abbildung 19: Funktionelle Einteilung der 3h-Sequenzen (links) und der 5h-Sequenzen (rechts).

Während die 3h-Sequenzen in 10 Kategorien eingeteilt werden konnten, waren es bei den 5h-Sequenzen 13 Kategorien. Bei beiden Kontingenten stellt „Metabolismus“ die dominante Kategorie dar, ohne weitere Einteilung in Primär- und Sekundärmetabolismus. Im 3h-Kontingent waren „Proteinbiosynthese“, „unbekannte Funktion“ und „Transkription“ die nächsthäufigsten Kategorien, während im 5h-Kontingent „unbekannte Funktion“ und „zellulärer Transport“ die nächsthäufigsten Kategorien darstellen.

Es konnten drei Sequenzen mit Ähnlichkeiten im tblastx zu Proteinen aus Tryptophanstoffwechselwegen identifiziert werden, nämlich Seq. 301 (Chorismat Synthase), Seq. 302 (Tryptophanaminotransferase) und Seq. 518 (Pyruvatdecarboxylase/ Indolpyruvatdecarboxylase (PDC/IPDC)). Die Chorismat Synthase (AroC) katalysiert im Shikimat Stoffwechselweg den letzten Schritt von 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphate zu Chorismat, der gemeinsamen Vorstufe aromatischer Verbindungen wie den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin (Macheroux et al. 1999; Morell et al. 1967). Die Kynurenin / Alpha-aminoadipate Aminotransferase (Tryptophanaminotransferase) Tam1 (UM01804) aus *U. maydis* desaminiert Tryptophan zu Indolpyruvat (Zuther et al.

2008). Indolpyruvat wiederum kann von einer Pyruvatdecarboxylase zu Indolacetaldehyd umgesetzt werden (Dickinson et al. 2003; Iraqui et al. 1999).

Andere Sequenzen zeigten im tblastx Ähnlichkeiten zu Proteinen, die mit Primär- und Sekundärstoffwechselwegen assoziiert sind, insbesondere dem Isoprenoidstoffwechsel (Seq. 314: Polyprenyltransferase, Seq. 315: Cytochrome P450, C-22-Sterol-Desaturase, Seq. 316: Isopentenylidiphosphate Isomerase, Seq. 522 und 523: Methylase aus Ubichinon-/Menachinon-Biosynthese), welcher unter anderem an der Bildung fungaler Alkaloide beteiligt ist (Keller et al. 2005).

Weitere Sequenzen zeigten im tblastx Ähnlichkeiten zu Iron-Sulfur-Proteinen, wie z.B. der Aconitase (Seq. 506) oder Ferredoxinreduktasen (555), bzw. Proteinen, die an der Biosynthese der Iron-Sulfur-Proteine beteiligt sind (Seq 305, 358, 502, 504, 540).

Im 5h-Kontigent fanden sich darüberhinaus 5 Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Flavinbindenden Monooxygenasen (510-514). Auch finden sich einige Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Proteinen mit Transporterfunktion oder Beteiligung an der Proteinbiosynthese.

4.1.4.2. Einordnung identifizierter Sequenzen in Modellstoffwechselwege der Tryptophanmetabolite aus *M. furfur*

Eine mögliche Beteiligung differenziell exprimierter Sequenzen im gemeinsamen Vorläuferstoffwechsel der Modellstoffwechselwege ist in Abbildung 20 dargestellt. Die mögliche Beteiligung weiterer differenziell exprimierter Sequenzen am Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsel in *M. furfur* wird im Diskussionsteil (Kapitel 5) erörtert.

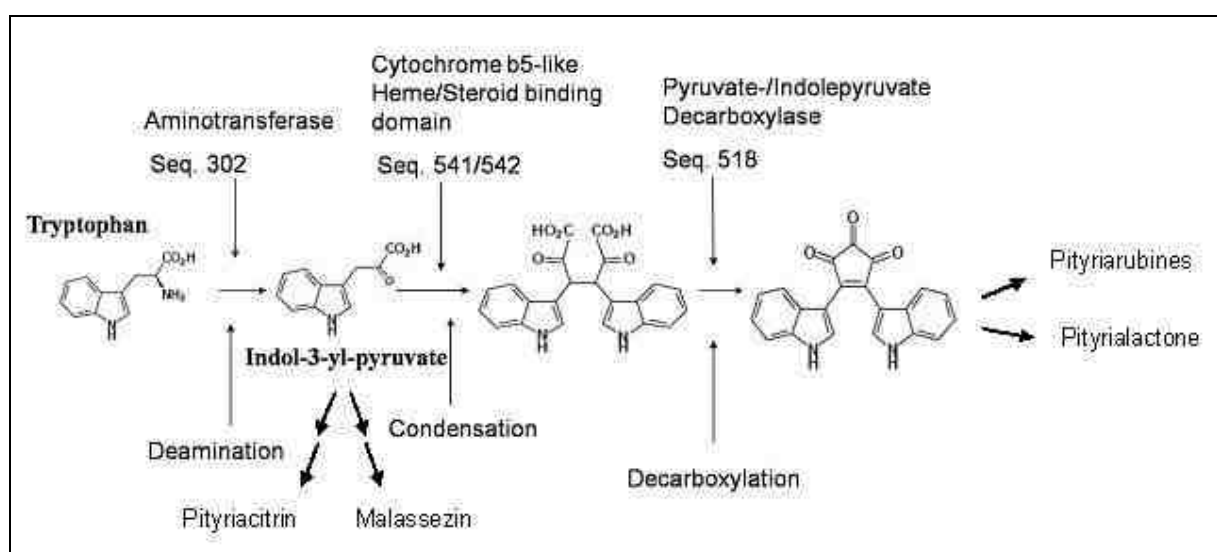


Abbildung 20: Mögliche Beteiligung identifizierter Sequenzen am Stoffwechsel der theoretischen gemeinsamen Vorstufen der Modellstoffwechselwege

4.2. Überprüfung der Expression ausgewählter Sequenzen mittels semiquantitativer PCR

Es wurde untersucht, wie die Expression einiger differentiell exprimierter Sequenzen über einen Zeitraum von 2 Wochen, zum Zeitpunkt 3h, 5h, 48h und 2Wo, verlief. Zur Erarbeitung der Expressionsprofile wurden semiquantitative PCRs durchgeführt.

4.2.1. Primerdesign

4.2.1.1. Primer für Housekeeping-Gene, degenerate PCR

Als internen Standard für die Untersuchung der Expression der differentiell exprimierten Sequenzen mittels semiquantitativer PCR wurden Gensequenzen benötigt, die auch unter unterschiedlichen Kulturbedingungen stets gleich exprimiert werden, sogenannte „Housekeeping Gene“. In den durchgeführten Experimenten wurden als erste Housekeeping Primer ein Primerpaar für die ITS1-Region von *Malassezia*-Hefen verwendet (Makimura et al. 2000) (Sequenz Tabelle 19). Als weiteres Housekeeping-Gen wurde die Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase (*sdh2*) ausgewählt, da die Succinatdehydrogenase als konstitutionell exprimiertes Gen in *Uromyces fabae* (Wirsel et al. 2004) gilt, und auch im Affymetrix *Ustilago maydis* GenArray als Kontrolle eingesetzt wurde (persönliche Mitteilung H. Eichhorn/J. Schirawski, Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg). Da die Sequenz der *sdh2* aus *M. furfur* bislang nicht bekannt ist, wurden zunächst eine Teilsequenz mittels degenerate PCR ermittelt und anhand dieser Teilsequenz Primer für die semiquantitative PCR entworfen. Die Gesamtsequenz wurde mittels inverser PCR aufgeklärt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird diese Sequenz in der vorliegenden Arbeit als *mf_sdh2* bezeichnet.

Mittels MegAlign-Software waren die Sdh2-Protein-Sequenzen von UM00844 und neun NCBI BLAST-Treffern, sieben Basidiomyceten und zwei Ascomyceten, abgeglichen worden (Abbildung 21).

Anhand der retrograden Übersetzung der Konsensusproteinsequenz in die Nukleotidsequenz wurden von konservierten Regionen Primer für die degenerate PCR designt. Diese sind mit ihren Annealingtemperaturen in Tabelle 18 aufgeführt.

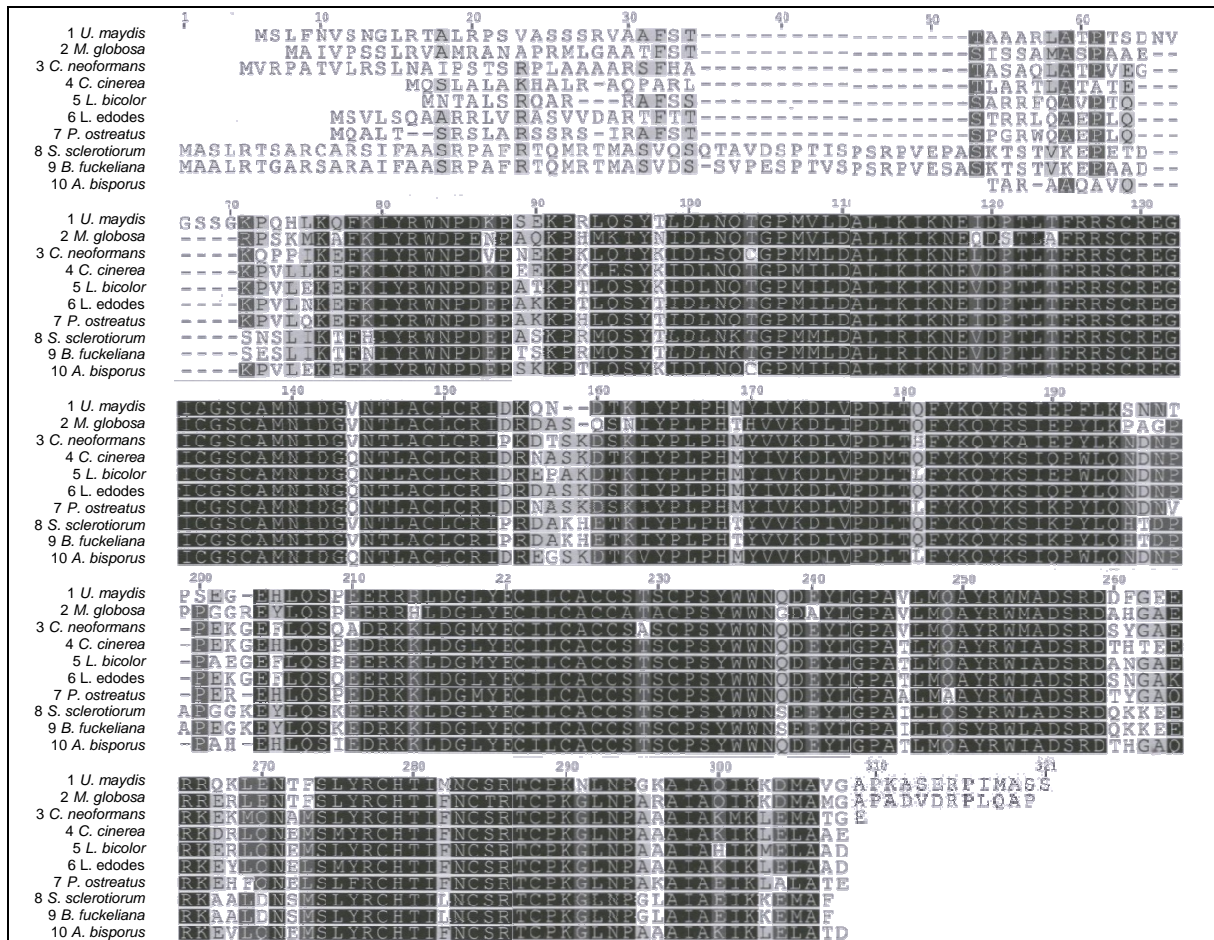


Abbildung 21: Abgleich der Proteinsequenz von Sdh2 aus *U. maydis* mit seinen 9 besten NCBI BLAST-Treffern.

1: XP_756991, 2: XP_001729560, 3: XP_572035, 4: XP_001838873, 5: XP_001876249, 6: BAD06473, 7: BAA22507, 8: XP_001594577, 9: XP_001548350, 10: CAA75895.

Identische oder äquivalente Aminosäuren (konservierte Regionen) sind dunkel hinterlegt: sechs und sieben Sequenzen – hellgrau, acht und neun Sequenzen dunkelgrau, alle Sequenzen schwarz.

Tabelle 18: Degenerate Primer für mf_sdh2. X=Inosin

Primer Name	Annealing Temperatur	Sequenz	Bemerkung
Cbx degen 1 for	Tm 46,5°C	5'-TYA ARR THT AYM GXT GGA-3'	Tm berechnet, kein PCR-Produkt
Cbx degen 1 rev	Tm 46,9°C	5'-TRT ARA AYT GXG TXA RRT C-3'	
Cbx deg 2 f	Tm 57,8°C	5'-TGY GGN WSN TGY GCN ATG A-3'	Tm berechnet, kein PCR-Produkt
Cbx deg 2 r	Tm 54,2°C	5'-TAY TBN TCN HNR TTC CAC CA-3'	
Cbx deg 3 f	60°C	5'-TTY AAR ATH TAY CGN TGG AAY CC-3'	Annealing Temperatur ermittelt
Cbx deg 3 r		5'-GGR TTN AGN CCY TTR GGR CAN GT-3'	

Mit den degenerate Primern Cbx deg 3 f und r konnten mit gDNA multiple Banden amplifiziert werden (Abbildung 22). Die prominenteste Bande mit einer Fragmentlänge von ungefähr 550 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und erneut in die PCR eingesetzt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt (Abbildung 23) und das entsprechende PCR-Produkt sequenziert. Die Qualität des Sequenzierergebnisses reichte jedoch nicht zur Sequenzanalyse aus. Die PCR mit den degenerate Primern Cbx deg 3 f und r wurde mit

cDNA aus mA3 (mRNA aus einer 3 Stunden alten Argininkultur) wiederholt. Da die ursprüngliche Bande in der Gelelektrophorese zu schwach war (Abbildung 24), wurden 10 μ l des PCR-Produktes in eine identische 100 μ l RePCR eingesetzt. Die Gelelektrophorese zeigte eine Einzelbande bei etwa 650bp (Abbildung 25), welche nach Aufreinigung sequenziert werden konnte. Anhand der ermittelten Teilsequenz wurden Primer für die semiquantitative PCR designt.

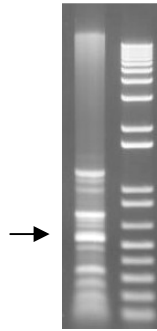


Abbildung 22: PCR mit den degenerate Primern Cbx deg 3 und gDNA.

Es stellen sich multiple Einzelbanden dar. Die prominenteste Bande findet sich bei etwa 600bp.

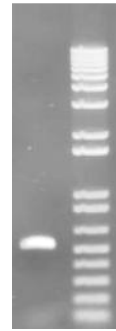


Abbildung 23: RePCR mit ausgeschnittener Bande aus Abbildung 22.

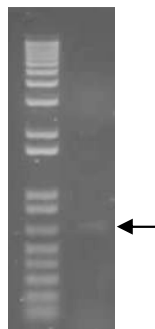


Abbildung 24: PCR mit den degenerate Primern Cbx deg 3 f und r mit cDNA aus mA3.

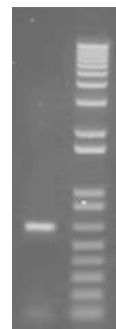


Abbildung 25: RePCR mit dem PCR-Produkt aus Abbildung 24.

4.2.1.2. Primer für die semiquantitative PCR

Die anhand der Teilsequenzen der differentiell exprimierten Gene und des mf_sdh2-Gens designten Primer sind in Tabelle 19 mit Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen aufgelistet. Als Zielsequenzen für die semiquantitative PCR waren die Sequenzen 302, 315, 358/540 und 366 ausgewählt worden. Wegen der Ähnlichkeiten der in die Aminosäuresequenzen übersetzten Sequenzen zu entsprechenden Proteinen (Tabelle 7 und Tabelle 8) wurden die Sequenzen in der vorliegenden Arbeit als mf_tam1 (Seq. 302), mf_erg5 (315), mf_hesb (358/540) und mf_unknown1 (366) bezeichnet.

Tabelle 19: Primer für die semiquantitative PCR mit Annealing Temperatur und Zyklenzahl

Die Namen der Primer gehen auf die initiale Nummerierung der Klone zurück, die die entsprechenden Inserts enthielten.

Primer Name	Annealing Temperatur	Zyklenzahl	Sequenz
ITS1 f	60°C	33	5'-AGG TTT CCG TAG GTG AAC CT-3'
ITS1 r			5'-TTC GCT GCG TTC TTC ATC GA-3'
Mala Cbx 1f (mf_sdh2 f)	60°C	34	5'-ACA AGC AAT ACC GCA GCA TCA AGC-3'
Mala Cbx 1r (mf_sdh2 r)			5'-TAA GCC TGC ATG AGC AAC AGC C-3'
146 f (mf_tam1 f)	61°C	31 (für 5h 35)	5'-ACT GCT TCC ACC GAG CGC AA-3'
146 b r (mf_tam1 r)			5'-AGG ACC CAC CAT GAA CCC AAC-3'
Erg5 f (mf_erg5 f)	57°C	29	5'-GCT GCC AAA CAC GAG GTA GT-3'
Erg5 r (mf_erg5 r)			5'-GAC CAA GGC ATT CCC TAT CA-3'
61 B f (mf_hesb f)	61°C	27	5'-ACC AAC AAA TAC GAT GAC GAT GAC-3'
61 B r (mf_hesb r)			5'-ATT AGA TGA TCG GCT CCC AGC TCA-3'
726 f (mf_unknown f)	57°C	29	5'-ATG GAC AAG TTC AAG GCG TGG G-3'
726 r (mf_unknown r)			5'-TTC GAG AAC AGG GCA TTG AGG-3'

4.2.2. Semiquantitative PCR

Die Darstellung der Expression der ausgewählten Sequenzen erfolgte durch den paarweisen Vergleich der Genexpression in pigmentbildenden (Trp-)Kulturen zu derjenigen in nicht-pigmentbildenden (Arg-)Kulturen in einem Zeitverlauf von 2 Wochen. Dazu waren cDNA-Proben jeweils aus der Trp- und der Arg-Kultur zu den Zeitpunkten 3h, 5h, 48h und 14d hergestellt und in die semiquantitative PCR eingesetzt worden. Die Proben wurden anhand der Intensität der Banden der Housekeeping-Genen mf_its1 und mf_sdh2 paarweise (Trp vs. Arg) normalisiert.

Name	Länge	3h		5h		48h		14d	
		Arg	Trp	Arg	Trp	Arg	Trp	Arg	Trp
mf_its1	270bp								
mf_sdh2	208bp								
mf_tam1	257bp								
mf_hesb	205bp								
mf_erg5	190bp								
mf_unknown	245bp								

Abbildung 26: Expression der Gene in *M. furfur* zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Lediglich mf_tam1 und mf_unknown werden auch nach 14d noch verstärkt durch die Tryptophan-Kultur exprimiert.

In Abbildung 26 ist die unterschiedliche Expression der Gene zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die Zyklenzahl der einzelnen Primer wurde so gewählt, dass in der Gelelektrophorese gerade Banden sichtbar wurden. Es zeigt sich, dass lediglich *mf_tam1* auch nach 48h und nach 14d deutlich stärker in der Tryptophan-Kultur exprimiert wird. Um auch für den Zeitpunkt 5h Banden zu erhalten, musste die Zyklenzahl allerdings auf 35 erhöht werden. Auch für *mf_unknown* zeigt sich eine vermehrte Expression in der Tryptophan-Kultur nach 3h, 5h und 14d. Banden für *mf_hesb* konnten unter den gewählten Bedingungen nur in der 3 Stunden und der 5 Stunden alten Tryptophan-Kultur dargestellt werden. Wurde die Zyklenzahl erhöht, zeigten sich früh bei allen PCRs Banden. Die Expression von *mf_erg5* ließ sich auch durch Reduktion der Zyklenzahl nicht weiter differenzieren, da dann überhaupt keine Banden mehr sichtbar waren. Hier zeigte sich eine stärkere Expression in der Tryptophan-Kultur nach 3h und schwächer 5h. Bei 48h und 14d war das Verhältnis umgekehrt, das Gen wurde vermehrt durch die Arginin-Kultur exprimiert.

4.3. Aufklärung und Untersuchung der Gesamtsequenzen und der Open Reading Frames von *mf_tam1* und *mf_sdh2*

Als besonders interessante Sequenz erwies sich *mf_tam1* (Seq. 302). Die in die Aminosäuresequenz übersetzte Sequenz von *mf_tam1* zeigte eine deutliche Ähnlichkeit zu aromatischen Aminotransferasen (Kynurenin/alpha-aminoadipate aminotransferase), insbesondere auch zu Tam1 aus *U. maydis*, einer Tryptophanaminotransferase, und Aro8 aus *S. cerevisiae*, welche ebenfalls Tryptophan desaminiert. Tam1 spielt anscheinend eine Schlüsselrolle in der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese in *U. maydis* (Zuther et al. 2008). Darüberhinaus ließ sich die vermehrte Expression von *mf_tam1* in Tryptophan-Kulturen über einen Zeitraum von 14d demonstrieren. Um weitere Einblicke in die Eigenschaften dieser Sequenz zu erhalten, wie das Vorliegen von Introns und Exons und die Ähnlichkeit der zugehörigen Proteinsequenz zu Sequenzen aus *U. maydis* und *M. globosa*, wurde mittels inverser PCR die genomische Sequenz aufgeklärt und davon die mRNA-Sequenz abgeleitet und überprüft.

Auch die genomische Sequenz für das in der vorliegenden Arbeit als Housekeeping-Gen verwendete *mf_sdh2* wurde mittels inverser PCR aufgeklärt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass es sich bei der verwendeten Sequenz um das gesuchte Gen handelte, und die Sequenz für nachfolgende Projekte verwenden zu können.

4.3.1. Genomische Sequenz

Die genomischen Sequenzen von mf_tam1 und mf_sdh2 wurden mittels inverser PCR aufgeklärt. Die Primer für die inversen PCRs wurden für mf_tam1 ausgehend von der in der Subtraktion ermittelten Teilsequenz (336 bp, Abbildung 33) und für mf_sdh2 ausgehend von der mittels degenerate PCR ermittelten Teilsequenz und später basierend auf den jeweils zusammengeführten Gesamtsequenzen designt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Primer für die Inverse PCRs für mf_tam1 (146/302) und mf_sdh2 (cbx) mit Annealing Temperaturen.

