

# Isolierung und Charakterisierung von Vesikeln aus dem Spitzenkörper von *Aspergillus nidulans* und deren Einsatz in der Nanobiologie

---

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

vorgelegte

DISSERTATION

von

Jan Siebenbrock

aus

Mönchengladbach

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2011

---

There's Plenty of Room at the Bottom.

(Richard P. Feynman, 1959)

## Inhalt

Zusammenfassung .....	5
Abkürzungen .....	7
Einleitung .....	8
Ein außergewöhnlicher Modellorganismus: <i>Aspergillus nidulans</i> .....	8
Da bewegt sich was! Zytoskelett und Motorproteine von <i>A. nidulans</i> .....	11
Der Spitzenkörper und polares Wachstum.....	17
Polares Wachstum und Motoren.....	20
Von Mikro zu Nano: Nanobiologie und molekulare Motoren .....	21
Vesikel im Spitzenkörper.....	22
Ein <i>in vitro</i> Transportsystem im Nanomaßstab.....	22
Ziele dieser Arbeit .....	25
Ergebnisse .....	26
Polares Wachstum in <i>A. nidulans</i> .....	26
Identifizierung neuer Proteine im Spitzenkörper .....	26
Markierung neuer Proteine.....	26
Ein nanoskaliges Transportsystem entsteht .....	31
Etablierung der Tubulinisolierung.....	31
Etablierung der Mikrotubulipolymerisierung .....	32
Test der Kinesinkonstrukte und der Mikrotubuli im Gliding Assay.....	32
Etablierung der Vesikelisolierung.....	33
Verschiedene Vesikel in künstlichen Transportsystemen.....	37
Elektronenmikroskopie .....	41
Diskussion.....	44
Isolierung und Charakterisierung sekretorischer Vesikel .....	44
Sekretion in <i>A. nidulans</i> und anderen filamentösen Pilzen .....	44
Identifizierung und Markierung neuer Proteine im Spitzenkörper.....	46
Ein Transportsystem aus pilzlichen Bestandteilen.....	47
Bestandteile des Transportsystems: Tubulin .....	48
Aufbau der Straßen: Polymerisierung des Tubulins.....	49
Test der Komponenten: <i>Gliding Assay</i> .....	50
Etablierung der Vesikelisolierung.....	50
Artifizielle und natürliche Vesikel .....	51
Elektronenmikroskopie .....	52
Material und Methoden.....	53

Chemikalien und Materialien .....	53
Organismen und mikrobiologische Methoden .....	53
Organismen und Stämme .....	53
Kultivierung von <i>A. nidulans</i> und <i>E. coli</i> .....	54
Induktion des <i>alcA</i> -Promotors .....	56
Molekularbiologische Methoden .....	57
DNA .....	57
Gelelektrophorese, DNA-Isolierung und –Ligation .....	58
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierung von PCR-Produkten.....	59
Transformation .....	60
Mikroskopische Methoden .....	61
Präparation von <i>A. nidulans</i> für die Mikroskopie .....	61
Epifluoreszenzmikroskopie .....	62
Elektronenmikroskopie .....	62
Biochemische Methoden .....	63
Proteinkonzentrationsbestimmung .....	63
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	64
Coomassie-Färbung von Proteingelen .....	65
Western-Blot-Analyse und Immundetektion von Proteinen .....	65
Dot-Blot .....	66
Zellaufschluss und Vesikelisolierung.....	67
Isolierung von Tubulin aus Schweinehirn .....	68
Fluoreszenz-Markierung von Tubulin .....	71
Photometrische Beobachtung der Mikrotubuli-Polymerisation.....	73
Herstellung Taxol-stabiler Mikrotubuli .....	74
Bewegung der Mikrotubuli auf einem Objektträger.....	74
Transport von Vesikeln oder Latex-Kügelchen durch Mikrotubuli .....	75
Literaturverzeichnis.....	76
Anhang .....	88
Lebenslauf und Veröffentlichungen.....	88
Dank .....	90