Die Annealingtemperaturen wurden für die Touchdown-PCR etwa 3-5°C niedriger angenommen als der Mittelwert der errechneten Annealingtemperaturen eines Primerpaares lag.

Primer Name	Annealing Temperatur	Sequenz	Bemerkung
146 inverse f	65°C	5'-GCT TCG AGA GTT TCT CCA AGA TTC TCT C-3'	Inverse PCR 1
146 inverse r		5'-GAA GTA GTA TGG ATC ATC CTC GAG CAC C-3'	
Nested 146 inv f	58°C	5'-ATG CGC GTT GGG TTC ATG G-3'	Touchdown PCR
Nested 146 inv r		5'-AAT TTC ACG CTT GCG CTC GG-3'	
146 inv 2 f	60°C	5'-TCG TCC AAC CTG CAC ACA AGT-3'	Unspezifisches PCR-Produkt in der Sequenzierung Touchdown PCR
146 inv 2 r		5'-TGT CGG AAG TGT GCC AGT TCT TGA-3'	
146 inv 3 f	67°C	5'-GTA CAA GGA GCG TCG CGA TAT GTT TGG-3'	Touchdown PCR
146 inv 3 r		5'-AGC TCT TTG GTA GTG TCG GAA GTG TGC-3'	
146 inv 4 f	68°C	5'-TGC CTT CTT TGC CGA CAA GCG CAA GAC-3'	Touchdown PCR
146 inv 4r		5'-CTG GAA GGA AAC CGC TGG CGT CAG TTG-3'	
Cbx inverse f	63°C	5'-GAC GGT CTG TAC GAG TGC ATT CTG-3'	Touchdown PCR
Cbx inverse r		5'-GGG GTA AAT GTT CGA GTT CGA CTT G-3'	
Nested Cbx inv f	55°C	5'-AGT GCA TTC TGT GCG CCT-3'	Inverse PCR 1
Nested Cbx inv r		5'-GCG TGT TGA CAC CGT CAA TG-3'	
Cbx inv 2 f	65°C	5'-ATC AAG AAG GAT ATG GCC ATG GGC-3'	Touchdown PCR
Cbx inv 2 r		5'-ATC AAC GCA TCG AGC ACC ATG G	

Genomische DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Tabelle 2), ligiert und in zwei aufeinander folgende PCRs eingesetzt. Dabei wurde die inverse PCR1 für mf_tam1 immer mit dem Primerpaar „146 inverse f und r“ durchgeführt. Die erste inverse PCR1 für mf_sdh2 wurde mit dem Primerpaar „Cbx inverse f und r“ durchgeführt, die späteren inverse PCR1-Reaktionen mit dem Primerpaar „nested Cbx inverse f und r“. Die Primer für die inverse PCR 2 wurden anhand der wachsenden Gesamtsequenzen designt. Abbildung 27 - Abbildung 32 zeigen die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus unterschiedlichen inverse PCRs 2. Als Templates wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittene gDNA eingesetzt, und die PCR mit unterschiedlichen inverse PCR 2-Primerpaaren durchgeführt.

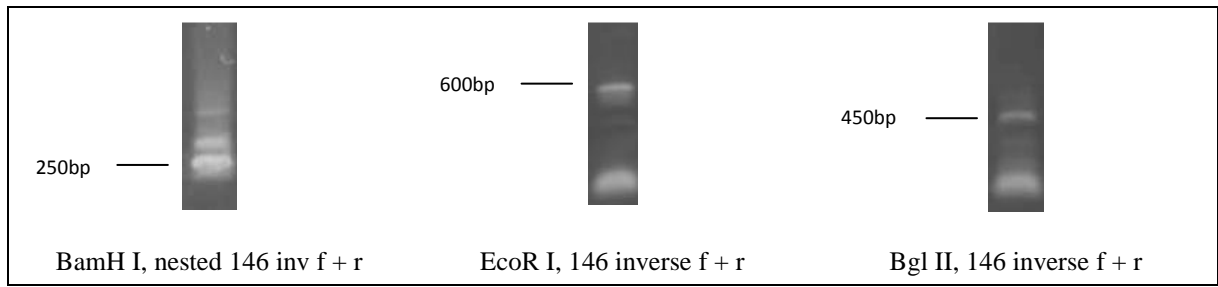


Abbildung 27: Inverse PCR 2 mit verschiedenen Primern.

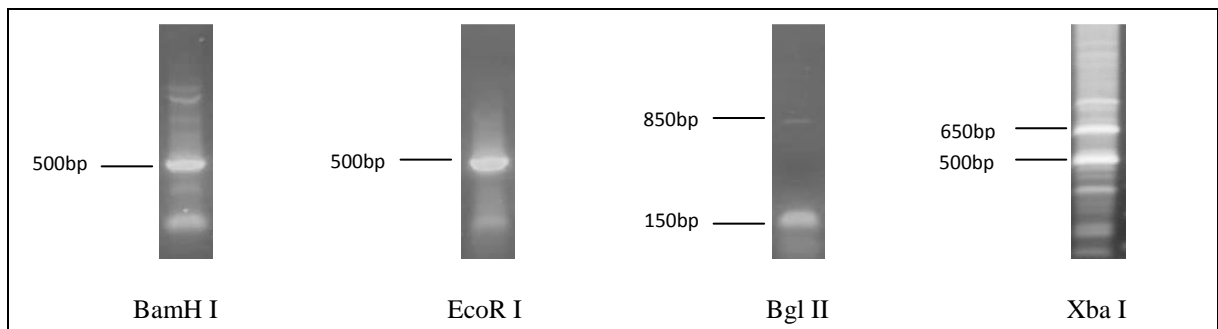


Abbildung 28: Inverse PCR 2 mit den Primern „146 inv 3 f und r“.

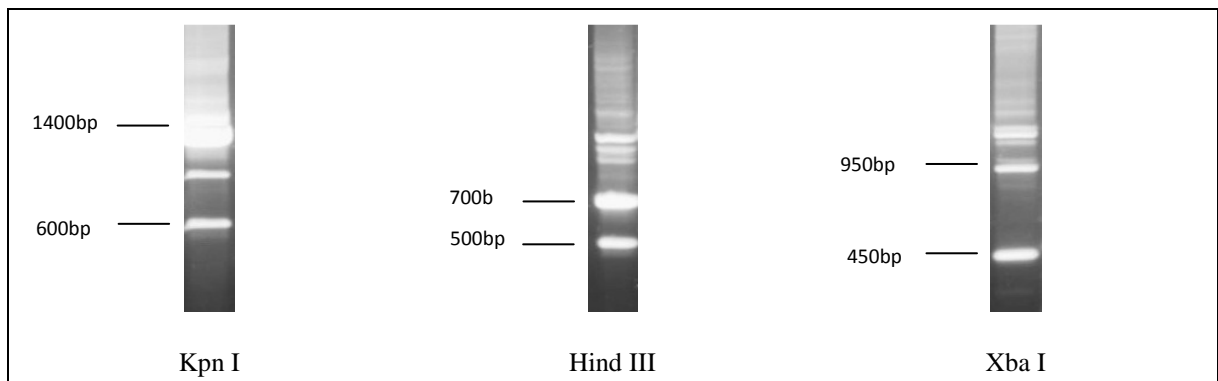


Abbildung 29: Inverse PCR 2 mit den Primern „146 inv 4 f und r“.

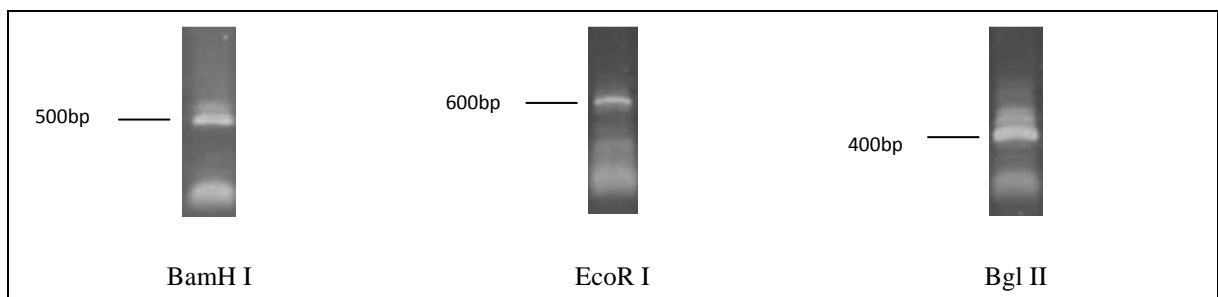


Abbildung 30: Inverse PCR 2 mit den Primern „nested Cbx inv f und r“.

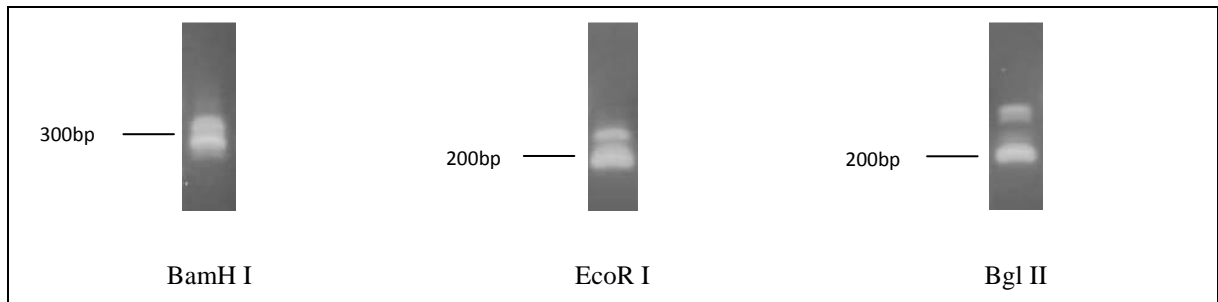


Abbildung 31: Inverse PCR 2 mit den Primern „Cb_x inv 2 f und r“.

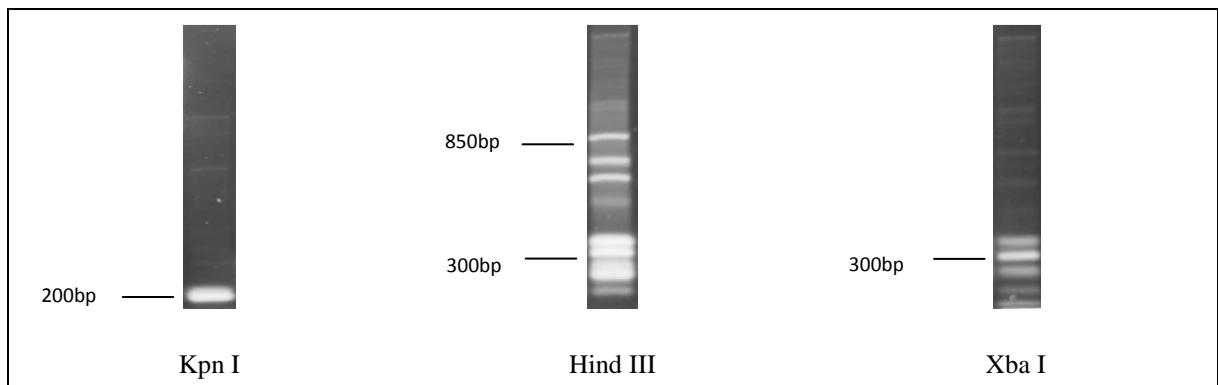


Abbildung 32: Inverse PCR 2 mit den Primern „Cb_x inv 2 f und r“.

Oftmals ließen sich mehrere intensive Banden zeigen. Diese wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und zum Sequenzieren gegeben. Die erhaltenen Sequenzen wurden manuell an die bereits bekannten Fragmente angeknüpft. Die inversen PCR-Schritte wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Primern für die inverse PCR2 so oft durchgeführt, bis Anteile benachbarter Gene identifiziert werden konnten. Das für *mf_tam1* und Umgebung ermittelte gDNA-Fragment ist in Abbildung 33 und das für *mf_sdh2* ermittelte Fragment in Abbildung 34 dargestellt.

```

ACCGTCATTGAGCGTCACGCGCAGACGGTAGTCAATCAGGGCCATCATAACGGCCACCCTTGGCCTTGACTGGC
GGCTGCTGGTCAGTAGGCCGCGCGACGTACCATGTTCTCTCCACCGTCGTAGGACGCGACGAGATGCAAACCG
GGCAGCGTCACGTGGAACCTCCACGTGGAGGGAAGGAGTCACGACCACCAAAAAAGTGGTCTGGGCACAGTGGA
GGGTGCATTGTGACTCTTCCTATCTGACCATGCCGCTGGACCTACCCAGTCTCCTGTGCGCAGTCCTCGTGTGA
CCGACCGCTGTCTGCGATCCGTGGACTACTTCCGCTTGAGAGTCGTCTCTGGTGTGATCTCGCTGCTCGCGGGG
AAGCCGAACCCTAGCGGATTCCCGTTTTGACTCCATCACGTTGCGGGCTCAAGCCCTCCGTGAGGGGACGAAAAG
ATGCCAGGGCAACCCCGTGAAATCACCATCGATGGCTCGGAACCTTGAGCGTATCTGCAGTACGGAAGTAC
GAACGGCGATGTGACGCTTGAGAGGGAGCTCACCAAGCTCATTAGCCGCGTCCACCACCGCACGCGCAACAAC
GGCCAGCCCGATGGCGACTTTGCGCTGGCCATTGGGTGCGGCAGCCAGGACCTTCTGTACAAGACGATCTCGA
TCCTGTTCAACCCGCAAGATACGGTGCTTGTGAGTCGCCCCTGTACCCGTACGTGTAACAACCTGACGCCAGC
GGTTTTCTTCCAGAACTCGAGACGCATCGCGTCAAGGCGGTGGGCATCTCCACCGATGAACAAGGTCCTTCGG
CGCAGGCTCTGCGCGATACGCTCAAGAAGTGGCACACTTCCGACACTACCAAGAGCTCCGGTTCCCCAAGGC
GCTGTACCCGCTGCTACGGGCGCCAACCCGGCGGGCACCCTGCTTCCACCGAGCGCAAGCGTGAAAATTCTC
GCGATCGCGCGGAGTATGGATTGCTGGTGTCTGAGGATGATCCATACTACTTCTGTGACCTTTGAGGACATGT
CTGAGGATGCTCTGCAGCAGAAGCGCGGCTTAGCTACTTTCGCGCTCGAGCGCGAGGACCGCGGATAAGTGGG
GTATGGCTACGTGCTACGCTTCGAGAGTTTCTCCAAGATTCTCTCGGCAGGCATGCGCGTTGGGTTTATGGT
GGTCTTCCGACGCTAGTCAACGCCGTCGTGGCCCTCACTGCGTCTCAACCTGCACACAAGTGGGCCGGCGC
AGGCCATGGCTGGCGAGCTGATGCAGTACTGGGGAACCGACGGTTTCTGCGACACACACAACGTCGCCG
GATGTACAAGGAGCGTCGCGATATGTTTGGCCGCATAATCGACACCATTCTTGGACGTGGCGAGGACGGAAAA
CAAACACCGATCGCGACGTACGTGACGCCGTCGCCGGCATGTTTTACTGGATCAAACCTGCACCTCCCGCCA
CGGACGGCGCCCCGAGGGCGATTTCGTACCGTGTATCTCGGAGAAGGCGCTTGAGTTTTGGTGTCTTGGCCAT
GCCAGGAGGTGCCTTCTTTGCCGACAAGCGCAAGACGCCGATGTGCGCACATCGTTTTCAGCCTGATCGAGCCG
CAAGACGCGCATGAGGCCATCCTGCGTCTCCGTGCGCGCCGTGGAGAGTGCTTGGAAAGGATGCTGGATACGATG
AGATCCCTGCAATGCAGACATAGTCTACTCTTCTTTTCTTGTGTGCTTGCCTCATTTTCCCGATCGACCTGGTTCG
AGTGCGGCCATGAACCTGCGTTAGTAGAGGGACGTACAAGGAGGCTTGGCCGATCCCTAGATCCTTCATGTAC
GCTGCCTGTTGCTTGAATGGCCATGTAGTGTGTGTATGTTCAAGCGTGTTCGACAAAGCGCGCATGCGCG
ACGCGAGGTAGGCATAGTCCGCTCCTTGGCCGACGTGAGCGCCGTCCTCCACTGCTCGACGCGTGCGCCAT
GGCCGCTGTGTCACGGCGCGCCTTGTATTCTGCTGACTCAGCGCGACGTGGGTGCCAAAAAGTACAGGGCA
CGTGNACNGCNCCCTCACTCTNTATGCT

```

Abbildung 33: Genomische Sequenz von mf_tam1 (Seq. 302) und benachbarten DNA-Abschnitten.

Die Sequenz mit Ähnlichkeit zu MGL_2601 und UM01804 (Tam1 aus *U. maydis*) ist dunkelgrün dargestellt, hellgrün ist der Abschnitt der nur Ähnlichkeit zu UM01804 aufweist. Ein wahrscheinliches Intron ist pink markiert. Das ursprüngliche, mittels cDNA-Subtraktion ermittelte Sequenzfragment ist grau unterlegt. Der wahrscheinliche ORF ist fett und unterstrichen. Das ermittelte Startkodon ist rot, das wahrscheinliche Stoppkodon blau markiert. Die Genabschnitte mit Ähnlichkeit zu MGL_2602 sind orange und MGL_2600 violett markiert. Sequenzabschnitte, die keine Ähnlichkeit im tblastx ergaben, sind schwarz dargestellt.

Die Gene mf_tam1 und seine benachbarten Gene erscheinen analog zu ihren homologen Sequenzen in *M. globosa* angeordnet (in Abbildung 33 entsprechend der 5'-3'-Leserichtung von mf_tam1 (Plusstrang): MGL_2602, MGL_2601 und MGL_2600). Das gesamte, mittels inverse PCR ermittelte gDNA-Fragment ist 2072 bp lang. Ein Sequenzfragment mit 75 bp Länge zeigt im NCBI tblastx eine deutliche Ähnlichkeit zu MGL_2602 (e-value = 5e-09, Identität = 100%, Ähnlichkeit = 100%). Die genomische Sequenz von Mf_tam1 mit Ähnlichkeit zu MGL_2601 (e-value = 6e-126, Identität = 55%, Ähnlichkeit = 77%) und UM01804 (e-value = 8e-121, Identität = 52%, Ähnlichkeit = 68%) im NCBI tblastx umfasst eine 1419bp lange Sequenz und ist dunkelgrün markiert. Der hellgrün markierte Abschnitt weist keine Ähnlichkeit mehr zu MGL_2601 auf, sondern nur noch zu UM01804, da sie

bereits außerhalb von MGL_2601 liegt. MGL_2601 ist lediglich 963bp lang, während UM01804 1512 bp umfasst. Am 3'-Ende von mf_tam1 liegt eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu MGL_2600 (e-value 2e-19, Identität = 70%, Ähnlichkeit = 90%). Dieses Gen in umfasst in *M. globosa* 258 bp, die in *M. furfur* identifizierte Sequenz 218 bp.

```

CAATGAGTGCAAGTGTGTTTGCAATGCCCCCGTGTTCGCTTTAACCCGAGGCGCCGGCCAGTACATCTTCTG
GCCGAGGCCAACTCTTTCGTCCTAACCTTATCCCTATAACCATGATTGTTCCCAGCACGTTCCGCCTTGCTGC
GCGGGTGGGTGCGCCGAGCGTCGCTTCCGCCTCGCGGCGCCGTTCTCGACCTCGGCCGTTGCCTCGCTGAG
ACGCCCGCCACGGAGCGCCCTGCCAAGATGAAGAAGTTCAAGATCTACCGCTGGGTATGTTTGACGCCACGAG
TGCGATGCTAACGCTGCAGAACCCCTGACCACCCACGGAGAAGCCCAAGATGCAGACATACGAGATTGATCTG
AACAAGACGGGCCCATGGTGCTCGATGCGTTGATCAAGATCAAGAACGAGGTCGACCCGACGCTATCGTTCC
GCCGCTCGTGCCGTGAGGGTATCTGCGGCAGCTGCGCGATGAACATTGACGGTGTCAACACGCTTGCGTGCTT
GTGCCGCATTGACCGCGACAAGTCAACTCGAATTTACCCCTGCGGCACATGCACGTCGTCAAGGACCTT
GTGCCGACCTGACGCAATTCTACAAGCAATACCGCAGCATCAAGCCATACCTGCAGCCCTCTGGCCCCCGT
CTGAGGGCCGCGAGTACCGCCAGAGCCCCGAGGAGCGTCGCCGCTCGACGGTCTGTACGAGTGCATTCTGTG
CGCCTGTCTCGACTTCGTGCCCGTCTGACTGGTGAACACGAGTACCTCGGCCCGGCTGTGCTCATG
CAGGCTTACCGCTGGATGGCCGACTCGCGTGATGCTGCGGGTGAGGAGCGCCCGCRGAAGCTGGAAAACCT
TCTCGCTGTACCGCTGCCACACCATCTTCAACTGCACGCGGACATGCCCCAAGGGTCTGAACCCCGCAAGGC
GATTGCGCAGATCAAGAAGGATATGGCCATGGGCGCGCCGCCACGGCCGCTCAGCGCCCTCTGCAGGCGCGG
TAGACAGCGAACGTATAGGGTACAAGCTTATGTGCTAGGAACGATCGGCCGCCACCCCGCGGTAGCGTGGGAA
GCGTGGCACGCCCTGCGTGCCAGGCTGCCATACTGGAAGCTAATCAATGTGCCGATCGCCGGCGGGTTCGCGG
CGCAGCGCGTTCGGTGAGGCCGCTGCCACCTTGAAGCGG

```

Abbildung 34: Genomische Sequenz von mf_sdh2 und benachbarten DNA-Abschnitten.

Die Sequenz, die Ähnlichkeit zu MGL_3104, bzw. UM00844 (*U. maydis* Succinatdehydrogenase), aufweist, ist grün dargestellt. Ein wahrscheinliches Intron ist pink markiert. Der wahrscheinliche ORF ist fett und unterstrichen. Die Sequenz mit Ähnlichkeit zu MGL_3103 ist orange. Sequenzabschnitte, die keine tblastx-Treffer ergaben sind schwarz dargestellt. Das ermittelte Startkodon ist rot, das wahrscheinliche Stoppkodon blau markiert.

Die 5'-3'-Leserichtung ist in Abbildung 34 entsprechend der 5'-3'-Ausrichtung von mf_sdh2 (grün) (Plusstrang) gewählt. Das gesamte mittels inverse PCR ermittelte gDNA-Fragment ist 1212 bp lang. Die Anordnung von mf_sdh2 und einem Nachbarn (orange) ist anscheinend analog zur Anordnung von MGL_3104 (tblastx: e-value = 6e-150, Identität = 85%, Ähnlichkeit = 92%) und MGL_3103 (tblastx: e-value = 7e-18, Identität = 70%, Ähnlichkeit = 87%) in *M. globosa*. Mf_sdh2 zeigt außerdem im tblastx eine starke Ähnlichkeit zu um00844, der Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase aus *U. maydis* (e-value = 4e-111, Identität= 90%, Ähnlichkeit = 93%). Am 5'-Ende von mf_sdh2 befindet sich ein Abschnitt ohne Ähnlichkeit zu einer bekannten Sequenz.

4.3.2. Open Reading Frames von mf_tam1 und mf_sdh2

Ausgehend von der genomischen Sequenz wurden die Sequenzen der Open Reading Frames von mf_tam1 und mf_sdh2 ermittelt. Zur Bestimmung von Anfangs- und Endbereichen wurden für beide Gene verschiedene forward-Primer und reverse-Primer designt (Tabelle 21). Als reverse Primer wurde für den Anfangsbereich von mf_tam1 der Primer „146 inverse r“ und als forward Primer für den Endbereich „146 inv 3 f“ (beide Tabelle 20) verwendet. Für den Anfangsbereich von mf_sdh2 wurde als reverse Primer „nested cbx inverse r“ und für den Endbereich als forward Primer „nested cbx inverse f“ (beide Tabelle 20) verwendet. Die PCRs wurden sowohl mit gDNA als auch mit cDNA durchgeführt und sequenziert. In Abbildung 35 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den „146 Start“ Primern und den „146 End“ Primern aus gDNA und cDNA für mf_tam1 gegenübergestellt, in Abbildung 36 diejenige für mf_sdh2 mit den „cbx Start“ und „cbx End“ Primern.

Tabelle 21: Primer für die Analyse von Anfangs- und Endbereiche der Open Reading Frames von mf_tam1 und mf_sdh2.

Primer Name	Annealing Temperatur (errechnet)	Sequenz
Mf_tam1_Start1 f	70°C	5'-AGT GGA GGG TGC ATT GTG ACT CTT CCT-3'
Mf_tam1_Start2 f	70°C	5'-ATT CCC GTT TGA CTC CAT CAC GTT GCG-3'
Mf_tam1_Start2a f	67°C	5'-GAT CCG TGG ACT ACT TCC GCT TGA-3'
Mf_tam1_Start3 f	65°C	5'-GTA TCC TGC AGT ACG GAA GTA CGA-3'
Mf_tam1_Start3a f	69°C	5'-AGG GCA ACC CCG TGG AAA TCA CCA T-3'
Mf_tam1_Start4 f	65°C	5'-AGA GGG AGC TCA CCA AGC TCA TTA-3'
Mf_tam1_Start5 f	65°C	5'-ATC TCG ATC CTG TTC AAC CCG CAA-3'
Mf_tam1_End1 r	70°C	5'-ATC CAG CAT CCT TCC AAG GAC TCT CCA-3'
Mf_tam1_End2 r	71°C	5'-GCA CTC GAC CAG GTC GAT GGG GAA AAT-3'
Mf_tam1_End3 r	70°C	5'-AAG CGA ACA GGC AGC GTA CAT GAA GGA-3'
Mf_tam1_End4 r	70°C	5'-GCC GCT TTG TCG AAC ACG CTT GAA CAT-3'
Mf_tam1_End5 r	68°C	5'-TGA CAA CAG ACG GCC ATG GCG CA-3'
Mf_sdh2_Start1 f	67°C	5'-AACTCTTTCGTCCCTAACCTTATCCCT-3'
Mf_sdh2_Start2 f	67°C	5'-ATTGTTCCAGCACGTTCCGCCTT-3'
Mf_sdh2_End1 r	68°C	5'-ATA TCC TTC TTG ATC TGC GCA ATC GCC-3'
Mf_sdh2_End2 r	67°C	5'-ACA TAA GCT TGT ACC CTA TAC GTT CGC-3'

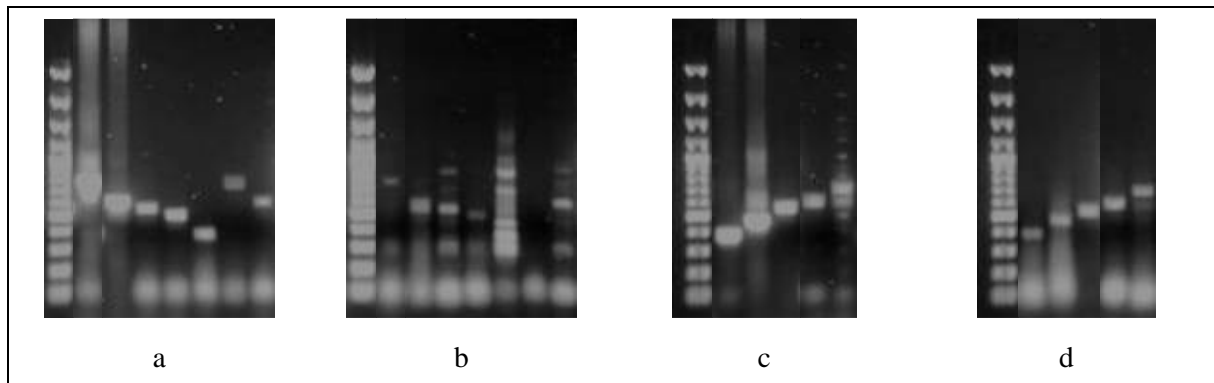


Abbildung 35: Gegenüberstellung der PCR-Produkte mit gDNA und cDNA mit den Primern für die Start- und Endregion von mf_tam1.

a und b: PCRs mit den Primern „Mf_tam1_Start 1f-5f und 2af und 3af“ mit gDNA (a) und cDNA (b). Der reverse Primer ist „146 inverse r“ (Tabelle 20).

c und d: PCRs mit den Primern „Mf_tam1_End 1r-5r“ mit gDNA (c) und cDNA (d). Der forward Primer ist „146 inv 3 f“ (Tabelle 20).

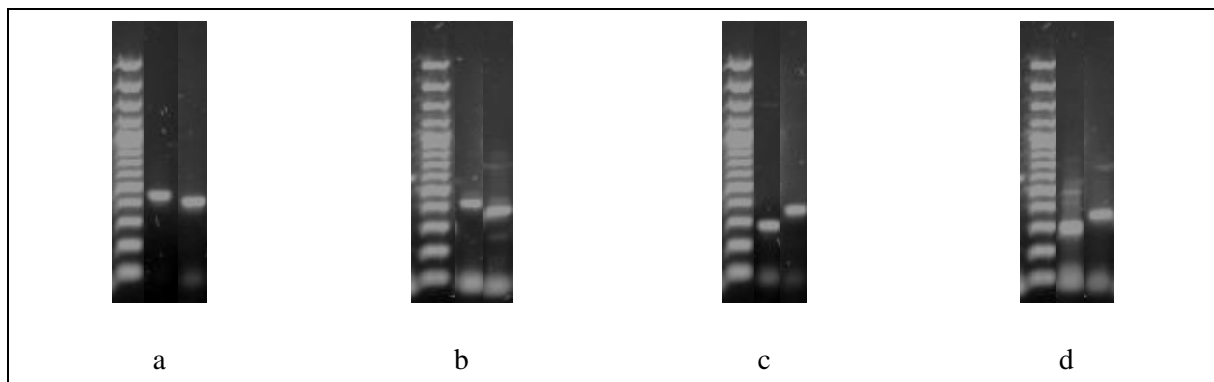


Abbildung 36: Gegenüberstellung der PCR-Produkte mit gDNA und cDNA mit den Primern für die Start- und Endregion von mf_sdh2.

a und b: PCRs mit den Primern „Mf_sdh2_Start1 f und 2 f“ mit gDNA (a) und cDNA (b). Der reverse Primer ist „nested cbx inverse r“ (Tabelle 20)

c und d: PCRs mit den Primern „Mf_sdh2_End1 r und 2 r“ mit gDNA (c) und cDNA (d). Der forward Primer ist „nested cbx inverse f“ (Tabelle 20)

Zur Kontrolle des Mittelteils von mf_tam1 wurde cDNA aus einer 3h-Tryptophan-Kultur mit den Primerpaaren „146 f“ und „146 b r“ (beide Tabelle 19) und „146 inverse f“ (Tabelle 20) und „Mf_tam1_End1 r“ (Tabelle 21) sequenziert und zur Kontrolle des Mittelteils von mf_sdh2 mit den Primerpaaren „Mf_sdh2_Start2 f“ (Tabelle 21) und „CbX inverse r“ (Tabelle 20) und „Mala Cbx 2f“ (Sequenz: ATT GAC GGT GTC AAC ACG CTT GC, Annealing Temperatur: 65°C) und „Mf_sdh2_End1 r“ (Tabelle 21) sequenziert.

Die jeweiligen Sequenzfragmente wurden manuell aneinander gefügt und mit der gDNA-Sequenz abgeglichen. Die Sequenzen wurden mittels tblastx-Suche im NCBI analysiert.

Mögliche Open Reading Frames wurden im EditSeq Programm in ihre Aminosäuresequenzen übersetzt. Für mf_tam1 und mf_sdh2 ergab jeweils ein Leserahmen ausgehend von einem ATG eine Aminosäuresequenz, die ohne Unterbrechung durch ein Stoppkodon der im NCBI BLAST identifizierten Sequenz entsprach und an einem der jeweiligen Sequenz aus *M. globosa* und *U. maydis* analogen Endpunkt durch ein Stoppkodon terminiert wurde. Der Open Reading Frame von mf_tam1 umfasst 1431bp und der Open Reading Frame von mf_sdh2 873bp. Die Nukleotidsequenzen dieser Open Reading Frames sind in Abbildung 33 für mf_tam1 und in Abbildung 34 für mf_sdh2 fett und unterstrichen hervorgehoben. Der Vergleich der Nukleotidsequenzen dieser Open Reading Frames mit der gDNA-Sequenz zeigte, dass die gDNA von mf_tam1 ein GT-AG-Intron von 23bp Länge enthält, welches in Abbildung 33 pink markiert ist. Die gDNA von mf_sdh2 enthält ein GT-AG-Intron von 38bp Länge, welches in Abbildung 34 ebenfalls pink dargestellt ist. Im Intron von mf_tam1 findet sich eine GTACGT-5'-Splice-Stelle und eine CAG-3'-Splice-Stelle, jedoch kein Branchingpoint. Das Intron von mf_sdh2 enthält eine GTATGT-5'-Splice-Stelle, einen TGCTAAC-Branchingpoint und eine CAG-3'-Splicing-Stelle. Diese Regionen stellen in *S. cerevisiae* und anderen Pilzen Splicingregionen dar (Ho et al. 2007; Spingola et al. 1999; Pikielny und Rosbash 1985).

4.3.3. Untersuchung der hypothetischen Proteinsequenzen von Mf_Tam1 und Mf_Sdh2

Die Nukleotidsequenz des wahrscheinlichsten Open Reading Frames wurde im EditSeq-Programm in die Aminosäuresequenz übersetzt und im NCBI tblastn-Suchmodus mit in Aminosäuresequenzen übersetzten bekannten pilzlichen Nukleotidsequenzen abgeglichen.

In Abbildung 37 ist der Abgleich der Proteinsequenz Mf_Tam1 mit 10 BLAST-Treffern graphisch durch das Geneious-Programm dargestellt. Dunkel unterlegte Bereiche zeigen eine hohe Übereinstimmung zwischen den Proteinsequenzen der einzelnen Spezies an, nicht unterlegte Abschnitte sind unterschiedlich. Abbildung 38 zeigt den Abgleich der Proteinsequenzen der pigmentbildenden Spezies unter den BLAST-Treffern. Darüberhinaus ist in Abbildung 39 der Abgleich der Sequenzen von Mf_Tam1, MGL_2601 und UM01804 dargestellt.

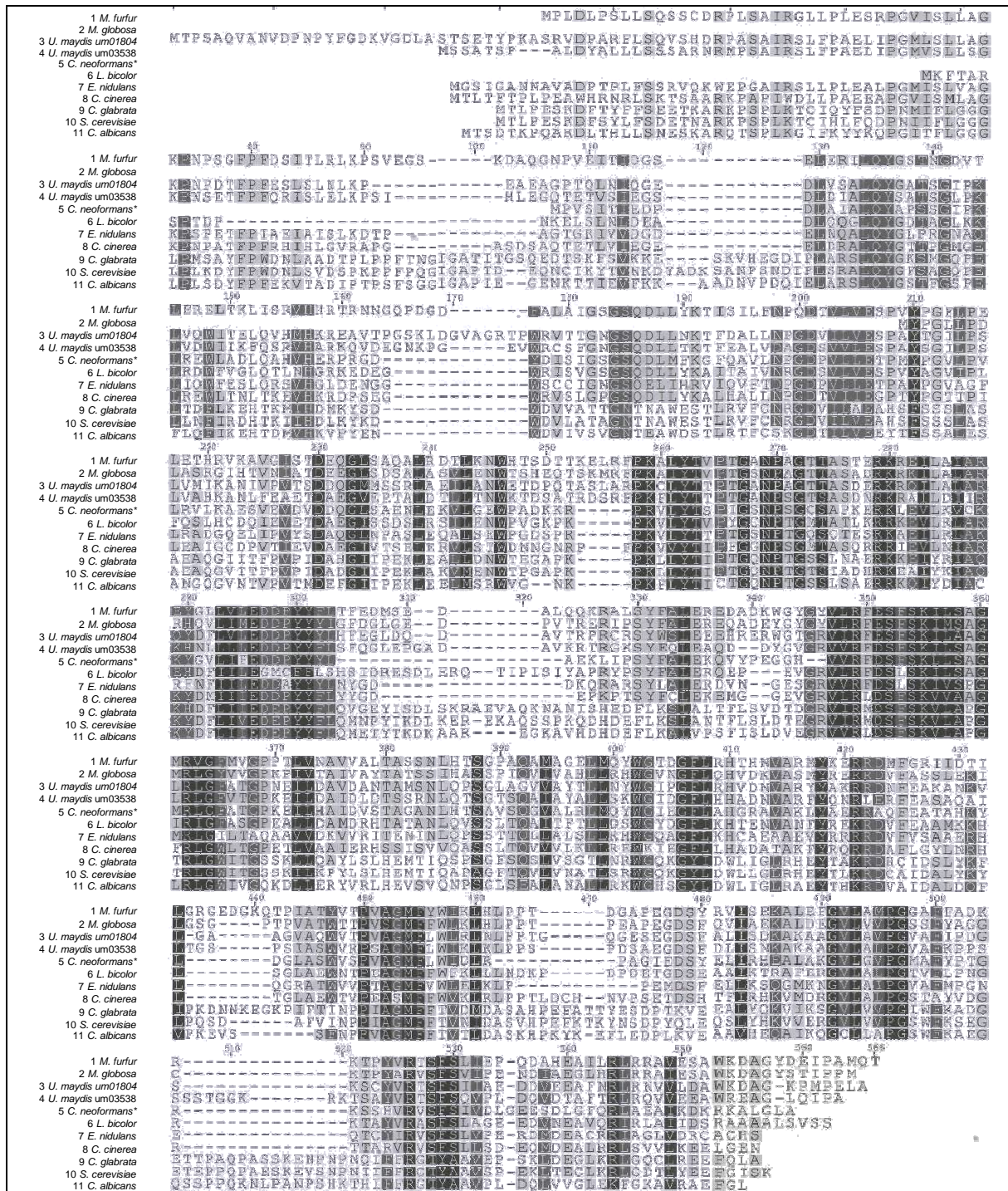


Abbildung 37: Abgleich der Proteinsequenz von Mf_Tam1 mit 10 NCBI BLAST-Treffern.

1: Mf_Tam1, 2: MGL_2601 XP_001730219, 3: UM01804 XP_757951, 4: UM03538 XP_759685, 5: XP_571491, 6: XP_001883500, 7: ABU51605, 8: XP_001835789, 9: XP_446416, 10: AAT92981, 11: XP_719544. *C. neoformans var. neoformans

Identische oder äquivalente Aminosäuren (konservierte Regionen) sind dunkel hinterlegt: sieben und acht Sequenzen – hellgrau, neun und zehn Sequenzen dunkelgrau, alle Sequenzen schwarz.

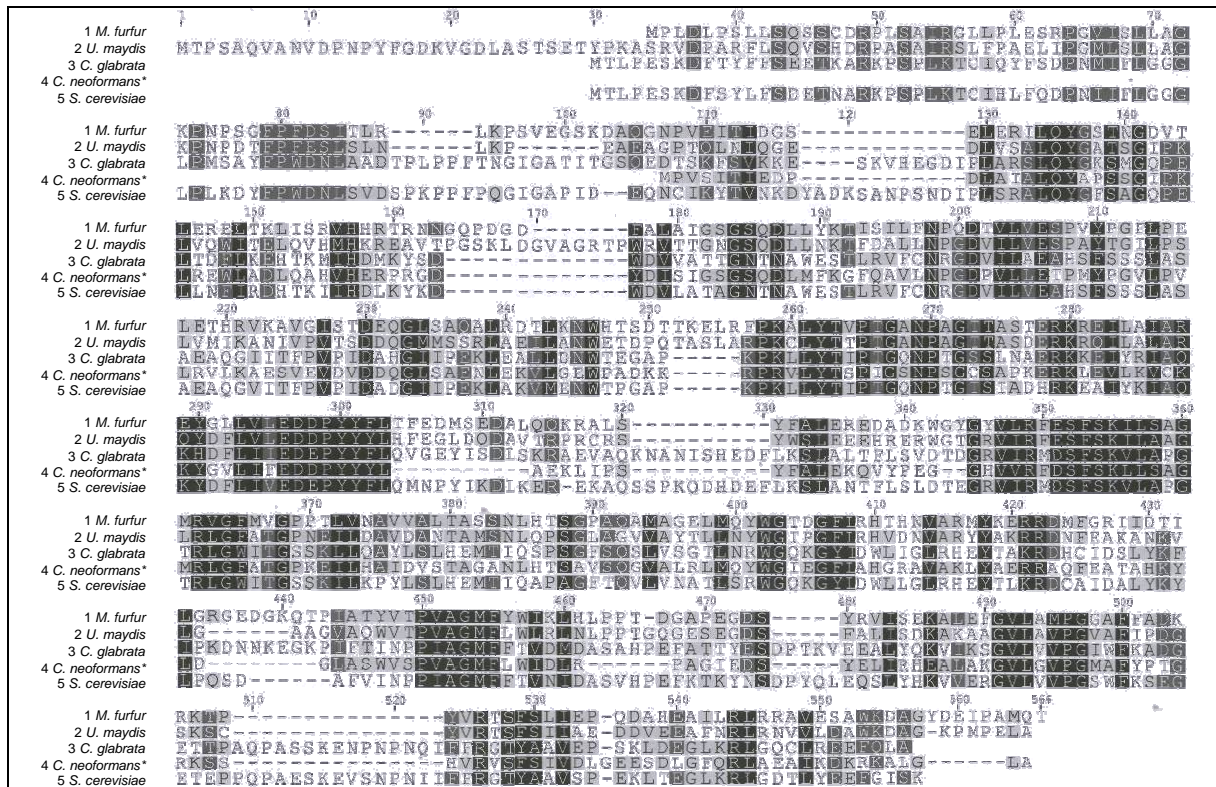


Abbildung 38: Abgleich der Proteinsequenzen der Pigmentbildner aus Abbildung 37.

1: Mf_Tam1, 2: UM 01804 XP_757951, 3: XP_446416, 4: XP_571491, 5: AAT92981. *C. neoformans var. neoformans

Identische oder äquivalente Aminosäuren (konservierte Regionen) sind dunkel hinterlegt: drei Sequenzen – hellgrau, vier Sequenzen dunkelgrau, alle Sequenzen schwarz.

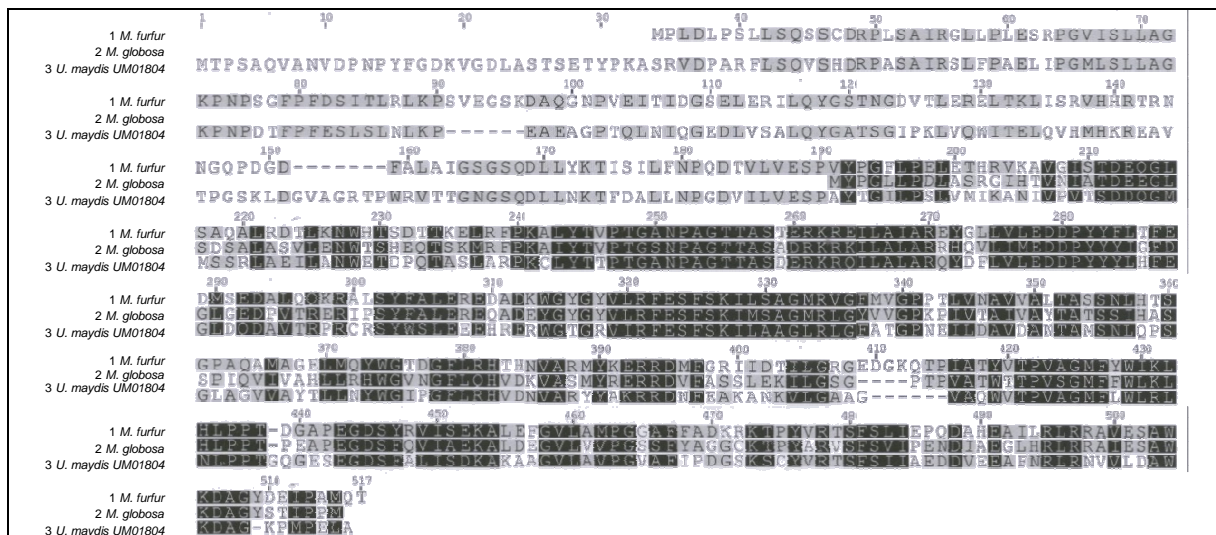


Abbildung 39: Abgleich der Proteinsequenzen von *M. furfur*, *M. globosa* und *U. maydis*.

1: Mf_Tam1, 2: XP_001730219, 3: XP_757951.

Identische oder äquivalente Aminosäuren (konservierte Regionen) sind dunkel hinterlegt: zwei Sequenzen – hellgrau, alle Sequenzen schwarz.