## Zusammenfassung

In filamentösen Pilzen wird das Mikrotubuli-Zytoskelett für den Langstreckentransport der sekretorischen Vesikel genutzt. Die sekretorischen Vesikel enthalten die Proteine, die zur Verlängerung der Hyphe nötig sind. Der filamentöse Ascomycet *Aspergillus nidulans* besitzt eine Zellwand, deren struktur- und formgebendes Element, wie bei allen anderen filamentösen Pilzen auch, das Chitin darstellt. Chitin wird durch das Enzym Chitin-Synthase aus GlcNAc-Untereinheiten synthetisiert. Damit es lediglich am apikalen, wachsenden Ende der Hyphe zu einer Synthese von Chitin kommt, wird die Chitin-Synthase, wie andere sekretorische Enzyme auch, in Vesikeln zu ihrem Bestimmungsort geliefert. Das Enzym wird am Golgi-Apparat in Vesikel, die Chitosomen, verpackt und in diesen zum Spitzenkörper transportiert. Der Spitzenkörper ist ein Organell von *A. nidulans*, das aus einer Ansammlung von Makro- und Mikrovesikeln besteht und im apikalen Ende der Hyphe lokalisiert ist. Im Phasenkontrastmikroskop ist der Spitzenkörper als Struktur sichtbar. Neben der Chitin-Synthase werden im Spitzenkörper und damit im Zentrum des Wachstums von *A. nidulans* noch eine ganze Reihe anderer Enzyme und Proteine benötigt. Auch diese werden in Vesikel verpackt und so über das Zytoskelett in den Spitzenkörper transportiert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Protokoll zur Isolierung von Spitzenkörperorganellen entwickelt und verbessert. Die benötigten Enzyme und Proteine werden in Vesikeln verpackt und durch spezifische Motorproteine, wie Kinesine, zum Spitzenkörper transportiert. Kinesine können direkt oder über spezifische Linker-Proteine an die Vesikel gebunden sein und diese somit als Cargo über Mikrotubuli zum Spitzenkörper transportieren, wo vermutlich Myosine den Transport über das Aktin-Netzwerk zur Zellwand übernehmen. Ausgehend von Chitosomen, die bisher in vielen unterschiedlichen filamentösen Pilzen, allerdings nicht in *A. nidulans*, nachgewiesen werden konnten, wurde im Rahmen dieser Dissertation gezeigt, dass verschiedene Motorproteine mit den Chitosomen assoziiert sind und daher am Transport dieser Vesikel beteiligt sein könnten. Ein weiterführendes Screening mittels MALDI-TOF lieferte eine Vielzahl weiterer Proteine, die ebenfalls in den Spitzenkörper transportiert werden und somit am Wachstum von *A. nidulans* beteiligt sein könnten. Die neu entdeckten Proteine können also zukünftig als Spitzenkörpermarker eingesetzt werden. Von diesen neu entdeckten Proteinen wurde die Endoglukanase im Rahmen dieser Arbeit in *A. nidulans* näher charakterisiert.

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit wurden die isolierten Proteine in einem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Transportsystem *in vitro* eingesetzt. Dieses System besteht aus fixierten Mikrotubuli, zu denen die jeweiligen Proteine sowie ATP hinzugegeben werden. Tubulin wurde

dazu aus Schweinehirn isoliert und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Anschließend konnte es polymerisiert und auf einer Oberfläche, wie zum Beispiel einem Objektträger, fixiert werden. Nach Zugabe der Proteine und ATP konnte eine Bewegung von Fluoreszenzsignalen entlang der Mikrotubuli beobachtet werden. Um dieses System für eine technische Anwendung zu etablieren, wurden an Stelle der isolierten Spitzenkörperproteine fluoreszierende Latex-Kügelchen oder Quantum Dots eingesetzt, die mit verschiedenen Kinesinen beschichtet wurden und so über die Mikrotubuli transportiert werden konnten. Um einen zielgerichteten Transport zu ermöglichen, wurden mittels *Dip Pen Nanolithography* „Straßen“ auf einer Glasoberfläche erzeugt, die aus Phospholipiden mit angehängter Nickel-NTA bestanden. An die Nickel-NTA konnten Kinesine durch einen Hexa-Histidin-Anhang gebunden und über diese „Straßen“ eine Bewegung der Mikrotubuli beobachtet werden. Wurden statt funktionsfähigen Kinesinen Motorproteine verwendet, die eine Rigormutation besitzen, d. h. nicht in der Lage sind, ATP zu hydrolysieren, konnten die Mikrotubuli auch als fixierte Straßen aufgebracht werden. Mit der DPN konnten die Kinesine oder auch Antikörper gegen Tubulin direkt auf den Objektträger aufgetragen werden.