In Abbildung 37 sind elf Sequenzen aus zehn pilzlichen Organismen gegenüber gestellt. Bei den beiden Sequenzen aus *U. maydis* handelt es sich um die Sequenzen Tam1 (UM01804) und Tam2 (UM03538) von denen nur Tam1 eine Beteiligung an der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese zugeschrieben wird (Zuther et al. 2008). Neben *M. furfur* und *U. maydis* wurde die Tryptophan-abhängige Pigmentsynthese noch bei *C. neoformans* (Chaskes et al. 2008), *C. glabrata* (Mayser et al. 2007) und *S. cerevisiae* (unveröffentlichte Beobachtungen) beobachtet. Es zeigt sich, dass die Aminosäuresequenz von *C. neoformans* mit 367 as die kürzeste der unter den Pigmentbildnern ist, während die Aminosäuresequenz von *M. globosa* mit 321 as (*M. furfur* 477 as) insgesamt die kürzeste ist. In Abbildung 38 zeigt sich, dass der Anteil identischer oder äquivalenter Sequenzen zwischen den Pigmentbildnern etwas höher zu sein scheint, als zwischen allen elf Sequenzen. Aus Abbildung 39 kann deutlich auf die enge Verwandtschaft zwischen den pigmentassoziierten Sequenzen aus *M. furfur* und aus *U. maydis* und der nicht-pigmentassoziierten Sequenz aus *M. globosa* geschlossen werden. Die Verwandtschaften zwischen den einzelnen Sequenzen ist in dem Baumdiagramm in Abbildung 40 dargestellt. Anscheinend wiegt der familiäre Verwandtschaftsgrad zwischen den verschiedenen Spezies schwerer als die Eigenschaft Tryptophan-abhängig Pigment zu synthetisieren oder nicht. So ist die Ähnlichkeit zwischen *M. furfur* und *M. globosa*, zwischen den beiden Sequenzen Tam1 und Tam2 aus *U. maydis* und zwischen *C. glabrata*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* jeweils höher als die der Pigmentbildner untereinander.

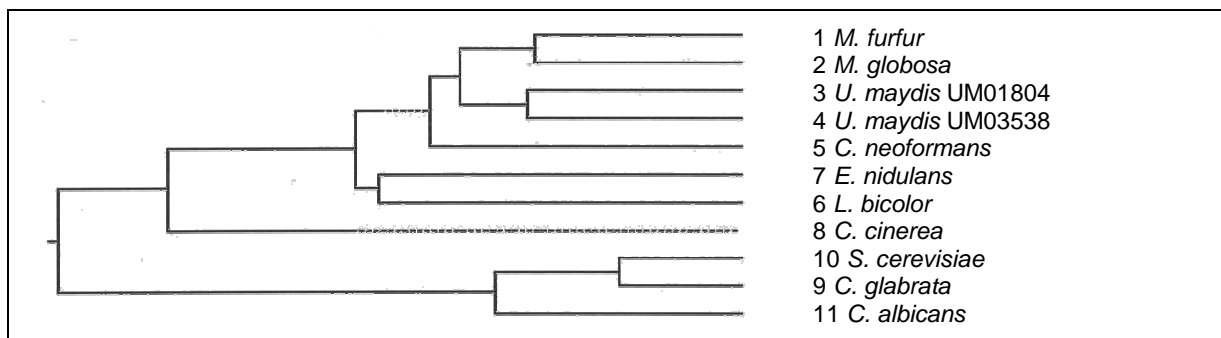


Abbildung 40: Darstellung der Ähnlichkeiten der Proteinsequenzen zu Mf_Tam1 im Baumdiagramm.
Die Nummerierung aus Abbildung 37 wurde beibehalten.

Die Untersuchung der hypothetischen Proteinsequenz von Mf_Tam1 in der NCBI Conserved Domain Database (CDD) zeigte eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz zur Aspartataminotransferase-Familie und eine Zugehörigkeit zu den Aminotransferasen Klasse I und II (Abbildung 41). Die Aspartataminotransferase-Familie gehört zur Pyridoxalphosphat-abhängigen Aspartataminotransferase-Superfamilie. Einige Enzyme, die zu diesen Familien

gehören, sind z.B. die Aspartataminotransferasen, Tyrosin-, Alanin- und aromatische Aminotransferasen (Marchler-Bauer et al. 2009; Marchler-Bauer et al. 2007; Marchler-Bauer et al. 2005).

Anhand des Abgleichs in der CDD konnten für Mf_Tam1 ein mögliches katalytisch aktives Lysin und 10 Pyridoxal-5-Phosphat-Bindungsstellen ermittelt werden. Die Positionen dieser Stellen sind in Abbildung 42 dargestellt.

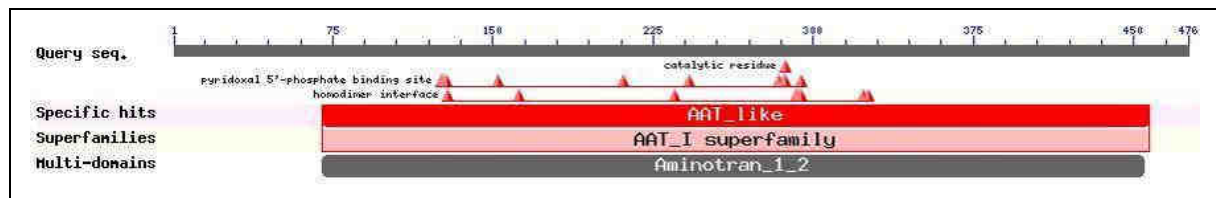


Abbildung 41: Ergebnis der Überprüfung der Proteinsequenz von Mf_Tam1 in der NCBI Conserved Domains Database.

```
MPLDLPSLLSQSSCDRPLSAIRGLLPLESRPGVISLLAGKPNPSGFPFDSITLRLKPSVEGSKDAQGNPVEITIDGSELE
                                     ###                               #
RILQYGSTNGDVTLERELTKLISRVRHRTNRNGQPDGFALAIIGSGSQDLLYKTIISILFNPQDTVLVESPVYPGFLEPEL
                                     #
THRVKAVGISTDEQGLSAQALRDTLKNWHTSDTTKELRFPKALYVPTGANPAGTTASTERKREILAIAREYGLLVLEDD
#                                     ###                               #
PYYFLTFEDMSDALQQKRALSIFALEREDADKWGYGYVLRFEFSKILSAGMRVGFMPPTLVNAVVALTASSNLHTS
GPAQAMAGELMQYWGTDGFLRHTHNVARMYKERRDMFGRIIDTILGRGEDGKQTP IATYVTPVAGMFYIKLHLPPTDGA
PEGDSYRVISEKALEFGVLAMPGGAFFADKRKTPYVRTSFLIEPQDAHEAILRLRAVESAWKDAGYDEIPAMQT.
```

Abbildung 42: Überprüfung von Mf_Tam1 auf funktionelle Bereiche.

Pyridoxal-5-Phosphat-Bindungsstellen sind mit # markiert, das katalytisch aktive Lysin ist eingerahmt.

In Abbildung 43 ist der Abgleich der Proteinsequenz Mf_Sdh2 mit 10 BLAST-Treffern graphisch durch das Geneious-Programm dargestellt. Auch hier zeigen dunkel unterlegte Bereiche eine hohe Übereinstimmung zwischen den Proteinsequenzen der einzelnen Spezies an, nicht unterlegte Abschnitte sind verschieden. Die Proteinsequenzen weisen einen hohen Anteil konservierter Regionen auf.

Der Abgleich von Mf_sdh2 im CDD ergab eine deutliche Ähnlichkeit zur PRK17525 Superfamilie, bzw. sdhB, einer Succinatdehydrogenase iron-sulfur Untereinheit wie in Abbildung 44 dargestellt. Funktionelle Einheiten konnten mittels CDD nicht identifiziert werden.

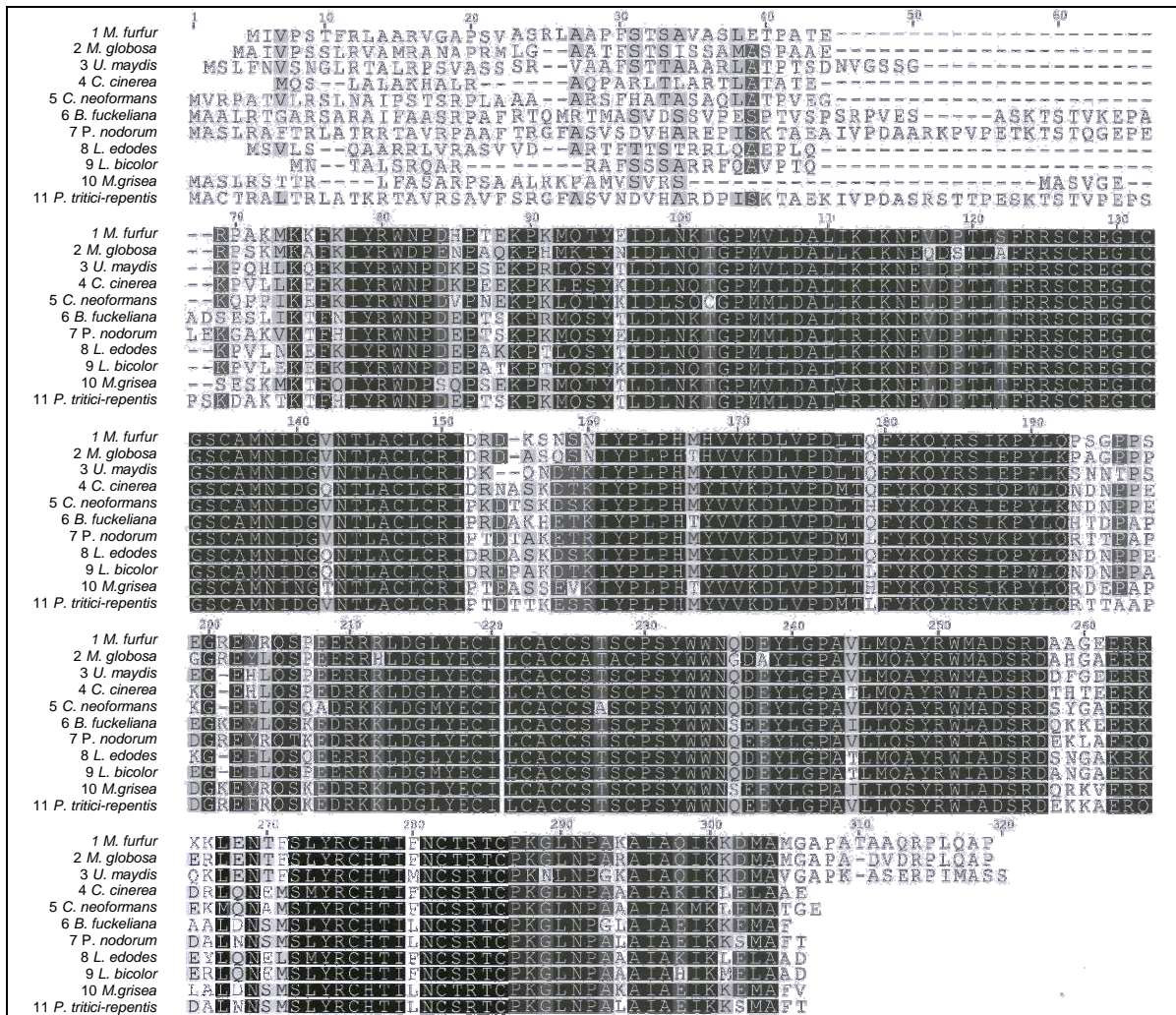


Abbildung 43: Abgleich der Proteinsequenz von Mf_Sdh2 mit 10 NCBI BLAST-Treffern.

1: Mf_Sdh2, 2: XP_001729560, 3: XP_756991, 4: XP_001838873, 5: XP_572035, 6: XP_001548350, 7: XP_001793919, 8: BAD06473, 9: XP_001876249, 10: XP_369077, 11: XP_001933259

Identische oder äquivalente Aminosäuren sind dunkel hinterlegt: sieben und acht Sequenzen – hellgrau, neun und zehn Sequenzen dunkelgrau, alle Sequenzen schwarz.

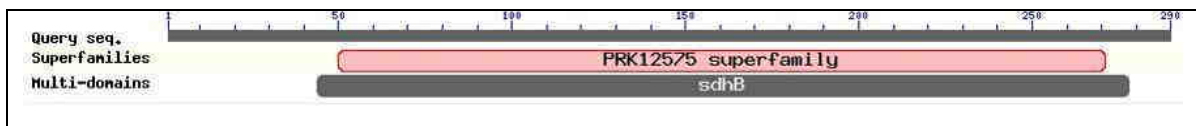


Abbildung 44: Ergebnis der Überprüfung der Proteinsequenz von Mf_Sdh2 in der NCBI Conserved Domains Database.

4.3.4. Hypothetische Überlegungen zu MGL_2601

MGL_2601 ist als 963bp lange, partielle mRNA-Sequenz im NCBI unter der Accession Nr. XM_001730167 hinterlegt. Der Abgleich mit dem Genom von *M. globosa* (Accession Nr. AAYY01000009) zeigt, dass zwischen dem wahrscheinlichen Startkodon von MGL_2601 und MGL_2602 eine bislang nicht zugeordnete Sequenz von 832bp liegt. Das Fragment des Genoms, auf dem sich MGL_2601 und Anteile der benachbarten Gene befinden, zunächst im tblastx untersucht. Dabei wurde deutlich, dass sich vor dem Sequenzanteil mit Ähnlichkeit zu MGL_2601 ein Sequenzanteil in einem anderen Leserahmen (+3) mit Ähnlichkeit zu UM01804 (e-value = 6e-105, Identität = 54%, Positives = 67%) befand. Der Sequenzanteil mit Ähnlichkeit zu UM01804 und MGL_2601 wurde auf Startkodons überprüft und ausgehend von den Startkodons in die jeweiligen Proteinsequenzen übersetzt. Nach Bereinigung der Nukleotidsequenz um ein 28bp langes Fragment, welches sich von einem GT zu einem AG erstreckt, ergab sich ausgehend von einem Startkodon eine durchgehende, 1446bp lange Sequenz, deren Proteinsequenz ohne Unterbrechung durch Stoppkodons im tblastn sowohl Ähnlichkeit zu MGL_2601 als auch zu UM01804 zeigte. Die gDNA-Sequenz von MGL_2601hyp ist in Abbildung 45 abgebildet.

```
ATGCCATTGAACTATGAACAACCTGCTATCACGGGAATACACCCGTCGTCCTACGCCTGCGATTTCGCGGATTG
CTCGCACACGAGTCTAGACCGGGAATGATCTCGTTTTCTCGCTGGCAAGCCAAATCCCAGTGGGTTTTCTTTTT
CAGTCGATCTCTGTGACATTGAAGCCAGATGCCATCATGTTCGAAAACTCGGACACGGATGATGCGACAGAA
CTCGTCAATTGAAGGAGAGGATCTCGAGCGTGCATTGCAATACGGGTCGTCAAGCAGTGATAAGATGTTTTCA
GACTGCATGGATAACCATTTGTCTACAGTGCACGGTCGCAAGCGTGGTGATGGATCGCCTGCAGGTGACTAT
GAGCTAGCTGTTGGGACAGGATCGCAAGATCTGCTTGCCAAGGTACGTTTTGTTTGTGTGCTATGTGCTTTTT
GTCTCTCCCGCTGACACAGTGCACAGACGAGTCTAGCACTGTTTCGACGAGGGTGATACTGTACTTGTTCGA
GTCACCCATGTAACCCAGGCCTCCTTCCGGACCTAGCATCCCGCGGAATCCATACAGTCAACATTGCGACAGA
CGAGGAGGGCTTGTCCGATTCGGCACTGGCGTCCGTGGAGAATTGGACATCACACGAGCAGACGTCTAA
GATGCGCTTTCCCAAGGCCATATACACGGTACCGACAGGAGTAACCCAGCCGGGACAACGGCTTCGGCGGA
TCGCAAGCGTAAGATCCTTGCACTTGCACTGACAGTGCACACCAGGTGCTTATTATGGAGGACGACCCCTATTATTA
CATTGGCTTTGACGGGCTCGGGGAAGATCCTGTAACGCGTGAACGTATCCCCAGTTACTTTGCCCTGGAAAG
AGAACAGGCTGATGAATATGGGTATGGATATGTATTACGCTTTGAAAGCTTTTCGAAAATCATGTTCGGCTGG
TATGCGACTGGGCTACGTTGTGGGGCCGAAGCCTATCGTCACGGCCATCGTCGCTTATACGGCGACGAGCAG
TATTCATGCATCATCACCAATCCAAGTGATTGTGGCACATCTGCTCAGACACTGGGGTGTGAATGGGTTTCT
CCAACACGTGGACAAGGTCGCAAGCATGTATCGGGAGCGTCGTGATGTCTTTGCGTCCAGTCTCGAAAAGAT
ATTGGGCAGTGGTCTTACTCCTGTAGCCACATGGACGACGCCCGTGTTCAGGCATGTTTTTCTGGCTGAAGTT
GCACTTGCCCGGACGCTGAAAGCGCCAGAGGGCGACTCGTTCAGGTTATTGCGGAAAAGGCGCTCGATGA
AGGTGTGCTTGTGTTCCAGGATCTTCGTTTTATGCGGGTGGGTGTAAGACGCCATACGCTCGTGTGAGCTT
CAGTGTCAATCCCGAGAATGACATAGCCGAGGGTCTGCATCGCTTGCGCCGCGGATTGAATCTGCATGGAA
GGATGCAGGATACAGCACAAATCCCACCAATGTAA
```

Abbildung 45: Hypothetische genomische Sequenz von MGL_2601hyp.

Der Sequenzabschnitt mit Ähnlichkeit zu UM01804 ist hellgrün, MGL_2601 ist dunkelgrün dargestellt. Das Startkodon von MGL_2601 ist gelb hinterlegt. Das hypothetische Startkodon der Gesamtsequenz ist rot markiert. Pink ist der 28bp lange bereinigte Anteil.

Die hypothetische Gesamtsequenz ist mit 1474 bp um 511 Basenpaare länger als MGL_2601 und annähernd so lang wie mf_tam1 (1454 bp inkl. Intron). Die Bereinigung der 28bp langen Sequenz erfolgte relativ willkürlich.

Die Proteinsequenzen von MGL_2601hyp und Mf_Tam1 sind in Abbildung 46 gegenübergestellt. Die Proteinsequenzen sind zu 55% identisch, 72% der Aminosäuren sind äquivalent. Ausgehend vom Start-Methionin von MGL_2601 sind die Sequenzen zu 52% identisch und zu 72% äquivalent.

Ein Abgleich in der Conserved Domains-Databse mit der Proteinsequenz von MGL_2601 zeigte, dass diese zwar ebenfalls das katalytisch aktive Lysin enthält, aber nur 6 Pyridoxal-5-Phosphat-Bindungsstellen. Ein Abgleich mit MGL_2601hyp zeigte alle 10 Pyridoxal-5-Phosphat-Bindungsstellen (Abbildung 47).

Mf_tam1	MPLDLPSLLSQSSCDRPLSAIRGLLEPLSRPGVISLLAGKPNPSGFPFDSTITLRLLKPSVEGSKDAQ-
MGL_2601hyp	MPLNYEQLLSREYTRRPTPAIRGLLAHESRPGMISFLAGKPNPSGFPFQSI SVTLKPDAIMSKNSDT
Mf_tam1	GNPVEITTIIDGSELERITLQYGSTNGDVTLERELTKLISRVEHRTRNNGQPDGDFALATGSGSQDLLYK
MGL_2601hyp	DDATELVIEGEDLERALQYGSSSSDKMFSDCMDTLVSTVHGRKRGDGSAPAGDYELAVGTGSQDLLAK
	*
Mf_tam1	-----TISILFNPDQTVLVEVSPVYPCFLPELETHRVKAVGISTDEQGLSAQALRDTLKNWHT
MGL_2601hyp	VRLFAVLCAPTSLALFDEGDTVLVEVSPMYPCLLPDLASRGHTVNIATDEEGLSDSALASVLENWRS
Mf_tam1	SDTTKELRFPKALYTVPTGANPAGTTASTERKREILAIAREVGLLVLEDDPYFYFLTFEDMSDALQOKRA
MGL_2601hyp	HEQTSKMRFPKALYTVPTGSNPAGTTASADRKRKILALARREQVLIMEDDPYFYI GFDGLGEDPVTRERI
Mf_tam1	LSYFALEREADKWGYGYVLRFSFSKILSAGMRVCFMVGPPPTLVNAVVALTASSNLHTSGPAQAMA
MGL_2601hyp	PSYFALEREQADEYGYGYVLRFSFSKIMSAGMRLGYVVGPKPIVTAIVATATSSIHASSPIQVILV
Mf_tam1	GELMQYWGTDGFLRHTNVARMYKERRDVFGRIDITLGRGEDGKQTPFIATVYVTPVAGMFVWIKLHLPP
MGL_2601hyp	AHLRLRWGVNGFLQHVDKVASMYRERRDVFASSLERILGSG----PTPVATWITPVSGMFWIKLHLPP
Mf_tam1	TDGAPEGDSYRVISEKALEFVGLAMPGGAFFADKRKTPYVRTSFSLEPQDAHEALRLRRAVESAWKDA
MGL_2601hyp	TPEAPEGDSFQVIAEKALDEGVLVVPSSSFVAGGCKTPYARVVSFSVIPENDIAEGLRRLRRAVESAWKDA
Mf_tam1	GYDETFAMQT
MGL_2601hyp	CYSTLPPM--

Abbildung 46: Gegenüberstellung von Mf_Tam1 und MGL_2601hyp.

Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt und äquivalente grau. Das Start-Methionin von MGL_2601 ist mit einem Sternchen gekennzeichnet.

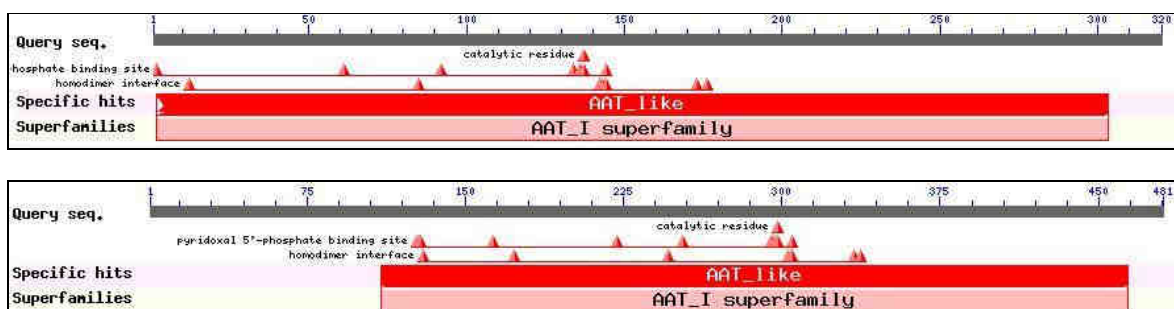


Abbildung 47: Ergebnis der Überprüfung der Proteinsequenz von MGL_2601 (oben) und MGL_2601hyp (unten) in der NCBI Conserved Domains Database.

5. DISKUSSION

Die *Malassezia*-Hefen werden mit einer Vielzahl von Erkrankungen der menschlichen Haut in Zusammenhang gebracht. Insbesondere gelten sie als Erreger der Pityriasis versicolor. Zumindest in den gemäßigten Klimazonen gilt *M. globosa* als Hauptverursacher der Pityriasis versicolor (Crespo-Erchiga und Florencio 2006; Gaitanis et al. 2006; Nakabayashi et al. 2000), während in den tropischen Regionen auch *M. furfur* eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Krisanty et al. 2008; Miranda et al. 2006; Dutta et al. 2002). Die Pathogenese der verschiedenen Symptome der Pityriasis versicolor ist bislang nicht zufriedenstellend geklärt. 1998 beschrieb Mayser erstmals einen Pigmentstoffwechsel in *M. furfur*, der einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Merkmale der Pityriasis versicolor bietet (Mayser et al. 1998b). Von den *Malassezia*-Hefen bilden in vitro nur *M. furfur* und *M. pachydermatis* Pigment. *Malassezia furfur* bildet erheblich schneller ein wesentlich breiteres Pigmentspektrum als *M. pachydermatis* (Mayser et al. 2004). Kultiviert man *M. furfur* mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle, so wird ein bräunliches Pigmentgemisch gebildet. Dieses kann auf folgende Weise mit Merkmalen der Pityriasis versicolor verknüpft sein:

- Hyperpigmentierung in unterschiedlichen Farbtönen und -schattierungen: Die Färbung des Pigmentgemisches reicht je nach Anteil der Einzelkomponenten von gelblich über rötlich bis zu dunkelbraun.
- Fluoreszenz der Läsionen im Woodlicht (366nm): Im Pigmentgemisch vorhandene Fluorochromen wie Pityrialacton fluoreszieren gelblich-grün im UV-Licht.
- Depigmentierung: Das Pigmentgemisch enthält Malassezin, das Apoptose in menschlichen Melanozyten induziert (Krämer et al. 2005b), und Keto-Malassezin, Malasseziaindol A und O52, welche *in vitro* eine Hemmung der Tyrosinase aufweisen (Krämer et al. 2004; Thoma 2003; Dahms et al. 2002).
- Fehlender Sonnenbrand in den Läsionen: Mit Pityrialacton und Pityriacitrin finden sich UV-Filter unter den Einzelsubstanzen (Mayser et al. 2002; Mayser und Pape 1998).
- Fehlendes oder schwach ausgeprägtes entzündliches Infiltrat trotz oft hoher Pilzlast: Die Pityriarubine A, B und C sind selektive Inhibitoren des granulozytären Bursts und könnten über diesen Mechanismus antiinflammatorisch wirksam sein (Krämer et al. 2005a).

Die Pigmente konnten bislang jedoch nicht aus Läsionen der Pityriasis versicolor isoliert werden, da nicht genug Schuppenmaterial zur Verfügung steht, so dass der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Tryptophan-abhängiger Pigmentsynthese und den Manifestationen der Erkrankung noch aussteht. Die Identifikation und Charakterisierung von Genen, die am Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsel von *M. furfur* beteiligt sind, ermöglicht tieferen Einblick in den Stoffwechselweg und stellt weitere Werkzeuge zur Aufklärung der Pathogenese der Pityriasis versicolor bereit.

5.1. Untersuchungen während der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese differentiell exprimierter Gene

Malassezia furfur ist molekularbiologisch noch kaum untersucht. Neben zur Speziesidentifikation verwendeten ITS (internal transcribed spacer)-Regionen der rDNA (Makimura et al. 2000) sowie rDNA-Sequenzen (Guillot und Gueho 1995) sind bislang lediglich eine Chitinsynthase (Kano et al. 1999), eine Lipase (Brunke und Hube 2006), einige Allergene (Andersson et al. 2003; Onishi et al. 1999; Yasueda et al. 1998) sowie ein Fragment eines Cytochrom b-Gens (Biswas et al. 2001) sequenziert worden.

Zur Identifikation von Genen, die an der Pigmentsynthese beteiligt sind, musste ein Verfahren gewählt werden, bei dem man ohne Kenntnis des Genoms des Organismus auskommt. Diese Voraussetzung erfüllt die cDNA Subtraktionstechnologie. Das Verfahren ermöglicht die selektive Amplifizierung in der „Tester“-Population differentiell exprimierter Gene, in unserem Falle in der pigmentbildenden Tryptophan-Kultur, nicht aber in der „Driver“-Population, der nichtpigmentbildenden Arginin-Kultur (Diatchenko et al. 1996). Dennoch liegt unter den nach Durchführung des cDNA Subtraktionsverfahren klonierten Sequenzen ein hoher Anteil nicht differentiell exprimierter Sequenzen vor (Gurskaya et al. 1996), was einen zusätzlichen Screening-Schritt erfordert. So wurden letztendlich aus 900 Klonen der 3h-Kultur lediglich 79 und aus den 600 Klonen der 5h-Kultur 91 Sequenzen erfolgreich identifiziert. Im NCBI tblastx-Search wiesen 69 von den 3h-Sequenzen und 73 von den 5h-Sequenzen signifikante Entsprechungen mit bekannten Proteinen auf. Bei den meisten (45/3h und 40/5h) waren hypothetische Proteine aus *M. globosa* die besten Treffer, gefolgt von *U. maydis* (12/3h und 23/5h). Vier tblastx-Ergebnisse wurden mit Sequenzen aus beiden Kontingenten erzielt.

Anhand der strukturellen Analyse einiger Einzelkomponenten des Pigmentstoffwechsels aus *M. furfur* und Fütterungsexperimenten mit [1-13C]-Tryptophan wurden Modellstoffwechselwege entworfen (Abbildung 8) (Irlinger et al. 2004; Irlinger 2002), denen wahrscheinlich ein gemeinsamer Vorläuferstoffwechselweg vorangeht (Abbildung 20). Einige der differentiell exprimierten Sequenzen ließen sich anhand ihrer wahrscheinlichen Funktionen in diesen Vorläuferweg integrieren. Wie in Abbildung 20 dargestellt, kann Tryptophan durch eine aromatische Aminotransferase (Sequenz 302) zu Indolpyruvat desaminiert werden. An der Kondensation zweier Indolpyruvat-Moleküle könnten Sequenzen mit Ähnlichkeit im tblastx zu Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain (Sequenz 541 und 542) beteiligt sein. So wird in dem Actinomyceten *Lechevalieria aerocolonigenes* die Kondensation zweier (halogenierter) Indolpyruvatmoleküle zu 11,11'-Dichlorochromopyrrolsäure in der Rebeccamycin-Biosynthese durch RebD katalysiert (Onaka et al. 2003). Dieses Enzym zeigt eine Ähnlichkeit von 54% zu StaD, dem homologen Enzym aus der Staurosporin-Biosynthese, und 34% zu VioB, dem homologen Enzym aus der Violacein-Biosynthese. RebD besitzt ein Häm-Bindungsmotiv der Cytochrom b5-Familie und ein Flavin-Bindungsmotiv. Cytochrome sind häufig an der Ausbildung von C-C-Verbindungen beteiligt (Nishizawa et al. 2006). Insbesondere Cytochrome P450 spielen eine Rolle bei der Ausbildung von C-C- und C-O-Bindungen zwischen aromatischen Verbindungen. Sequenz 315 zeigt Ähnlichkeit mit einem Cytochrom P450. Der nächste mögliche Schritt in Abbildung 20 beinhaltet die Decarboxylierung einer Indolpyruvateinheit mit anschließendem Ringschluss zu einem instabilen Triketon. Hier findet sich Sequenz 518 mit Ähnlichkeit zur Thiamin-Pyrophosphat (TPP)-abhängigen Pyruvat-/Indolpyruvatdecarboxylase-Familie. Neben der Decarboxylierung von Pyruvatmolekülen können Mitglieder dieser Familie eine Acyloin-Kondensation katalysieren (Pohl et al. 2002). Möglicherweise wird der Ringschluss zum Triketon nach vorangegangener Dehydrierung der restlichen Carboxylgruppe über diesen Mechanismus vollzogen.

Einige weitere Sequenzen zeigten im tblastx Ähnlichkeit mit Proteinen mit interessanten Beteiligungen an bekannten Sekundärstoffwechselwegen. Sequenz 323 zeigt Ähnlichkeit mit der einer Epimerase PhzC/PhzF. Diese spielt bei einigen Bakterienarten eine Rolle in der Synthese von Phenazin, einem Grundstoff diverser Farbstoffe und antibiotischer Substanzen (Mavrodi et al. 2006). Dieser Stoffwechselweg ist bisher für Pilze nicht beschrieben, obwohl einige Pilze hypothetische Proteine mit ähnlicher Sequenz besitzen.

Auch fand sich bei einigen identifizierten Sequenzen im tblastx Ähnlichkeit mit Mitgliedern des Isoprenoidstoffwechsels, nämlich die Sequenzen 314 (4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase and related prenyltransferases), 315 (Cytochrome P450, C-22 sterol-desaturase), 316 (Isopentenyl diphosphate isomerase) und im weiteren Sinne auch 522 und 523 (Methylase involved in ubiquinone/ menaquinone biosynthesis). Dieser Stoffwechselweg führt zur Synthese der Ergosterole. Ein intakter Ergosterolsyntheseweg wird für den transmembranösen Transport von Proteinen, Lipiden und Tryptophan benötigt (Gaber et al. 1989). Der Isoprenoidstoffwechsel steht auch im Zusammenhang mit der Biosynthese fungaler Indolalkaloide (Keller et al. 2005) und könnte somit eine Rolle in der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese spielen. Das Cytochrom P450, welches im Isoprenoidstoffwechsel als C-22 Steroldesaturase fungiert und Ähnlichkeit zu Sequenz 315 besitzt, zeigt darüberhinaus weitere Fähigkeiten im Fremdstoffstoffwechsel. So kann es Benzo[a]pyren in 3-Hydroxy-Benzo[a]pyren überführen (Kelly et al. 1997).

Darüber hinaus fanden sich einige weitere Sequenzen mit Ähnlichkeiten im tblastx zu Enzymen, die mit Fremdstoffstoffwechsel und Stressantwort assoziiert werden. Beispielsweise zeigte die translatierte Sequenz 501 Ähnlichkeit mit einer Glutathion-S-Transferase, die Sequenzen 556-559 mit Methioninsulfoxid-Reduktasen und die Sequenzen 364 und 555 mit Flavohämoproteinen. Die translatierten Sequenzen 353, 354, 356, 357, 535 und 536 zeigten Ähnlichkeiten mit verschiedenen Heatshock-Proteinen und Proteinen aus dem Ubiquitin-Stoffwechsel. Über die Bildung von Ubichinonen ist wiederum der Isoprenoidstoffwechsel mit Stressantwort verknüpft. Dieser hohe Anteil mit der Stressantwort assoziierter Sequenzen gibt Anlass zu Überlegungen, dass Tryptophan, wenn es alleinige Stickstoffquelle ist, geradezu toxisch auf *M. furfur* wirkt und der Pigmentstoffwechsel eine Art energieaufwändiger "Entgiftungsmaßnahme" darstellen könnte. Dazu passt die Beobachtung, dass sich das Wachstum der *Malassezia*-Hefen umgekehrt zur Pigmentbildung verhält (Barchmann et al. 2005).

Auffällig ist besonders im 3h-Kontigent auch ein hoher Anteil von Sequenzen, die an Transkription und Proteinbiosynthese beteiligt sein können. Dies mag ebenfalls ein Zeichen für die erhöhte Stoffwechselanforderung an den Organismus sein.

Darüber hinaus ließen sich Sequenzen identifizieren, deren Translationen Ähnlichkeit zu Proteinen zeigen, die üblicherweise Primärstoffwechselwegen wie dem Citratzyklus und dem Glyoxylatzyklus (Seq 317, Malatdehydrogenase, 505, Citratsynthase, 506, mitochondriale Aconitase, 527, Isocitrat-Lyase) oder der Synthese von Iron-Sulfur-Proteinen zugeordnet werden (Seq 305 und 504, NifU-like Protein, 358 und 540, HesB-like Domäne, 502, NifS),

oder selber Iron-Sulfur-Proteine sind (Seq 506, mitochondriale Aconitase, 555, Ferredoxinreduktase (Flavohämoprotein)). Dabei ist von Interesse, dass einige Enzyme aus Primärstoffwechselwegen auch Funktionen in Sekundärstoffwechselwegen besitzen, oder dort Duplikate in aufweisen. In der Biosynthese des Antibiotikums Phosphinothricin-Tripeptid in *Streptomyces viridochromogenes* finden sich drei Schritte, die den Citratsynthase-, Aconitase- und Isocitratdehydrogenase-Reaktionen aus dem Citratzyklus sehr ähneln. Mit der Phosphinomethylmalat-Isomerase wurde ein Enzym aus diesem Syntheseweg beschrieben, welches eine starke Ähnlichkeit zu Mitgliedern der Aconitase-Familie aufweist (Heinzelmann et al. 2001). Viollier et al. beobachteten zudem, dass die Citratsynthase und vor allem auch die Aconitase selbst neben ihren Funktionen im Citratzyklus Sekundärstoffwechselwege wie die Ausbildung von Luftmycel und Pigmenten beeinflussen (Viollier et al. 2001a; Viollier et al. 2001b)

Desweiteren konnte eine Sequenz identifiziert werden mit Ähnlichkeit im tblastx zu einer Isocitrat-Lyase. In *Leptosphaeria maculans* spielt dieses Enzym eine essenzielle Rolle für die Pathogenität dieses Pilzes (Idnurm und Howlett 2002).

In der tblastx-Suche fanden sich auch einige Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Proteinen mit Transportfunktionen (358-363, 540-552). Möglicherweise dienen diese der „Unschädlichmachung“ der Tryptophanderivate, indem sie sie in Transportvesikel verpacken und / oder aus der Zelle transportieren. Der Transport der Metabolite kann auch dazu dienen, die möglicherweise als Pathogenitätsfaktoren wirksamen Substanzen ihrem Zielort zuzuführen.

Neben den hier erwähnten Proteinen fanden sich unter den tblastx-Treffern Dehydrogenasen, Oxygenasen, Lyasen und weitere Proteine, die zumindest theoretisch Rollen in der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese spielen können. Derzeit lassen sie sich jedoch nicht bestimmten Funktionen in den Synthesewegen zuordnen. Darüberhinaus findet sich eine relativ große Anzahl mit Sequenzen mit Ähnlichkeit zu wahrscheinlichen Proteinen, deren Funktion bislang unbekannt ist, oder ganz ohne Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Die Funktionen der identifizierten Sequenzen in der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese in *M. furfur* bleiben aufgrund der fehlenden molekularbiologischen Tools für diesen Organismus bis auf weiteres unklar. Auch bleibt ungeklärt, ob die identifizierten Sequenzen direkt eine Rolle in der Synthese der Tryptophanmetabolite spielen, oder ob sie der Anpassung des Organismus an eine Stresssituation dienen, die durch Nahrungsmangel bzw. extrem einseitiges Substratangebot bedingt ist.

Kürzlich beschrieben Zuther et al. die genetische Regulation der Tryptophan-abhängigen Pigmentbiosynthese in *U. maydis*. Zuther entdeckte, dass Tryptophan durch Transaminierung mittels Tam1, einer Tryptophanaminotransferase, in Indolpyruvat überführt wird und alle weiteren Schritte spontan durch Kondensation eines Indolpyruvatmoleküls mit einem Tryptophanmolekül ablaufen, das heißt, dass die Tryptophan-abhängige Pigmentsynthese nach einem ersten, enzymatisch katalysierten Schritt spontan abläuft (Zuther et al. 2008). Allerdings münden andere, auf Indolpyruvat basierende Stoffwechselwege, wie z.B. die Rebeccamycin- und die Staurosporinbiosynthese in *L. aerocolonigenes* und *Streptomyces spp.* oder die Tryptophol-Synthese in *S. cerevisiae* anscheinend nicht in die hier beschriebene Pigmentsynthese. So akzeptieren die Aminooxidase RebO und die Chromopyrrolat-Synthase RebD aus der Rebeccamycinsynthese zwar auch nicht-halogenierte Substrate, d.h. Tryptophan und Indolpyruvat (Sanchez et al. 2005; Sanchez et al. 2002), es ist jedoch nicht beschrieben, dass die Disruption dieser Gene zu den von Mayser et al. (Mayser et al. 1998b) identifizierten Tryptophanderivaten führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Sequenz 302 eine Sequenz identifiziert werden, die eine deutliche Ähnlichkeit zur von Zuther et al beschriebenen Tam1 aus *U. maydis* aufwies. Da eine Tryptophanaminotransferase auch in *M. furfur* ein Schlüsselenzym in der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese sein könnte, wurde die Expression dieser Sequenz weiter analysiert und die genomische Sequenz und der wahrscheinliche Open Reading Frame aufgeklärt.

Weitere Untersuchungen, ob und inwiefern die anderen, in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen Rollen in der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese in *M. furfur* spielen, wären dennoch von Interesse für ein tiefergehendes Verständnis dieses Stoffwechselweges und somit möglicherweise der Pathogenese der Pityriasis versicolor. Ohne die Verfügbarkeit von Methoden zur homologen Genrekombination für *M. furfur* ist dies zurzeit jedoch kaum zufriedenstellend möglich.

Die Expression einiger interessanter Sequenzen sollte über einen längeren Zeitraum überprüft werden. Es wurden Proben nach 3 Stunden und 5 Stunden untersucht, da zu diesen Zeitpunkten die Subtraktion durchgeführt worden war, und nach 2 Tagen und 2 Wochen. Eine wesentlich längere Kulturdauer erwies sich in Anbetracht des steigenden Kontaminationsrisikos durch Bakterien und Schimmelpilze als nicht von Vorteil.

Der Zeitpunkt des Krankheitsbeginns kann bei Pityriasis versicolor nicht auf wenige Stunden festgelegt werden. Daher erhöht die Expression eines an der Pigmentsynthese beteiligten Gens über einen Zeitraum von mehreren Wochen die Wahrscheinlichkeit, dass das entsprechende mRNA-Transkript, aus Schuppen von Pityriasis versicolor-Läsionen isoliert werden kann, sofern dies überhaupt möglich ist.

Fernziel der vorliegenden Arbeit ist die Erarbeitung von Methoden, mittels derer ein Zusammenhang zwischen Tryptophan-abhängiger Pigmentsynthese und der Erkrankung Pityriasis versicolor durch den Nachweis der Transkripte in Schuppen der Läsionen überprüft werden kann. Deswegen musste zunächst ein Verfahren gefunden werden, welches die Umsetzung mehrerer Durchläufe erlaubte und auch mit geringen RNA-Mengen auskam. Die Wahl fiel schließlich auf die semiquantitative PCR, die zum einen den Durchsatz mehrerer Proben gleichzeitig erlaubt und durch den Einsatz von cDNA als Template den Verlust in geringen Mengen vorhandener RNA durch Degeneration reduziert. Durch den Einsatz geeigneter Primer, die nur im offenen Leserahmen amplifizieren, d.h. keine Intronsequenz beinhalten, kann später auch das Verfälschungsrisiko durch gDNA in sehr kleinen Proben minimiert werden, aus denen keine mRNA isoliert werden kann. Bei Pilzmaterial aus Hautschuppen wäre dieses Risiko hoch.

Vier Sequenzen wurden überprüft. *Mf_tam1*, Sequenz 302, wurde wegen ihrer Ähnlichkeit im *tblastx* zu UM01804, *Tam1*, einer Tryptophanaminotransferase aus *U. maydis* ausgewählt. Diese Sequenz ließ sich dem ersten Schritt des hypothetischen Syntheseweges der Pigmente zuordnen. *Mf_erg5*, Sequenz 315, wurde wegen der Ähnlichkeit zu C22-Sterol-Desaturase aus dem Ergosterolstoffwechsel ausgewählt, um einen Zusammenhang zwischen Isoprenoidstoffwechsel und Tryptophan-abhängiger Pigmentsynthese zu untersuchen. Eine fragliche Beteiligung von Iron-Sulfur-Assembly-Proteinen wurde durch die Untersuchung der Expression von *mf_hesb* überprüft. Dieses Transkript wurde sowohl im 3h-Kontigent (Sequenz 348) als auch im 5h-Kontigent (Sequenz 540) identifiziert. Darüber hinaus sollte auch die Expression eines Transkripts mit *tblastx*-Ähnlichkeit zu einem Protein unbekannter Funktion überprüft werden. Da die vier Sequenzen 366-368 und 377 Sequenzüberschneidungen aufwiesen, wurden anhand ihrer Sequenz Primer designt (*mf_unknown*).

Nur zu wenigen Genen aus *M. furfur* liegen Sequenzinformationen vor: Zur Speziesidentifikation verwendete ITS (internal transcribed spacer)-Regionen der rDNA (Makimura et al. 2000), rDNA-Sequenzen (Guillot und Gueho 1995), eine Chitinsynthase (Kano et al. 1999), eine Lipase (Brunke und Hube 2006), einige „Allergene“ (Andersson et al.

2003; Onishi et al. 1999; Yasueda et al. 1998) sowie ein Fragment eines Cytochrom b-Gens (Biswas et al. 2001) sind bisher sequenziert worden. Zum Design der Primer der zu überprüfenden Sequenzen konnte dementsprechend lediglich auf die im Screening-Schritt erhaltenen Teilsequenzen zugegriffen werden.

Als interner Standard für die Untersuchung der Expression der differentiell exprimierten Sequenzen werden für die semiquantitativer PCR Gensequenzen benötigt, die auch unter unterschiedlichen Kulturbedingungen gleichmäßig exprimiert werden, sogenannte „Housekeeping Gene“. Verschiedene Gene, wie beispielsweise β -Actin und GAPDH, kommen hierfür in Frage. Jedoch scheint die Expression von Housekeeping-Genen beträchtlichen Schwankungen zu unterliegen (Lisowski et al. 2008; Watson et al. 2007; Khimani et al. 2005). Bisher existierten für *M. furfur* keine Daten zu Housekeeping-Genen, so dass zunächst geeignete Gensequenzen herausgearbeitet werden mussten. Die Wahl fiel auf die Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase (Sdh2). Dieses Gen wird in *U. fabae* konstitutionell exprimiert (Wirsel et al. 2004) und wird in quantitativen Untersuchungen zur Genexpression in *U. maydis* (Laurie et al. 2008; Hu et al. 2007) und auch im Affymetrix *Ustilago maydis* GenArray (persönliche Kommunikation H. Eichhorn/J. Schirawski, Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) als Kontrolle eingesetzt. Darüber hinaus kann über einen Austausch einer Aminosäure im zugehörigen Enzym in *U. maydis* und anderen Pilzen eine Resistenz gegenüber Carboxin induziert werden (Honda et al. 2000; Skinner et al. 1998; Broomfield und Hargreaves 1992), so dass es als Resistenzkassette zum gezielten Genaustausch bei der homologen Rekombination genutzt werden kann. Da für *M. furfur* keine Systeme zur Genrekombination etabliert sind, war die Identifikation der Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase auch im Hinblick auf die zukünftige Erarbeitung von Transformationssystemen vielversprechend.