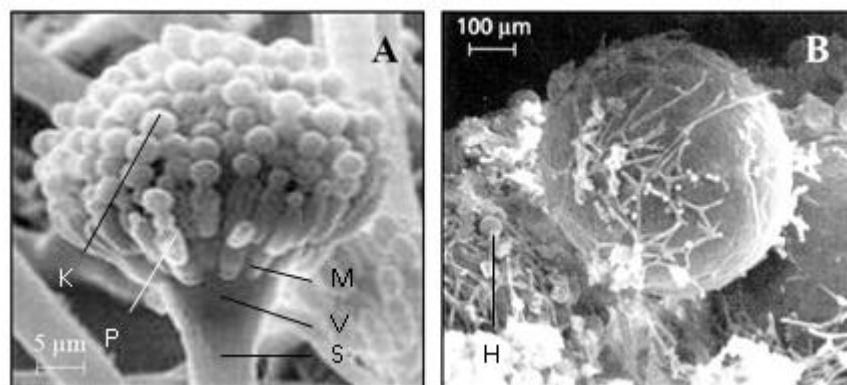
## Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop ( <i>Atomic Force Microscope</i> )
BME	$\beta$ -Mercaptoethanol
CAT	Katalase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	Oleoylglycerophosphocholine
DPN	<i>Dip Pen Nanolithography</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GlcNAc	n-Acetyl-glucosamin
GOD	Glukose-Oxidase
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> - zentrales Institut für Datenverarbeitung und Datenspeicherung in der Molekularbiologie
NTA	Nitrilotriessigsäure
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

## Einleitung

### Ein außergewöhnlicher Modellorganismus: *Aspergillus nidulans*

Die *Aspergillen* sind eine über 350 Arten umfassende Gruppe von Schimmelpilzen. Der filamentös wachsende Ascomycet *Aspergillus nidulans* wurde zuerst 1729 durch den florentinischen Priester und Begründer der Mykologie Pier Antonio Micheli beschrieben (Micheli, 1729). Die Form der Konidien des Pilzes erinnerte den Priester – unter einem Mikroskop betrachtet – an einen Aspergill genannten Weihwasserwedel (siehe Abb. 1).

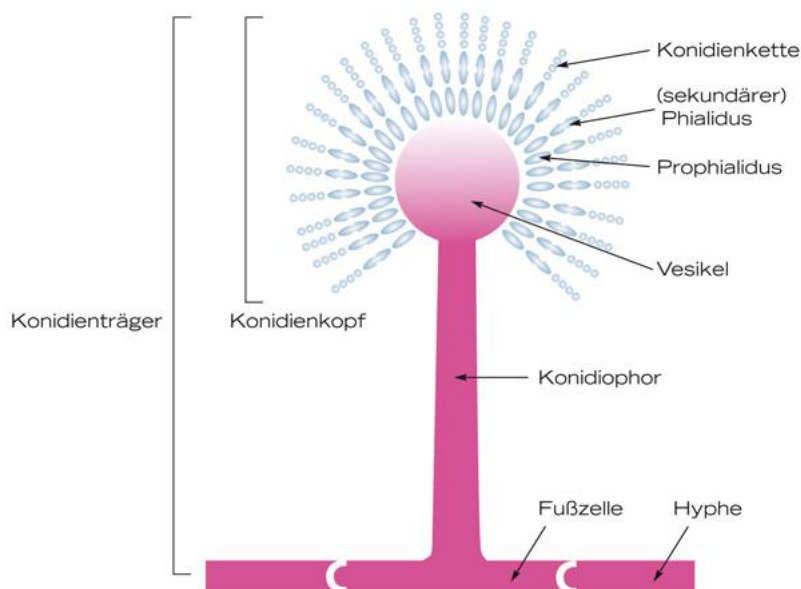


**Abbildung 1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Konidiophors und eines Kleistotheziums von *A. nidulans*. (A) Konidiophor, deutlich untergliedert in Stielchen (S) und Vesikel (V). Auf dem Vesikel sitzen die Metulae (M), auf denen wiederum die Phialiden (P) mit langen Ketten aus Konidiosporen (K) aufsitzen. (B) Ein reifes Kleistothezium, umgeben von einigen Hüllezzellen. Aus (Krüger *et al.*, 1997).