Interessanterweise ergab die Amplifikation von in cDNA umgeschriebener mRNA mit sonst zur Speziesidentifikation eingesetzten Primern für die Internal Transcribed Spacer 1-Region eine gleichmäßige, mit *mf_sdh2* vergleichbare Expression (Abbildung 26). Über die Verwendung der ITS1-Region als internen Standard in auf mRNA basierenden Versuchen fand sich nichts in der Literatur. Ein Kontaminationsrisiko der Proben mit gDNA und ribosomaler RNA wurde durch die Verwendung von DNase, die Isolation von mRNA und die Verwendung von Oligo(dT)-Primern minimiert.

Lediglich *mf_tam1* war zu allen überprüften Zeitpunkten in der Tryptophan-Kultur stärker exprimiert als in der Arginin-Kultur. *Mf_unknown* zeigte ebenfalls nach zwei Wochen noch eine stärkere Expression in der Tryptophan-Kultur, allerdings erschien die Expression nach

zwei Tagen in beiden Kulturen ähnlich ausgeprägt. *Mf_erg5* und *mf_hesb* waren nur zu Beginn der Pigmentsynthese verstärkt in der Tryptophan-Kultur nachzuweisen. Möglicherweise gehören diese Gene in die frühe Phase der Pigmentsynthese, während *mf_unknown* und *mf_tam1* auch der Aufrechterhaltung der Pigmentsynthese dienen.

Somit wurde *mf_tam1* als vielversprechendes Ziel zur Überprüfung der Expression pigmentassoziierter Gene in Schuppen der Pityriasis versicolor identifiziert und weiter untersucht.

5.2. Identifikation und Untersuchung der genomischen Gesamtsequenz und des Open Reading Frames von *mf_tam1* und *mf_sdh2*

Ausgehend von einer durch degenerate PCR ermittelten Teilsequenz wurde mittels inverse PCR die genomische Gesamtsequenz von *mf_sdh2* identifiziert. Die Grundlage für das Design der degenerate Primer bildete die in Nukleotidsequenz übersetzte Konsensussequenz der Proteinsequenzen von acht Basidiomyceten und zwei Ascomyceten. Erst mit dem dritten Primerpaar konnte ein verwendbares Sequenzfragment amplifiziert und sequenziert werden, während die beiden vorhergehenden Primerpaare trotz des Versuchs der Optimierung der PCR-Bedingungen keine Amplifikate ergaben. Auf der Grundlage dieses Sequenzfragmentes wurden Primer für die Inverse PCR designt, welche zur Identifikation eines 1207 bp langen genomischen DNA-Abschnittes führte. Von dieser Nukleotidsequenz konnten 911 bp einem wahrscheinlichen Gen mit deutlicher Ähnlichkeit zu MGL_3104 und UM00844 in der NCBI tblastx-Suche zugeschrieben werden. Ein Fragment von 142 bp am 3'-Ende zeigte eine starke Ähnlichkeit zu MGL_3103. Ausgehend von der genomischen Sequenz wurde der Open Reading Frame zu *mf_sdh2* identifiziert. Dieser umfasst eine Sequenz von 873 bp, beginnend mit einem ATG und endend mit dem Stoppkodon TAG. Die in Aminosäuresequenz übersetzte Sequenz zeigt ein hohes Maß an konservierten Regionen, wie die hohe Übereinstimmung mit den Proteinsequenzen aus anderen Organismen verdeutlicht.

Interessanterweise beinhaltet die genomische Sequenz von *mf_sdh2* ein GT-AG-Intron von 38bp Länge. Neben dem Sequenzvergleich von cDNA und gDNA ließ sich dies durch die Beobachtung von in Hefen konservierten Splicing-Regionen unterstützen.

Die genomische Sequenz von *mf_tam1* wurde ausgehend von einem mittels cDNA-Subtraktion identifizierten Fragment von 336bp mittels inverse PCR ermittelt. Die gesamte identifizierte Sequenz umfasst 2072 bp. Die genomische Sequenz mit Ähnlichkeit zu Tam1 aus *U. maydis* (um01804) und zu MGL_2601 ist 1419 bp lang. Auch hier erscheint die

Anordnung des Gens und seiner Nachbarn in *M. furfur* analog zur Anordnung von MGL_2601 und den benachbarten Gene in *M. globosa* zu sein.

Der für mf_tam1 ermittelte Open Reading Frame umfasst eine 1431 bp lange Sequenz. Dass der Open Reading Frame 12bp länger zu sein scheint, als die genomische Sequenz, kommt dadurch zustande, dass am 5'-Ende der genomischen Sequenz ein Abschnitt von 35 bp liegt, der im tblastx keine Ähnlichkeit zu MGL_2601 oder UM01804 zeigte, aber anhand der Sequenzanalyse mittels EditSeq-Programm dem Open Reading Frame zuzuordnen ist, und mit dem einzig sinnvollen ATG-Startkodon beginnt.

Auch die genomische Sequenz von mf_tam1 enthält ein GT-AG-Intron von 23 bp Länge. Hier fand sich eine GTACGT-5'-Splice-Stelle und eine CAG-3'-Splice-Stelle, im Kontrast zum Intron aus mf_sdh2 jedoch kein Branchingpoint. Interessanterweise enthält das tam1-Gen aus *U. maydis* (UM01840) überhaupt keine Introns (Zuther et al. 2008). Auch in MGL_2601 aus *M. globosa* konnte anhand der im NCBI hinterlegten genomischen Sequenz kein Intron ausgemacht werden.

Bislang liegen nur sehr wenige Informationen zum Genom von *M. furfur* vor, und es kann keine Aussage zur Häufigkeit und Länge von Introns in *M. furfur* gemacht werden. Dennoch ist es eine interessante Beobachtung, dass beide in der vorliegenden Arbeit identifizierten Gene relativ kurze Introns enthalten (35 bp und 23 bp). Yasueda et al. identifizierte in Mal f 2, einem Allergen aus *M. furfur*, sogar zwei Introns von 37 bp und 39 bp mit ähnlichen Splicing-Stellen wie den hier beobachteten (Yasueda et al. 1998). Das kürzlich beschriebene Lipase-Gen in *M. furfur* Mflip1 enthält hingegen keine Introns (Brunke und Hube 2006). Das Genom von *M. globosa* enthält 0,5 Introns pro Gen mit einer durchschnittlichen Länge von 76 bp (Xu et al. 2007), ähnlich *U. maydis* mit 0,46 Introns pro Gen (Kamper et al. 2006). In *U. maydis* sind die Introns jedoch mit 170bp im Durchschnitt länger (24bp-1899bp) (Ho et al. 2007). *Saccharomyces cerevisiae* enthält nur 0,04 Introns pro Gen, diese sind dafür mit 368 bp recht lang (Loftus et al. 2005; Spingola et al. 1999), während *C. neoformans* viele eher kurze Introns enthält (5 pro Gen, 67bp im Durchschnitt) (Loftus et al. 2005).

Für zukünftige Studien ist das Vorhandensein eines Introns in mf_tam1 durchaus interessant, da das Design Intron-überspannender Primer den Nachweis der Expression des Transkripts in Hautschuppen der Pityriasis versicolor dahingehend erleichtert, dass eine Kontamination durch gDNA vernachlässigt werden kann. Für zukünftige Versuche zur Überexpression des Proteins z.B. in *E. coli* muss beachtet werden, dass sich gDNA nicht ohne weiteres zur Klonierung eignet, sondern hier cDNA verwendet werden muss.

Die Beobachtung, dass die in *M. furfur* identifizierten Gene und ihre Nachbarn anscheinend genauso angeordnet sind wie ihre Homologe in *M. globosa*, unterstreicht die enge Verwandtschaft dieser beiden Organismen. MGL_2601 ist entgegen der Leserichtung von MGL_2600 und MGL_2602 auf dem Chromosom angeordnet, ebenso wie mf_tam1 zu seinen Nachbargenen entgegengesetzt angeordnet ist. Dabei fiel auf, dass sich zwischen dem bislang angenommenen Startkodon von MGL_2601 und dem möglichen Start von MGL_2602 832 Basenpaare liegen, während zwischen mf_tam1 und dem zu MGL_2602 homologen Gen aus *M. furfur* nur etwa 140 bp liegen. Diese Diskrepanz wurde zum Anlass genommen, den Abschnitt zwischen MGL_2601 und MGL_2602 genauer zu betrachten. Es zeigte sich, dass in diesem Abschnitt ein Sequenzfragment liegt, das eine deutliche Ähnlichkeit zu UM01804 und mf_tam1 aufweist. Bereinigt man die gesamte Sequenz um ein 28 bp langes Fragment, welches sich von einem GT zu einem AG erstreckt, so erhält man eine Sequenz von 1446 bp, welche mit einem ATG beginnt und im richtigen Leserahmen bis zu einem Stoppkodon läuft. Diese Sequenz ist mf_tam1 sehr ähnlich, die Identität liegt bei 55%. Das Vorliegen einer in Anzahl der Basenpaare und Anzahl der Pyridoxalbindungsstellen davon deutlich verschiedenen Sequenz in *M. globosa* hätte deren Unfähigkeit erklären können, Tryptophan zu verstoffwechseln. Das Vorliegen einer sehr ähnlichen, annähernd gleichlangen Sequenz mit gleichen Pyridoxalbindungsstellen wirft die Frage auf, ob *M. globosa* vielleicht doch Pigment bilden könnte und bislang lediglich weitere, für die in vitro Pigmentsynthese notwendige Voraussetzungen dafür unentdeckt sind. Andererseits zeigen auch Tam1 und Tam2 aus *U. maydis* eine deutliche Ähnlichkeit zueinander, obwohl Tam2 nicht an der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese beteiligt ist. Die weitere Untersuchung des Enzyms aus *M. globosa* ist unerlässlich, um eine definitive Aussage zur Fähigkeit von *M. globosa*, Pigment zu bilden, machen zu können. Außerdem sollten weitere Untersuchungen angestellt werden, ob sich die Pigmentsynthese in *M. globosa* nicht doch in vitro induzieren lässt.

Der Abgleich der Sequenzen von Pigmentbildnern und Nicht-Pigmentbildnern ergab keine maßgeblichen Unterschiede. So zeigte UM03538, Tam2 aus *U. maydis*, welche nicht an der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese beteiligt ist (Zuther et al. 2008), mehr Ähnlichkeit zu mf_tam1 als die Sequenz aus *C. glabrata*, einem Pigmentbildner.

Letztendlich lässt es sich ohne tiefere Untersuchungen nicht klären, ob die Nicht-Pigmentbildner möglicherweise „defekte“ Tryptophanaminotransferasen besitzen, oder ob die Gene zwar für funktionale Enzyme kodieren, diese jedoch aufgrund des Verlusts positiver Regulatoren nicht mehr aktiviert werden, oder ob in diesen Organismen Tryptophan zwar in Indolpyruvat überführt wird, das Indolpyruvat jedoch in weiteren Stoffwechselwegen

umgesetzt wird, bevor die von Mayser beschriebenen Metabolite spontan entstehen können. Dies würde bedeuten, dass in *M. furfur* ein (möglicherweise evolutionär „gewollter“) Mangel an Stoffwechselwegen besteht, in welchen Indolpyruvat weiter umgesetzt würde. Andererseits könnten auch die bisher zur Induktion der Pigmentbildung eingesetzten Kulturbedingungen falsch gewählt gewesen sein. *Malassezia globosa*, zum Beispiel, lässt sich schon unter optimalen Bedingungen schwerer kultivieren als *M. furfur*, so dass dieser Organismus zur Pigmentbildung möglicherweise ganz andere Bedingungen benötigt als bisher angenommen. Die unterschiedliche Intensität, in der zum Beispiel *M. furfur* und *M. pachydermatis*, der einzige weitere Pigmentbildner unter den *Malassezia*-Hefen (Mayser et al. 2004), oder *M. furfur* und *S. cerevisiae* Pigment bilden, wirft wiederum die Frage auf, ob die einzelnen Enzyme unterschiedliche Kinetiken oder unterschiedliche Substrataffinitäten aufweisen. Auch ist zu überdenken, ob einige weitere in *M. furfur* identifizierte differentiell exprimierte Gene für das unterschiedliche Pigmentspektrum verantwortlich sein könnten, und somit möglicherweise nicht alle Pigmente spontan entstehen.

Die in *M. furfur* identifizierte Sequenz Mf_Sdh2 zeigt sich im Abgleich mit den Sequenzen von Iron-Sulfur-Untereinheiten von Succinatdehydrogenasen aus anderen Organismen zum größten Teil hochkonserviert. Das lässt sich gut damit begründen, dass dieses Enzym als Housekeeping-Enzym stets die gleiche Aufgabe zu erfüllen hat und Mutationen keinen Selektionsvorteil erbrachten.

Im Kontrast dazu steht die Diversität der Aminotransferasen mit Ähnlichkeit zu Mf_Tam1, da hier möglicherweise eine Spezialisierung des Enzyms mit der Fähigkeit einzelner Organismen einherging, Nischen zu besiedeln.

5.3. Bewertung der Ergebnisse im Zusammenhang

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um einen Beitrag zur Bedeutung der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese in *M. furfur* zu erbringen und dadurch der Entschlüsselung der Pathogenese der Pityriasis versicolor Vorschub zu leisten.

So war einerseits die Identifikation von an der Pigmentsynthese beteiligten Genen ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit, und andererseits die Erarbeitung molekularbiologischer Werkzeuge für *M. furfur*.

Mit der Identifikation einer wahrscheinlichen Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase aus *M. furfur* konnte ein geeignetes Housekeeping-Gen auch für zukünftige quantitative Untersuchungen der Genregulation in diesem Organismus gefunden werden. Beispielsweises

ist in *U. maydis* dieses Gen als Housekeeping-Gen etabliert (Laurie et al. 2008; Hu et al. 2007). Die Aufklärung der Gesamtsequenz inklusive eines Introns ist für das Design noch spezifischerer Primer unerlässlich. Darüberhinaus ermöglicht die Kenntnis des Open Reading Frames die Klonierung und Analyse des Enzyms in zukünftigen Studien.

In *U. maydis* führt der Austausch einer Aminosäure, einem Leucin, durch ein Histidin innerhalb von Sdh2 zur Erlangung einer Resistenz gegenüber Carboxin (Broomfield und Hargreaves 1992), so dass die zugehörige Genmutante als Resistenzkassette für die homologe Genrekombination genutzt wird. Auch für *P. ostreatus* werden auf dieser Mutation basierende Resistenzkassetten eingesetzt (Honda et al. 2000). Ein zukünftiges Ziel auf dem Weg zur Entschlüsselung der Pathogenität der *Malassezia*-Hefen wird die Erarbeitung von Transformationssystemen sein. Bislang blieben Versuche, für *U. maydis* etablierte Protokolle direkt auf *M. furfur* zu übertragen, ohne Erfolg (eigene Beobachtungen). Dies kann daran liegen, dass sich *M. furfur* nicht ohne weiteres protoplastieren lässt, weil Resistenzkassetten entweder nicht in den Organismus hinein gelangen, er anschließend nicht in der Lage ist, sich zu regenerieren, oder aber die für *U. maydis* entwickelten Resistenzkassetten von *M. furfur* nicht ins Genom integriert werden können. Sinnvoll wäre dementsprechend die Entwicklung von Resistenzkassetten, die dem Genom von *M. furfur* entstammen. Diese könnten beispielsweise durch Transfektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* in das Genom von *M. furfur* inseriert werden. Mf_Sdh2 könnte also zur Entwicklung einer Resistenzkassette verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit einiger Wahrscheinlichkeit das Gen für das Schlüsselenzym der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese in *M. furfur* identifiziert werden. Bei diesem Gen handelt es sich um mf_tam1, dessen übersetzte Aminosäuresequenz eine starke Ähnlichkeit zu MGL_2601, dem hypothetischen Protein einer partiellen mRNA-Sequenz aus *M. globosa*, und UM01804, der Tryptophanaminotransferase Tam1 aus *U. maydis*, aufweist. Tam1 ist das Schlüsselenzym der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese aus *U. maydis* (Zuther et al. 2008).

Mittlerweile haben Versuche zur Klonierung und Überexpression des Enzyms von mf_tam1 in *E. coli* begonnen, so dass der Nachweis, dass es sich bei dem Enzym tatsächlich um die Tryptophanaminotransferase aus *M. furfur* handelt, demnächst erbracht sein wird. Auch soll mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit erarbeiteten molekularbiologischen Protokolle das Vorhandensein von Transkripten des Gens in Läsionen der Pityriasis versicolor untersucht werden. Der Nachweis solcher Transkripte wäre ein großer Schritt für die Entschlüsselung der

Pathogenese der Pityriasis versicolor. Auch könnte der Nachweis des Zusammenhanges zwischen der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese und der Erkrankung Pityriasis versicolor therapeutischen Nutzen mit sich bringen. Sollte sich erweisen, dass die hier identifizierte Aminotransferase den initialen Schritt der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese katalysiert, und dass alle weiteren Schritte spontan ablaufen, und ließe sich das zugehörige Transkript in Schuppen der Pityriasis versicolor nachweisen, so wäre es denkbar, dass eine gezielte Hemmung dieser Aminotransferase zum Ausbleiben oder zur Abschwächung der Krankheitssymptome der Pityriasis versicolor führen könnte. Untersuchungen zur Auswirkungen solcher Hemmstoffe auf die Pigmentsynthese in Kulturen von *M. furfur* haben bereits begonnen.

Weiterhin unklar ist jedoch, welches Mitglied der Gattung *Malassezia* Auslöser der Pityriasis versicolor ist. Während in unseren Breiten vor allem *M. globosa* aus den Läsionen der Erkrankung isoliert wird (Crespo-Erchiga und Florencio 2006; Gaitanis et al. 2006; Nakabayashi et al. 2000), spielt in den tropischen Regionen auch *M. furfur* eine große Rolle (Krisanty et al. 2008; Miranda et al. 2006; Dutta et al. 2002). Bislang ist die Tryptophan-abhängige Pigmentsynthese für *M. globosa* nicht beschrieben, und es wurde angenommen, dass *M. globosa* zur Pigmentbildung nicht in der Lage sei. Die Beobachtung von Hyphen in läsionaler Haut wird als diagnostisches Kriterium bei Pityriasis versicolor herangezogen, und auch Hyphenbildung konnte *in vitro* bislang nicht in *M. globosa* induziert werden, wohl aber in *M. sympodialis* (Faergemann und Bernander 1981) und *M. furfur* (AG Mayser, unveröffentlichte Beobachtungen). Zurzeit laufen Untersuchungen zur genetischen Regulation der Hyphenbildung in *M. furfur*.

Insbesondere die Beobachtung, dass die im NCBI hinterlegte partielle mRNA-Sequenz für MGL_2601 möglicherweise nicht der kompletten Sequenz des zu *mf_tam1* homologen Gens aus *M. globosa* entspricht, sondern dieses noch wesentlich mehr Ähnlichkeit zu dem Gen aus *M. furfur* aufweist als ursprünglich angenommen, unterstreicht die Theorie, dass auch *M. globosa* in der Lage sein könnte, Pigment zu bilden. Eine Untersuchung des Enzyms aus *M. globosa* sollte hierüber Aufschluss bringen können. Außerdem sollten die bisher zur Induktion der Pigmentsynthese eingesetzten Bedingungen variiert werden, da *M. globosa* schon unter optimalen Bedingungen schwieriger zu kultivieren ist als *M. furfur*.

Sollte sich bestätigen, dass *M. globosa* tatsächlich in der Lage ist, Pigment zu bilden, kann untersucht werden, inwieweit sich Untersuchungsergebnisse zur Genetik von *M. furfur* auf *M. globosa* übertragen lassen, und ob *M. furfur* als Modellorganismus für *M. globosa* dienen

kann, da *M. furfur* wesentlich leichter zu kultivieren ist und sich verschiedene Eigenschaften wie Pigment- und Hyphenbildung verhältnismäßig einfach in *M. furfur* induzieren lassen.

Die Tryptophan-abhängige Pigmentsynthese in *M. furfur* bietet ein durchaus plausibles Erklärungsmodell für die Pathogenese der Pityriasis versicolor. Bislang sind erst von wenigen Metaboliten biologische Eigenschaften bekannt, so dass auch hier noch Forschungsbedarf besteht. Die Identifikation des Schlüsselenzyms trägt einen wesentlichen Schritt zum Verständnis dieses Metabolismus bei, erklärt jedoch nicht, unter welchen Bedingungen dieser Stoffwechselweg auf der Haut aktiviert wird. Die Untersuchung der Verbreitung des Stoffwechselweges unter den *Malassezia*-Hefen, die Erarbeitung von in-vitro-Modellen der Erkrankung, die Untersuchung weiterer, mit der Erkrankung assoziierter Eigenschaften der Pilze, wie z.B. die Hyphenbildung, und auch die Erarbeitung von Transformationssystemen für die *Malassezia*-Hefen zur gezielten homologen Genrekombination werden unerlässlich für das Verständnis dieser weitverbreiteten, für den Patienten oft belastenden und in tropischen Regionen stigmatisierenden Erkrankung sein. Für diese Punkte konnte die vorliegende Arbeit Grundlagen schaffen.

Zusammenfassend lassen sich die in der Problemstellung formulierten Fragen wie folgt beantworten:

1. Lassen sich mittels cDNA-Subtraktions-Verfahren während der Pigmentsynthese differentiell exprimierte Gene nachweisen?

Mittels cDNA-Subtraktions-Verfahren ließen sich in der 3h-Kultur 79 Sequenzen ermitteln, die während der Pigmentsynthese differentiell exprimiert werden, und in der 5h Kultur 91 Sequenzen.

2. Um was für Gene handelt es sich und finden sich Homologien zu Genen aus Pigment-/ Tryptophan-/ Indolalkaloidstoffwechselwegen anderer Organismen?