Michelis gab der Gattung daher den Namen *Aspergillus*. Auch der gelegentlich verwendete deutsche Name „Gießkannenschimmel“ ist in der Morphologie des Ascomyceten begründet, sieht er doch einer Gießkanne, aus der gerade Wasser austritt, nicht unähnlich. Die *Aspergillen* sind weltweit verbreitete Saprobionten, die hauptsächlich in toter, sich zersetzender organischer Substanz leben und einen nicht unerheblichen Anteil am Stoffkreislauf im Ökosystem der Erde haben. Unter ihnen gibt es auch einige Krankheitserreger, die den Menschen, verschiedene Tiere oder Pflanzen befallen können. *Aspergillen* haben einen pleomorphen Entwicklungszyklus, das heißt, sie verfügen sowohl über eine sexuelle, als auch über eine asexuelle Form. Es lassen sich also teleomorphe und anamorphe Formen voneinander abgrenzen. Bei vielen Arten ist bisher unbekannt, ob sie sich ausschließlich asexuell vermehren oder ob die Phase der sexuellen Vermehrung bisher lediglich unentdeckt ist. Diese Arten von Pilzen werden auch Fungi imperfecti genannt. Nur die asexuellen Formen werden als *Aspergillus* bezeichnet.



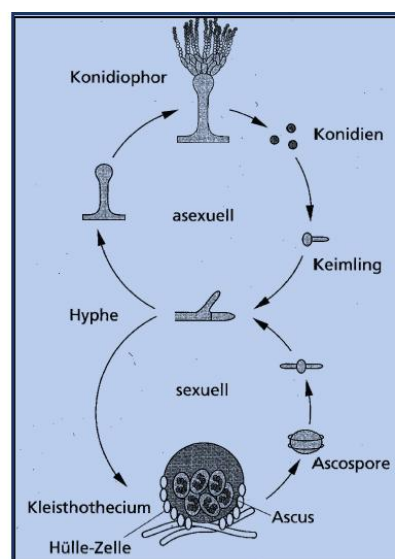
*Aspergillen* kommen ubiquitär vor und begegnen uns daher im täglichen Leben auf Schritt und Tritt. In Krankenhäusern sind beispielsweise pathogene *Aspergillen* ein großes Problem, wurden sie doch als Hauptverursacher von Mykosen identifiziert. Hier ist besonders *A. fumigatus* zu nennen (Richardson and Kokki, 1999). Auch *A. flavus* richtet großen Schaden an, da er, neben vielen anderen *Aspergillus*-Arten, die Fähigkeit zur Bildung von Aflatoxinen besitzt. Diese Aflatoxine sind für den Menschen kanzerogen oder je nach Dosis sogar tödlich und machen jährlich eine große Menge Nüsse, Mohn und Getreide unbrauchbar (Sage *et al.*, 2002). Doch auch die große, positive wirtschaftliche Bedeutung der Gattung *Aspergillus* sollte nicht unterschätzt werden, da bestimmte *Aspergillus*-Arten doch zur biotechnologischen Produktion von Zitronen- und Glukonsäure, sowie von Penicillin und  $\alpha$ -Amylasen genutzt werden (Abe *et al.*, 2006).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Konidiophors von *A. nidulans*.** Der Konidiophor ist der Konidienträger in *A. nidulans*. Der eigentliche Konidiophor wird auch als Stielchen bezeichnet und trägt an einem Ende das Vesikel. Aus diesem Vesikel wachsen die Metulae heraus, die auch als Prophialidus bezeichnet werden. Die einkernigen Phialiden sind die eigentlichen Sporenträger.

Natürlicherweise baut *A. nidulans* eine Vielzahl organischer Substanzen im Ökosystem Boden ab. Er kann eine Vielzahl von Substanzen verstoffwechseln, die Polymere Stärke, Cellulose, Chitin und Keratin sowie monomere Zucker, Aminosäuren und Alkohole sind nur einige Beispiele.

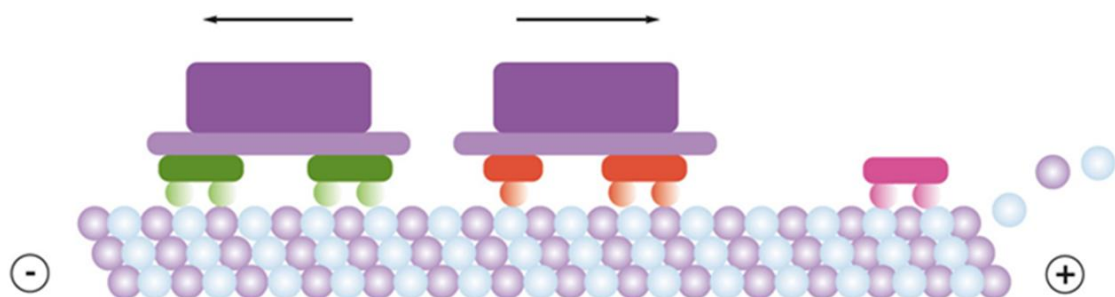
Bereits in den vierziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wurde *A. nidulans* als biologischer Modellorganismus etabliert (Pontecorvo *et al.*, 1953). Der Pilz bietet viele Vorteile als Modellorganismus: er ist auf künstlichen Nährmedien leicht zu kultivieren und wächst innerhalb von 48 Stunden von einer einzelligen, einkernigen, haploiden Spore zu einer Kolonie heran. An den Kolonien lassen sich genetische Veränderungen oftmals direkt am Phänotyp erkennen, daher ist der Ascomycet hervorragend für Mutationsexperimente geeignet. *A. nidulans* bietet als Modellorganismus weiterhin den Vorteil, dass er auch einen sexuellen Vermehrungszyklus durchlaufen kann und daher haploide Stämme miteinander gekreuzt werden können. Es können so genetische Marker zwischen zwei Stämmen ausgetauscht werden (Pontecorvo *et al.*, 1953). Einen Überblick über die Entwicklungszyklen liefert Abb. 3. Bis heute wurden mehr als 300 Mutationen auf den acht Chromosomen des Pilzes kartiert und charakterisiert. Seit 1983 gibt es ein etabliertes Transformationssystem, so dass der Organismus schon seit über 25 Jahren molekularbiologisch zugänglich ist (Yelton *et al.*, 1984). Zu einem hervorragenden zellbiologischen Modellorganismus wurde *A. nidulans* durch die Etablierung des grün fluoreszierenden Proteins GFP für *in vivo* Untersuchungen intrazellulärer Bewegungen von Proteinen und Organellen, die auch Teil dieser Arbeit sind (Suelmann *et al.*, 1997). Mittlerweile ist das gesamte Genom von *A. nidulans* sequenziert und unter [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus\\_nidulans/Home.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html) verfügbar.



**Abbildung 3: Die Entwicklungszyklen von *A. nidulans*.** *A. nidulans* entwickelt sich in einem pleomorphen Entwicklungszyklus, es lässt sich also eine asexuelle von einer sexuellen Wachstumsform unterscheiden. Im unteren Teil der Abbildung ist der in Abb. 2 gezeigte Konidiophor wiederzuerkennen. Aus (Krüger 1997).

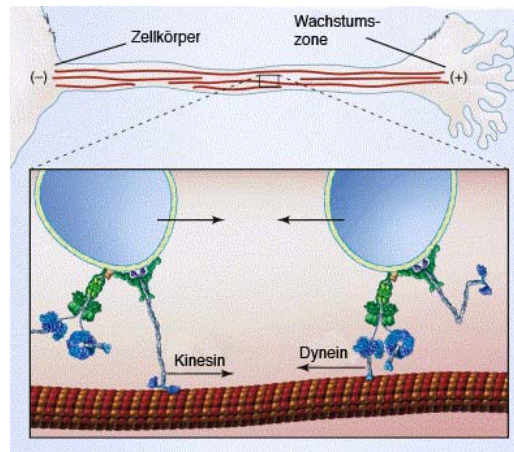
## Da bewegt sich was! Zytoskelett und Motorproteine von *A. nidulans*