Im translated vs. translated BLAST zeigten 69 der 3h-Sequenzen und 73 der 5h-Sequenzen signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Bei den meisten waren hypothetische Proteine aus *M. globosa* die besten Treffer, gefolgt von Proteinen aus *U. maydis*. Drei Sequenzen konnten anhand ihrer Ähnlichkeiten dem Tryptophanstoffwechsel zugeordnet werden. In den Kapiteln 4.1.4 und 5.1 wird detailliert auf Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus Pigment-/ Tryptophan-/ Indolalkaloidstoffwechselwegen eingegangen.

3. Gibt es Sequenzen, die in den Modellstoffwechselweg nach Irlinger et. al. eingeordnet werden können?

Die Sequenzen 302, 541, 542 und 518 ließen sich, wie in Abbildung 20 dargestellt, dem Modellstoffwechsel nach Irlinger et al. zuordnen. Sequenz 302, später in der vorliegenden Arbeit als *Mf_Tam1* bezeichnet, zeigte signifikante Ähnlichkeit zur Sequenz von *Tam1* aus *U. maydis*, dem Schlüsselenzym der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese in diesem Organismus. Die Sequenzen 541 und 542 zeigten Ähnlichkeiten zu einer Cytochrom b5-ähnlichen Häm-/Steroid-bindenden Domäne und die Sequenz 518 zu einer Pyruvat-/Indolpyruvatdecarboxylase.

4. Lassen sich molekularbiologische Verfahren zur Expressionsanalyse differentiell exprimierter Sequenzen sowie Housekeeping-Gene erarbeiten?

In der vorliegenden Arbeit wurde ein semiquantitatives PCR-Verfahren entwickelt, anhand dessen die Expression einiger differentiell exprimierter Sequenzen überprüft wurde. Zuvor wurde die wahrscheinliche Sequenz der Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase aus *M. furfur* (*mf_sdh2*) identifiziert. Dieses Gen wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

5. Lassen sich Sequenzen identifizieren, die für eine Überprüfung in läsionaler Haut bei PV geeignet sind (stabile Expression über einen langen Zeitraum)?

Sequenz 302 (*mf_tam1*) erwies sich zu allen überprüften Zeitpunkten als differentiell exprimiert, auch noch nach 2 Wochen. Da diese Sequenz im *tblastx* Ähnlichkeit zu dem Schlüsselenzym der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese von *U. maydis* zeigt, erscheint die Überprüfung der Expression dieses Gens in Läsionen der Pityriasis versicolor als am ehesten erfolgversprechend.

6. Lassen sich bei einer interessanten Sequenz und einem Housekeeping-Gen genomische Sequenz und Open Reading Frame identifizieren?

Mittels inverser PCR konnten die genomischen Sequenzen von *mf_tam1* und *mf_sdh2* identifiziert werden. Durch Sequenzierung von in cDNA umgeschriebene mRNA konnte darüberhinaus der Open Reading Frame beider Gene identifiziert werden.

7. Lassen sich gleichzeitig Grundlagen für weiterführende Untersuchungen wie die Erarbeitung eines Transformationssystems zur homologen Genrekombination für die *Malassezia*-Hefen erarbeiten?

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene molekularbiologische Verfahren erarbeitet, die auch der Erarbeitung eines Transformationssystems für *M. furfur* dienen können. Insbesondere die Identifikation von *mf_sdh2* sollte hier nutzbringend sein. Der Austausch einer Aminosäure in der Iron-Sulfur-Einheit der Succinatdehydrogenase von *U. maydis* führt zur Resistenz gegenüber Carboxin, das entsprechende manipulierte Gen wird als Resistenzkassette für die homologe Genrekombination in *U. maydis* genutzt. Die Kenntnis des ursprünglichen Gens aus *M. furfur* kann Grundlage für die Erarbeitung einer spezifischen Resistenzkassette für *M. furfur* sein.

8. Wie lassen sich die hier gewonnenen Ergebnisse in die Entschlüsselung der Pathogenese der Pityriasis versicolor integrieren?

In der vorliegenden Arbeit konnte mit einiger Wahrscheinlichkeit die genomische Sequenz für das Schlüsselenzym der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese von *M. furfur* identifiziert werden (*Mf_Tam1*). Diese zeigt eine starke Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein aus *M. globosa* (*MGL_2601*) und zu *UM01804*, dem Schlüsselenzym der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese aus *U. maydis*. Eine Überprüfung der im NCBI hinterlegten genomischen Sequenz von *M. globosa* zeigt, dass die Ähnlichkeiten zwischen den hypothetischen Proteinen aus *M. furfur* und *M. globosa* möglicherweise noch größer sind als initial angenommen. Darüberhinaus zeigt das zugehörige Gen aus *M. furfur* eine sehr stabile Expression.

Malassezia globosa gilt in unseren Breiten als Erreger der Pityriasis versicolor. Sollte sich erweisen, dass *M. globosa* zur Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese befähigt ist, sollten sich Transkripte des Schlüsseligens in Läsionen der Pityriasis versicolor nachweisen lassen, und sollte eine Hemmung des Enzyms *Mf_Tam1* in vivo zur Besserung der Symptomatik der Pityriasis versicolor führen, wäre die kausale Beziehung zwischen Tryptophan-abhängiger Pigmentsynthese und der Erkrankung erwiesen, und die Pathogenese einer zwar harmlosen aber stigmatisierenden Erkrankung wäre aufgeklärt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Pityriasis versicolor (PV) gilt als eine der häufigsten erregerbedingten Dermatosen weltweit. Sie geht mit einem weiten Spektrum verschiedener Charakteristika einher, wie dem Auftreten von hyperpigmentierten aber auch depigmentierten Läsionen, einer relativen Unempfindlichkeit der Depigmentierungen gegenüber UV-Licht, Fluoreszenz der Läsionen im Woodlicht (311nm) und einem in Relation zur Pilzlast nur gering ausgeprägtem entzündlichem Infiltrat. Bislang ist die Pathogenese der Erkrankung nicht geklärt.

Als Auslöser der Erkrankung gelten Hefen der Gattung *Malassezia*, in den gemäßigten Breiten vor allem *M. globosa*, während in tropischen Regionen auch *M. furfur* eine stärkere Rolle spielt. Mayser und Mitarbeiter entdeckten einen Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsel in *M. furfur*, dessen Metabolite Eigenschaften aufweisen, die den Symptomen der PV entsprechen. Diese Pigmente konnten bislang jedoch nicht aus Läsionen der PV isoliert werden. Auch konnte die Pigmentbildung bislang nicht in *M. globosa* induziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden molekularbiologische Werkzeuge etabliert, um die genetische Regulation des Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsels von *M. furfur* zu untersuchen. Mit einer wahrscheinlichen Iron-Sulfur-Einheit einer Succinatdehydrogenase wurde ein Housekeeping-Gen (*mf_sdh2*) in *M. furfur* identifiziert, das in Expressionsanalysen mit der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese assoziierter Gene genutzt werden konnte. Darüber hinaus bildet die Kenntnis seiner genomischen Sequenz die Grundlage für die Entwicklung einer ersten spezifischen Resistenzkassette auf dem Weg zur Erarbeitung eines Systems zur homologen Genrekombination für *M. furfur*.

Darüberhinaus konnten in der vorliegenden Arbeit die genomische Sequenz und der Open Reading Frame des wahrscheinlichen Schlüsselenzyms der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese von *M. furfur* identifiziert werden (*Mf_Tam1*). Das Gen zeigt eine stabile Expression in Tryptophan-Kulturen über einen Zeitraum von 2 Wochen, während es in Arginin-Kulturen nur schwach exprimiert wird. Die in Aminosäuresequenz übersetzte Sequenz zeigte eine starke Ähnlichkeit zu UM01804, dem Schlüsselenzym der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese aus *U. maydis* und zu einem hypothetischen Protein aus *M. globosa* (MGL_2601). Eine weitergehende Überprüfung der genomischen Sequenz von *M. globosa* zeigt, dass dieser möglicherweise ein Protein besitzt, welches *Mf_Tam1* noch weitaus ähnlicher ist, als das als hypothetisches Protein hinterlegte Fragment MGL_2601, und

dass überprüft werden muss, ob *M. globosa* nicht doch zur Pigmentsynthese in der Lage ist, aber die erforderlichen Bedingungen bislang nicht gefunden werden konnten.

Die Kenntnis der Gensequenz des wahrscheinlichen Schlüsselenzyms der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese trägt wesentlich zum Verständnis dieses Stoffwechselweges und zur Entschlüsselung der Pathogenese der PV bei. Der Nachweis des Zusammenhanges zwischen der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese und der Erkrankung PV könnte zudem therapeutischen Nutzen mit sich bringen. Sollte sich erweisen, dass *M. globosa* zur Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese befähigt ist, sollten sich Transkripte des Schlüsselgens in Läsionen der PV *versicolor* nachweisen lassen, und sollte eine Hemmung des Enzyms *Mf_Tam1* *in vivo* zur Besserung der Symptomatik der PV führen, wäre die kausale Beziehung zwischen Tryptophan-abhängiger Pigmentsynthese und der Erkrankung erwiesen, und die Pathogenese einer zwar harmlosen aber stigmatisierenden Erkrankung wäre aufgeklärt.

7. SUMMARY

Pityriasis versicolor (PV) is one of the most frequent skin diseases worldwide. It is characterized by the appearance of hyper- and depigmented lesions, a reduced responsiveness to ultraviolet radiation, fluorescence of the lesions under Wood-light (311nm) and a lack of inflammatory reaction despite high fungal load. The pathogenic mechanism responsible for these symptoms is not known yet.

Yeasts of the genus *Malassezia* are the causative agents of the disease. In temperate climate *M. globosa* is discussed as main agent of PV, while *M. furfur* is more frequently found on lesional skin in tropical regions. A recently described tryptophan-dependent pigment metabolism of *M. furfur* might play a role in pathogenesis of PV, as certain compounds possess biological activities providing an explanation for different symptoms of the disease. So far pigments could not be isolated from lesional skin. Furthermore, pigment production could not yet be induced in *M. globosa*.

In the present dissertation molecular tools were developed to analyze the genetics of the tryptophan-dependent pigment metabolism of *M. furfur*. A putative iron-sulfur-unit of a succinate dehydrogenase of *M. furfur* (*mf_sdh2*) was identified, which was used as a housekeeping gene in expression analysis of the pigment associated genes. In future this gene may be needed to develop a first carboxin resistance cassette specific for *M. furfur* for homologous genetic recombination.

Furthermore genetic sequence and open reading frame of the putative key enzyme of tryptophan-dependent pigment production of *M. furfur* (*Mf_Tam1*) were identified. This gene shows stable expression in tryptophan cultures over 2 weeks. In arginine culture the gene is scarcely expressed. When translated in protein sequence, a strong similarity was found to UM01804, the key enzyme of tryptophan-dependent pigment production of *U. maydis*, and to MGL_2601, a hypothetical protein of *M. globosa*. Analysis of the genomic sequence of *M. globosa* showed, that *M. globosa* may possess a gene far more similar to *Mf_Tam1* than the hypothetical protein MGL_2601, which bases on a partial mRNA sequence. Hence the question arises, whether *M. globosa* might be capable of pigment synthesis, if the effective requirements are met.

Identification of the genetic sequence of the key enzyme of tryptophan-dependent pigment synthesis is of fundamental significance for understanding the metabolic pathway and for elucidation of the pathogenesis of PV. The existence of a causal relationship between

tryptophan-dependent pigment production and the disease might promote the development of new therapy options for PV.

Future work is needed to prove such a relationship:

If pigment production could be induced in *M. globosa*, if RNA-transcripts of the key enzyme were isolated from lesions of PV and if an inhibition of the enzyme Tam1 *in vivo* led to a regression of PV symptoms, the pathogenesis of a yet harmless but stigmatizing disease would be proven.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adamson HG. Pityriasis versicolor with subsequent leucodermic patches. *Br J Dermatol Syph* 61:322, 1949.
- Allen HB, Charles CR, Johnson BL. Hyperpigmented tinea versicolor. *Arch Dermatol* 112:1110-1112, 1976.
- Aly R, Berger T. Common superficial fungal infections in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 22 Suppl 2:128-132, 1996.
- Andersson A, Rasool O, Schmidt M, Kodzius R, Fluckiger S, Zargari A, Cramer R, Scheynius A. Cloning, expression and characterization of two new IgE-binding proteins from the yeast *Malassezia sympodialis* with sequence similarities to heat shock proteins and manganese superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 271:1885-1894, 2004.
- Andersson A, Scheynius A, Rasool O. Detection of Mala f and Mala s allergen sequences within the genus *Malassezia*. *Med Mycol* 41:479-485, 2003.
- Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin Microbiol Rev* 15:21-57, 2002.
- Aspiroz C, Moreno LA, Rezusta A, Rubio C. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on human normal skin. correspondence with *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. *Mycopathologia* 145:69-74, 1999.
- Badenoch-Jones J, Summons RE, Djordjevic MA, Shine J, Letham DS, Rolfe BG. Mass spectrometric quantification of indole-3-acetic acid in *Rhizobium* culture supernatants: relation to root hair curling and nodule initiation. *Appl Environ Microbiol* 44:275-280, 1982.
- Baillon EH. *Traité de botanique médicale cryptogamique suivi du tableau*. Paris, Faculté de Médecine de Paris:234, 1889.
- Balibar CJ, Walsh CT. In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry* 45:15444-15457, 2006.
- Barchmann T, Hort W, Mayser P. Untersuchungen zur Regulation des Tryptophan-abhängigen Sekundärmetabolismus von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 48:307, 2005.
- Basse CW, Lottspeich F, Steglich W, Kahmann R. Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eur J Biochem* 242:648-656, 1996.
- Baxter M. The association of *Pityrosporum pachydermatis* with the normal external ear canal of dogs and cats. *J Small Anim Pract* 17:231-234, 1976.
- Begerow D, Bauer R, Boekhout T. Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. *Mycol Res* 104:53-60, 2000.
- Benham RW. The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale* - a lipophilic fungus. *J Invest Dermatol* 2:187-203, 1939.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- Bergbrant IM, Faergemann J. Variations of *Pityrosporum orbiculare* in middle-aged and elderly individuals. *Acta Derm Venereol* 68:537-540, 1988.

- Besnier E, Balzer F. Les dermatomycoses. *Gaz Hebdom Med Chir* 19:326, 341-328, 344, 1882.
- Biswas SK, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1191-1199, 2001.
- Bond R, Anthony RM, Dodd M, Lloyd DH. Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. *J Med Vet Mycol* 34:145-147, 1996.
- Bond R, Howell SA, Haywood PJ, Lloyd DH. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. *Vet Rec* 141:200-201, 1997.
- Borelli D, Jacobs PH, Nall L. Tinea versicolor: epidemiologic, clinical, and therapeutic aspects. *J Am Acad Dermatol* 25:300-305, 1991.
- Bouassida S, Boudaya S, Ghorbel R, Meziou TJ, Marrekchi S, Turki H, Zahaf A. Pityriasis versicolor in children: a retrospective study of 164 cases. *Ann Dermatol Venereol* 125:581-584, 1998.
- Bouknight RR, Sadoff HL. Tryptophan catabolism in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 121:70-76, 1975.
- Brandl MT, Lindow SE. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* 62:4121-4128, 1996.
- Breathnach AS, Gross M, Martin B. Freeze-fracture replication of cultured *Pityrosporum orbiculare*. *Sabouraudia* 14:105-113, 1976.
- Breathnach AS, Nazzaro-Porro M, Passi S. Azelaic acid. *Br J Dermatol* 111:115-120, 1984.
- Broomfield PL, Hargreaves JA. A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* 22:117-121, 1992.
- Brunke S, Hube B. MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. *Microbiology* 152:547-554, 2006.
- Burke RC. Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infection in human beings. *J Invest Dermatol* 36:389-402, 1961.
- Burkhart CG, Dvorak N, Stockard H. An unusual case of tinea versicolor in an immunosuppressed patient. *Cutis* 27:56-58, 1981.
- Bush JA, Long BH, Catino JJ, Bradner WT, Tomita K. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *J Antibiot (Tokyo)* 40:668-678, 1987.
- Cabanes FJ, Theelen B, Castella G, Boekhout T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res* 7:1064-1076, 2007.
- Carreno-Lopez R, Campos-Reales N, Elmerich C, Baca BE. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol Gen Genet* 264:521-530, 2000.
- Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, Hopkinson R, Ingraham J, Kaipa P, Krummenacker M, Paley S, Pick J, Rhee SY, Tissier C, Zhang P, Karp PD. MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res* 34:511-516, 2006.

- Charles CR, Sire DJ, Johnson BL, Beidler JG. Hypopigmentation in tinea versicolor: a histochemical and electronmicroscopic study. *Int J Dermatol* 12:48-58, 1973.
- Chaskes S, Frases S, Cammer M, Gerfen G, Casadevall A. Growth and pigment production on D-tryptophan medium by *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, and *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 46:255-264, 2008.
- Chen TA, Hill PB. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol* 16:4-26, 2005.
- Colabroy KL, Begley TP. Tryptophan catabolism: identification and characterization of a new degradative pathway. *J Bacteriol* 187:7866-7869, 2005.
- Conklin RJ. Common cutaneous disorders in athletes. *Sports Med* 9:100-119, 1990.
- Cotterill JA, Cunliffe WJ, Williamson B, Bulusu L. Age and sex variation in skin surface lipid composition and sebum excretion rate. *Br J Dermatol* 87:333-340, 1972.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ. Occurrence of *Malassezia spp.* in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 45:333-337, 2002a.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ. Occurrence of *Malassezia spp.* in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med Mycol* 40:115-121, 2002b.
- Crespo-Erchiga V, Florencio VD. *Malassezia* yeasts and pityriasis versicolor. *Curr Opin Infect Dis* 19:139-147, 2006.
- Cunningham AC, Ingham E, Gowland G. Humoral responses to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in normal individuals of various ages. *Br J Dermatol* 127:476-481, 1992.
- Dahms K, Kramer HJ, Thoma W, Mayser P. Tyrosinaseinhibition durch Tryptophanmetabolite von *Malassezia furfur* in humaner Epidermis. *Mycoses* 45:230, 2002.
- Daneshvar SA, Hashimoto K. An unusual presentation of tinea versicolor in an immunosuppressed patient. *J Am Acad Dermatol* 17:304-305, 1987.
- Dawson Jr. TL. *Malassezia globosa* and *restricta*: Breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 12:15-19, 2007.
- De Luca C, Picardo M, Breathnach A, Passi S. Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor. *Exp Dermatol* 5:49-56, 1996.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6025-6030, 1996.
- Dickinson JR, Salgado LE, Hewlins MJ. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278:8028-8034, 2003.
- Dodge CW. *Medical mycology*. St. Louis, Mosby, 1935.
- Dotz WI, Henrikson DM, Yu GS, Galey CI. Tinea versicolor: a light and electron microscopic study of hyperpigmented skin. *J Am Acad Dermatol* 12:37-44, 1985.
- Dutta S, Bajaj AK, Basu S, Dikshit A. Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinico-mycologic study in India. *Int J Dermatol* 41:823-824, 2002.

- Eichstedt CF. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde 853:270-271, 1846.
- el-Gothamy Z, bdel-Fattah A, Ghaly AF. Tinea versicolor hypopigmentation: histochemical and therapeutic studies. Int J Dermatol 14:510-515, 1975.
- Faergemann J. Epidemiology and ecology of pityriasis versicolor. Curr Top Med Mycol 3:153-167, 1989.
- Faergemann J, Aly R, Maibach HI. Quantitative variations in distribution of *Pityrosporum orbiculare* on clinically normal skin. Acta Derm Venereol 63:346-348, 1983.
- Faergemann J, Bernander S. Tinea versicolor and *Pityrosporum orbiculare*: a mycological investigation. Sabouraudia 17:171-179, 1979.
- Faergemann J, Bernander S. Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum* species. Sabouraudia 19:117-121, 1981.
- Faergemann J, Fredriksson T. Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. Acta Derm Venereol 60:531-533, 1980.
- Gaber RF, Copple DM, Kennedy BK, Vidal M, Bard M. The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. Mol Cell Biol 9:3447-3456, 1989.
- Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. Br J Dermatol 154:854-859, 2006.
- Galadari I, el KM, Mousa A, Hashimoto K, Mehregan AH. Tinea versicolor: histologic and ultrastructural investigation of pigmentary changes. Int J Dermatol 31:253-256, 1992.
- Gambichler T, Kramer HJ, Boms S, Skrygan M, Tomi NS, Altmeyer P, Mayser P. Quantification of ultraviolet protective effects of ptyriacitrin in humans. Arch Dermatol Res 299:517-520, 2007.
- Gandra RF, Gambale W, de Cassia Garcia SR, da Silva RL, Durigon EL, de Camargo LM, Giudice MC, Sanfilippo LF, de AJ, Paula CR. *Malassezia* spp. in acoustic meatus of bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. Mycopathologia 165:21-26, 2008.
- Gordon MA. Lipophilic yeastlike organisms associated with tinea versicolor. J Invest Dermatol 17:267-272, 1951a.
- Gordon MA. The lipophilic mycoflora of the skin. I. In vitro culture of *Pityrosporum orbiculare* n.sp. Mycologia 43:524-535, 1951b.
- Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie Van Leeuwenhoek 69:337-355, 1996.
- Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. Med Mycol 37:295-306, 1999.
- Guillot J, Gueho E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. Antonie Van Leeuwenhoek 67:297-314, 1995.
- Guillot J, Gueho E, Lesourd M. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. J Mycol Med 6:103-110, 1996.
- Gummalla S, Broadbent JR. Tryptophan Catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* Cheese Flavor Adjuncts. J Dairy Sci 82:2070-2077, 1999.

- Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL, Jr. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 51:785-798, 2004.
- Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Faergemann J. Pityriasis versicolor. *Dermatol Clin* 21:413-429, 2003.
- Gupta AK, Bluhm R, Summerbell R. Pityriasis versicolor. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16:19-33, 2002.
- Gupta AK, Kohli Y, Li A, Faergemann J, Summerbell RC. In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br J Dermatol* 142:758-765, 2000.
- Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 240:90-97, 1996.
- Gustafson BA. The occurrence of yeasts belonging to genus *Pityrosporum* in different kinds of animals. *Acta Pathol Microbiol Scand* 48:51-55, 1960.
- Hafez M, el-Shamy S. Genetic susceptibility in pityriasis versicolor. *Dermatologica* 171:86-88, 1985.
- Hashim FA, Elhassan AM. Tinea versicolor and visceral leishmaniasis. *Int J Dermatol* 33:258-259, 1994.
- Hay RJ, Roberts SOB, Mackenzie DWR. Pityriasis versicolor. In: *Textbook of Dermatology* (Hrsg : Champion, RH, Burton, JL, Elbing, FJG), Vol 2, Oxford, Blackwell:1286-1290, 1998.
- Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJ, Pronk JT, Dickinson JR. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74:2259-2266, 2008.
- Heinzelmann E, Kienzlen G, Kaspar S, Recktenwald J, Wohlleben W, Schwartz D. The phosphinomethylmalate isomerase gene pmi, encoding an aconitase-like enzyme, is involved in the synthesis of phosphinothricin tripeptide in *Streptomyces viridochromogenes*. *Appl Environ Microbiol* 67:3603-3609, 2001.
- Herrmann KM. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* 7:907-919, 1995.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Thorsten LH, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111:509-547, 2007.
- Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:623-627, 2004.

- Ho EC, Cahill MJ, Saville BJ. Gene discovery and transcript analyses in the corn smut pathogen *Ustilago maydis*: expressed sequence tag and genome sequence comparison. *BMC Genomics* 8:334, 2007.
- Hofmann A. LSD - mein Sorgenkind. Die Entdeckung einer „Wunderdroge“. Stuttgart, Klett-Cotta, 1979.
- Honda Y, Matsuyama T, Irie T, Watanabe T, Kuwahara M. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr Genet* 37:209-212, 2000.
- Hort W, Lang S, Brunke S, Mayser P, Hube B. Analysis of differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *M. furfur* by cDNA subtraction technology. *Med Mycol*:1-11, 2008.
- Hu G, Kamp A, Linning R, Naik S, Bakkeren G. Complementation of *Ustilago maydis* MAPK mutants by a wheat leaf rust, *Puccinia triticina* homolog: potential for functional analyses of rust genes. *Mol Plant Microbe Interact* 20:637-647, 2007.
- Idnurm A, Howlett BJ. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). *Eukaryot Cell* 1:719-724, 2002.
- Iraqui I, Vissers S, Andre B, Urrestarazu A. Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:3360-3371, 1999.
- Irlinger B. Strukturaufklärung, Biosynthese und Synthese von Sekundärmetaboliten aus Kulturen von *Malassezia furfur*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002.
- Irlinger B, Kramer HJ, Mayser P, Steglich W. Pityriarubins, biologically active bis(indolyl)spirans from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Angew Chem Int Ed Engl* 43:1098-1100, 2004.
- Jeliffe DB, Jacobson FW. The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. *J Trop Med Hyg* 57:290-293, 1954.
- Jung EG, Bohnert E. Mechanism of depigmentation in pityriasis versicolor alba. *Arch Dermatol Res* 256:333-334, 1976.
- Kamper J, Kahmann R, Bolker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Muller O, Perlin MH, Wosten HA, de VR, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Snetselaar K, McCann M, Perez-Martin J, Feldbrugge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, Gonzalez-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho EC, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Hauser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Guldener U, Munsterkotter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444:97-101, 2006.
- Kano R, Aizawa T, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A. Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species. *Microbiol Immunol* 43:813-815, 1999.
- Kaper JM, Veldstra H. On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim Biophys Acta* 30:401-420, 1958.

- Karaoui R, Bou-Resli M, Al-Zaid NS, Mousa A. Tinea versicolor: ultrastructural studies on hypopigmented and hyperpigmented skin. *Dermatologica* 162:69-85, 1981.
- Keddie FM. Electron microscopy of *Malassezia furfur* in tinea versicolor. *Sabouraudia* 5:134-137, 1966.
- Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3:937-947, 2005.
- Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE. Sterol 22-desaturase, cytochrome P45061, possesses activity in xenobiotic metabolism. *FEBS Lett* 412:233-235, 1997.
- Khimani AH, Mhashilkar AM, Mikulskis A, O'Malley M, Liao J, Golenko EE, Mayer P, Chada S, Killian JB, Lott ST. Housekeeping genes in cancer: normalization of array data. *Biotechniques* 38:739-745, 2005.
- King RD, Cunico RL, Maibach HI, Greenberg JH, West ML, Jeppsen JC. The effect of occlusion on carbon dioxide emission from human skin. *Acta Derm Venereol* 58:135-138, 1978.
- Kistiakovsky EV. Pityriasis versicolor and ultraviolet rays. *Arch Derm Syph* 15:685-689, 1927.
- Krämer HJ, Dahms K, Podobinska M, Bartsch A, Steglich W, Mayser P. Tryptophan-Stoffwechsel von *Malassezia furfur*: Störung der Pigmentbildung der Haut durch Apoptose von Melanozyten und Tyrosinase-Inhibition. *Mycoses* 47:363, 2004.
- Krämer HJ, Kessler D, Hipler UC, Irlinger B, Hort W, Bodeker RH, Steglich W, Mayser P. Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bisindolylmaleimide arcyriarubin A. *Chembiochem* 6:2290-2297, 2005a.
- Krämer HJ, Podobinska M, Bartsch A, Battmann A, Thoma W, Bernd A, Kummer W, Irlinger B, Steglich W, Mayser P. Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem* 6:860-865, 2005b.
- Krisanty RI, Bramono K, Made W, I. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor in Indonesia and its relationship with clinical characteristics. *Mycoses*, 52:257-262, 2008.
- Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, Begley TP. NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem Biol* 10:1195-1204, 2003a.
- Kurnasov O, Jablonski L, Polanuyer B, Dorrestein P, Begley T, Osterman A. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol Lett* 227:219-227, 2003b.
- Kutchan TM. Alkaloid biosynthesis - the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* 7:1059-1070, 1995.
- Labows JN, McGinley KJ, Leyden JJ, Webster GF. Characteristic gamma-lactone odor production of the genus *Pityrosporum*. *Appl Environ Microbiol* 38:412-415, 1979.
- Larangeira de Almeida HJr, Mayser P. Absence of sunburn in lesions of pityriasis versicolor alba. *Mycoses* 49:516, 2006.

- Laurie JD, Linning R, Bakkeren G. Hallmarks of RNA silencing are found in the smut fungus *Ustilago hordei* but not in its close relative *Ustilago maydis*. *Curr Genet* 53:49-58, 2008.
- Leeming JP, Notman FH, Holland KT. The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. *J Appl Bacteriol* 67:47-52, 1989.
- Limacher A, Glaser AG, Meier C, Schmid-Grendelmeier P, Zeller S, Scapozza L, Cramer R. Cross-reactivity and 1.4-A crystal structure of *Malassezia sympodialis* thioredoxin (Mala s 13), a member of a new pan-allergen family. *J Immunol* 178:389-396, 2007.
- Lindborg M, Magnusson CG, Zargari A, Schmidt M, Scheynius A, Cramer R, Whitley P. Selective cloning of allergens from the skin colonizing yeast *Malassezia furfur* by phage surface display technology. *J Invest Dermatol* 113:156-161, 1999.
- Lisowski P, Pierzchala M, Goscik J, Pareek CS, Zwierzchowski L. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid. *J Appl Genet* 49:367-372, 2008.
- Lockshin NA. Tinea versicolor masquerading as vitiligo. *Cutis* 12:245-247, 1973.
- Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA, Allen JE, Bosdet IE, Brent MR, Chiu R, Doering TL, Donlin MJ, D'Souza CA, Fox DS, Grinberg V, Fu J, Fukushima M, Haas BJ, Huang JC, Janbon G, Jones SJ, Koo HL, Krzywinski MI, Kwon-Chung JK, Lengeler KB, Maiti R, Marra MA, Marra RE, Mathewson CA, Mitchell TG, Pertea M, Riggs FR, Salzberg SL, Schein JE, Shvartsbeyn A, Shin H, Shumway M, Specht CA, Suh BB, Tenney A, Utterback TR, Wickes BL, Wortman JR, Wye NH, Kronstad JW, Lodge JK, Heitman J, Davis RW, Fraser CM, Hyman RW. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307:1321-1324, 2005.
- Macheroux P, Schmid J, Amrhein N, Schaller A. A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta* 207:325-334, 1999.
- Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Med Microbiol* 49:29-35, 2000.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, Weese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 33:D192-D196, 2005.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, Weese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Tasneem A, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Bryant SH. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37:D205-D210, 2009.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, Weese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 35:D237-D240, 2007.

- Marples MJ. The incidence of certain skin diseases in western Samoa: a preliminary survey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 44:319-332, 1950.
- Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas spp.* biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol* 44:417-445, 2006.
- Mayer PK. Tryptophan-abhängige Pigmentsynthese bei Brandpilzen. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen, 2007.
- Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gruender K, Gueho E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol* 137:208-213, 1997a.
- Mayser P, Haze P, Pickel M. Polidocanol sensitivity--a possible tool in the differentiation of *Malassezia spp.* *Mycoses* 40:391-395, 1997b.
- Mayser P, Imkamp A, Winkeler M, Papavassilis C. Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 290:277-282, 1998a.
- Mayser P, Lang SK, Hort W. Pathogenicity of *Malassezia* yeasts. In: *The Mycota* (Hrsg : Esser,K), Vol VI, Springer, Berlin:115-151, 2008.
- Mayser P, Pape B. Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophan derivatives. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:315-319, 1998.
- Mayser P, Schafer U, Krämer HJ, Irlinger B, Steglich W. Pityriacitrin -- an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 294:131-134, 2002.
- Mayser P, Tows A, Krämer HJ, Weiss R. Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains. *Mycoses* 47: 34-39, 2004.
- Mayser P, Wenzel M, Krämer HJ, Kindler BL, Spiteller P, Haase G. Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Med Mycol* 45:519-524, 2007.
- Mayser P, Wille G, Imkamp A, Thoma W, Arnold N, Monsees T. Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* 41:265-271, 1998b.
- McDaniel WE. Tinea versicolor. *Arch Dermatol* 113:519-520, 1977.
- McGinley KJ, Lantis LR, Marples RR. Microbiology of tinea versicolor. *Arch Dermatol* 102:168-171, 1970.
- Mewes HW, Frishman D, Gruber C, Geier B, Haase D, Kaps A, Lemcke K, Mannhaupt G, Pfeiffer F, Schuller C, Stocker S, Weil B. MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res* 28:37-40, 2000.
- Miozzari G, Niederberger P, Hutter R. Tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: control of the flux through the pathway. *J Bacteriol* 134:48-59, 1978.
- Miranda KC, de Araujo CR, Soares AJ, de Aquino LJ, Souza LK, do Rosario Rodrigues SM. Identification of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Goiania-GO. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:582-583, 2006.
- Mittag H. Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. *Mycoses* 38:13-21, 1995.
- Morell H, Clark MJ, Knowles PF, Sprinson DB. The enzymic synthesis of chorismic and prephenic acids from 3-enolpyruvylshikimic acid 5-phosphate. *J Biol Chem* 242:82-90, 1967.

- Moynahan EJ. Pityriasis versicolor alba (speckled torso syndrome) and Mediterranean holidays. *Lancet* 1:471-472, 1976.
- Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* 38:337-341, 2000.
- Nazzaro-Porro M, Passi S. Identification of tyrosinase inhibitors in cultures of *Pityrosporum*. *J Invest Dermatol* 71:205-208, 1978.
- Nazzaro-Porro M, Passi S, Caprilli F, Mercantini R. Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J Invest Dermatol* 69:531-534, 1977.
- Nies SM. Tryptophanabhängige Synthese von indolhaltigen Pigmenten bei verschiedenen humanpathogenen Asco- und Basidiomyceten. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen, 2006.
- Nishizawa T, Gruschow S, Jayamaha DH, Nishizawa-Harada C, Sherman DH. Enzymatic assembly of the bis-indole core of rebeccamycin. *J Am Chem Soc* 128:724-725, 2006.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Biochem J* 229:281-286, 1985.
- Olumide YM, Odunowo BD, Odiase AO. Depigmentation in black African patients. *Int J Dermatol* 29:166-174, 1990.
- Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, Takahashi Y, Masuma R. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 30:275-282, 1977.
- Onaka H, Taniguchi S, Igarashi Y, Furumai T. Characterization of the biosynthetic gene cluster of rebeccamycin from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:127-138, 2003.
- Onishi Y, Kuroda M, Yasueda H, Saito A, Sono-Koyama E, Tunasawa S, Hashida-Okado T, Yagihara T, Uchida K, Yamaguchi H, Akiyama K, Kato I, Takesako K. Two-dimensional electrophoresis of *Malassezia* allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f 4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 261:148-154, 1999.
- Oxford GS, Gillespie RG. Evolution and ecology of spider coloration. *Annu Rev Entomol* 43:619-643, 1998.
- Panozzo C, Nawara M, Suski C, Kucharczyka R, Skoneczny M, Becam AM, Rytka J, Herbert CJ. Aerobic and anaerobic NAD⁺ metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 517:97-102, 2002.
- Pardo-Castello V. *Achromia parasitaria*. *Arch Derm Syph* 25:785-789, 1932.
- Paris CG, Magasanik B. Tryptophan metabolism in *Klebsiella aerogenes*: regulation of the utilization of aromatic amino acids as sources of nitrogen. *J Bacteriol* 145:257-265, 1981.
- Paulino LC, Tseng CH, Blaser MJ. Analysis of *Malassezia* microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions by multiplex real-time PCR. *FEMS Yeast Res* 8:460-471, 2008.
- Pedras MS, Okanga FI, Zaharia IL, Khan AQ. Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* 53:161-176, 2000.

- Pikielny CW, Rosbash M. mRNA splicing efficiency in yeast and the contribution of nonconserved sequences. *Cell* 41:119-126, 1985.
- Pohl M, Lingen B, Muller M. Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: new aspects of asymmetric C-C bond formation. *Chemistry* 8:5288-5295, 2002.
- Porro MN, Passi S, Caprill F, Nazzaro P, Morpurgo G. Growth requirements and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. *J Invest Dermatol* 66:178-182, 1976.
- Raabe P, Mayser P, Weiss R. Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycoses* 41:493-500, 1998.
- Radwanski ER, Last RL. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7:921-934, 1995.
- Rasool O, Zargari A, Almqvist J, Eshaghi H, Whitley P, Scheynius A. Cloning, characterization and expression of complete coding sequences of three IgE binding *Malassezia furfur* allergens, Mal f 7, Mal f 8 and Mal f 9. *Eur J Biochem* 267:4355-4361, 2000.
- Roberts SO. *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. *Br J Dermatol* 81:264-269, 1969.
- Robins EJ, Breathnach AS, Bennett D, Ward BJ, Bhasin Y, Ethridge L, Nazzaro-Porro M, Passi S, Picardo M. Ultrastructural observations on the effect of azelaic acid on normal human melanocytes and a human melanoma cell line in tissue culture. *Br J Dermatol* 113:687-697, 1985.
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Guldener U, Mannhaupt G, Munsterkottler M, Mewes HW. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* 32:5539-5545, 2004.
- Ruete A. Pityriasis versicolor. In: Jadassohns Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg : Jadassohns, J), Bd 11, Berlin, Springer Verlag:696-710, 1928.
- Ruete A. Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor. *Dermatol Wochenschr* 96:333-336, 1933.
- Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Holland KT, Ingham E. Production of the mycelial phase of *Malassezia* in vitro. *Med Mycol* 39:487-493, 2001.
- Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- Sanchez C, Butovich IA, Brana AF, Rohr J, Mendez C, Salas JA. The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem Biol* 9:519-531, 2002.
- Sanchez C, Zhu L, Brana AF, Salas AP, Rohr J, Mendez C, Salas JA. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:461-466, 2005.
- Sandstrom Falk MH, Tengvall LM, Johansson C, Bartosik J, Back O, Sarnhult T, Wahlgren CF, Scheynius A, Faergemann J. The prevalence of *Malassezia* yeasts in patients with atopic dermatitis, seborrhoeic dermatitis and healthy controls. *Acta Derm Venereol* 85:17-23, 2005.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467, 1977.

- Schering PE. Tryptophan-abhängige Pigmentbildung bei *Ustilago maydis* sowie der Mutante UV31 im Vergleich zu *Malassezia furfur*. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen, 2007.
- Schmidt M, Zargari A, Holt P, Lindbom L, Hellman U, Whitley P, van dP, I, Harfast B, Scheynius A. The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of *Malassezia furfur*, Mal f 1. Eur J Biochem 246:181-185, 1997.
- Shifrine M, Marr AG. The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*. J Gen Microbiol 32:263-270, 1963.
- Simmons RB, Ahearn DG. Cell wall ultrastructure and diazonium blue b reaction of *Sporopachydermia quercuum*, *Bullera tsugae*, and *Malassezia* spp. Mycologia 79:38-43, 1987.
- Simmons RB, Gueho E. A new species of *Malassezia*. Mycol Res 94:1146-1149, 1990.
- Skinner W, Bailey A, Renwick A, Keon J, Gurr S, Hargreaves J. A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. Curr Genet 34:393-398, 1998.
- Sloof WCh. Genus *Pityrosporum* Sabouraud. In: The Yeast - a Taxonomic Study (Hrsg : Lodder, J) Vol 2, Amsterdam, North-Holland Publishing Company:1167-1186, 1970.
- Sohnle PG, Collins-Lech C. Cell-mediated immunity to *Pityrosporum orbiculare* in tinea versicolor. J Clin Invest 62:45-53, 1978.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503-517, 1975.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Rev 31:425-448, 2007.
- Spingola M, Grate L, Haussler D, Ares M, Jr. Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA 5:221-234, 1999.
- Stein DH. Superficial fungal infections. Pediatr Clin North Am 30:545-561, 1983.
- Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. Microbiol Immunol 48:579-583, 2004.
- Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J Clin Microbiol 41:4695-4699, 2003.
- Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. J Clin Microbiol 40:1363-1367, 2002.
- Sunenshine PJ, Schwartz RA, Janniger CK. Tinea versicolor. Int J Dermatol 37:648-655, 1998.
- Swift JA, Dunbar SF. Ultrastructure of *Pityrosporum ovale* and *Pityrosporum canis*. Nature 206:1174-1175, 1965.
- Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, Zomorodian K, Saadat F, Zeraati H, Hallaji Z, Rezaie S. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. BMC Dermatol 4:5, 2004.

- Thoma W. Tryptophanstoffwechsel von *Malassezia furfur*: Isolierung des ersten Metaboliten Malassezin. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Giessen, 2003.
- Thoma W, Krämer HJ, Mayser P. Pityriasis versicolor alba. J Eur Acad Dermatol Venereol 19:147-152, 2005.
- Thompson E, Colvin JR. Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani and Chalmers. Can J Microbiol 16:263-265, 1970.
- Van Abbé NJ. The Investigation of Dandruff. J Soc Cosmet Chem 15:609-630, 1964.
- Viollier PH, Minas W, Dale GE, Folcher M, Thompson CJ. Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. J Bacteriol 183:3184-3192, 2001a.
- Viollier PH, Nguyen KT, Minas W, Folcher M, Dale GE, Thompson CJ. Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol 183:3193-3203, 2001b.
- Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci U S A 76:615-619, 1979.
- von Gudden B. Beitrag zur Lehre von den durch Parasiten bedingten Hautkrankheiten. II. Pityriasis versicolor. In: Archiv für physiologische Heilkunde (Hrsg : Vierordt, K), Bd 12, Stuttgart: Ebner & Seubert:496-505, 1853.
- Watson S, Mercier S, Bye C, Wilkinson J, Cunningham AL, Harman AN. Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses. Virol J 4:130, 2007.
- Wertheim L. Über Lichtwirkung und Leukoderma bei Pityriasis versicolor. Derm Zeitschrift 38:343-354, 1928.
- Wilde PF, Stewart PS. A study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*. Biochem J 108:225-231, 1968.
- Willan R. Description and treatment of the cutaneous diseases. Order II. Scaly diseases of the skin. London, Johnson, 1801.
- Wirsel S, Voegelé R, Bänninger R, Mendgen K. Cloning of *b*-tubulin and succinate dehydrogenase genes from *Uromyces fabae* and establishing selection conditions for their use in transformation. Eur J Plant Path 110:767-777, 2004.
- Wroblewski N, Bar S, Mayser P. Missing granulocytic infiltrate in pityriasis versicolor-- indication of specific anti-inflammatory activity of the pathogen? Mycoses 48 Suppl 1:66-71, 2005.
- Xu J, Saunders CW, Hu P, Grant RA, Boekhout T, Kuramae EE, Kronstad JW, Deangelis YM, Reeder NL, Johnstone KR, Leland M, Fieno AM, Begley WM, Sun Y, Lacey MP, Chaudhary T, Keough T, Chu L, Sears R, Yuan B, Dawson TL, Jr. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 104:18730-18735, 2007.
- Yasueda H, Hashida-Okado T, Saito A, Uchida K, Kuroda M, Onishi Y, Takahashi K, Yamaguchi H, Takesako K, Akiyama K. Identification and cloning of two novel allergens from the lipophilic yeast, *Malassezia furfur*. Biochem Biophys Res Commun 248:240-244, 1998.

Zuther K, Mayser P, Hettwer U, Wu W, Spiteller P, Kindler BL, Karlovsky P, Basse CW, Schirawski J. The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol 68:152-172, 2008.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. P. Mayser für die Überlassung dieses überaus spannenden Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die beständige, freundliche Unterstützung. Seine enorme Begeisterung für die Mykologie, im besonderen für die Erforschung der *Malassezia*-Hefen, und sein Ideenreichtum haben die Arbeit an dieser Dissertation sehr bereichert und mir die Forschungsarbeit nahe gebracht.

Bei Frau Dr. med. W. Hort bedanke ich mich für die hervorragende und zuverlässige Betreuung und die anregenden Diskussionen und Denkanstöße. Auch bei ihr hat mich die stete, bedingungslose Begeisterung für die Forschung trotz gelegentlichen Zeitmangels und manchmal erschwerten Bedingungen wirklich sehr beeindruckt.

Ganz herzlich danke ich Frau Förste für ihre Hilfe bei Fragen zur Pilzzucht und ihre freundliche, ruhige Art.

Frau Netsch danke ich für die Fortführung der hier begonnenen Arbeiten, insbesondere der Überexpression und Isolation des Enzyms Mf_Tam1 – ich bin ja so gespannt!

Meinen Mitdoktorandinnen und –doktoranden und allen Mitarbeitern danke ich für die schöne Zeit im Labor mit viel Kaffee und regem Gedankenaustausch. Es hat mir viel Spaß gemacht.

Ich danke meinen Eltern von ganzem Herzen für ihre bedingungslose Unterstützung, ihren Zuspruch und für alles, was sie mir ermöglicht haben.

Chris, Dir danke ich dafür, dass Du während der ganzen Zeit an meiner Seite warst und mich ermutigt und bestärkt hast und mir den Rücken frei gehalten hast, und dafür, dass Du für mich da bist, wenn ich Dich brauche.

Clemens danke ich dafür, dass es ihn gibt.

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen, wofür ich mich sehr bedanke.