In eukaryotischen Zellen ist das unter anderem aus Mikrotubuli bestehende Zytoskelett essentiell für viele verschiedene dynamische Prozesse, wie die Segregation der Chromosomen, die Bewegung von Zellorganellen oder auch den Transport von Proteinen, wie zum Beispiel Signalkomplexen (Shen *et al.*, 2010). Die Mikrotubuli erfüllen diese Funktionen nicht nur durch ihre dynamische Instabilität, sondern auch und vor allem durch ihr Zusammenwirken mit verschiedenen Motorproteinen, wie Dynein und Kinesin (Fridolfsson and Starr, 2010).



**Abbildung 4: Schematisches Modell der Interaktion zwischen Mikrotubuli und verschiedenen Motorproteinen.** Die Abbildung verdeutlicht die Theorie, dass Mikrotubuli (zusammengesetzt aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin) in der Zelle als Schienen oder Straßen genutzt werden. Die unterschiedlichen Motorproteine (dargestellt in grün, orange und rosa) transportieren ihre verschiedenen Frachten (in dunkellila mit heller gefärbten assoziierten Proteinen) in unterschiedliche Richtungen. Dieses Modell wird daher auch *rail line*-Modell genannt. Verschiedenste Motorproteine nutzen die selben Mikrotubuli als Straßen in unterschiedliche Richtungen.

Mit den Mikrotubuli sind verschiedenste Proteine assoziiert, vor allem unterschiedliche Motorproteine sowie sogenannte MAPs (microtubule associated proteins), die meist regulatorische Funktionen einnehmen. Die Motorproteine sorgen für einen Transport von Vesikeln (und damit vermutlich ebenso von Chitosomen) und Zellorganellen entlang der Mikrotubuli. Motorproteine sind Enzyme, die chemische Energie aus der Hydrolyse von ATP in mechanische Energie umwandeln (Howard, 1996). Da eukaryotische Zellen recht groß sind und sich in ihrem Cytosol viele verschiedene Filamente und Organellen befinden, reicht die Geschwindigkeit einer einfachen Diffusion nicht aus, um bestimmte Moleküle von einem Teil der Zelle in einen anderen Teil zu befördern. Da Mikrotubuli polar aufgebaut sind, gibt es unterschiedliche Motorproteine für den zielgerichteten Transport. Dynein beispielsweise transportiert Vesikel vom Plus-Ende der Mikrotubuli zu deren Minus-Ende, während Kinesin, ein anderes Motorprotein, den Transport in entgegengesetzter Richtung ermöglicht. Für den Transport der Chitosomen sind daher die Kinesinmoleküle von entscheidender Bedeutung. Die gegensätzliche Polarität der beiden Motoren Kinesin und Dynein ist in Abbildung 5 zu erkennen.



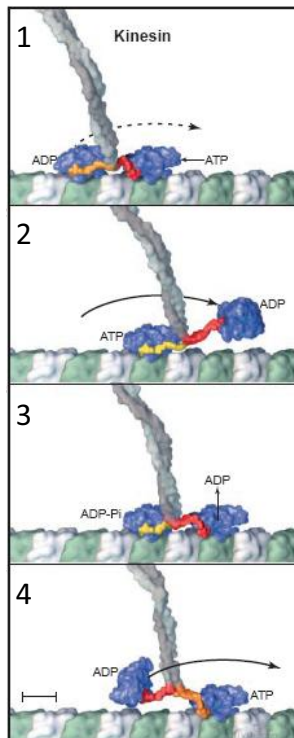
**Abbildung 5: Motoren unterschiedlicher Polarität auf einem Mikrotubulus im axonalen Transport.** Dargestellt ist die Polarität der Mikrotubuli mit Plus- und Minus-Ende in der Zelle und die unterschiedliche Transportrichtung verschiedener Motorproteine. Auch hier lässt sich wieder das *rail line*-Modell erkennen, bei dem die Mikrotubuli in der Zelle als Schienen von den Motorproteinen genutzt werden. Im unteren Teil der Abbildung wird deutlich, dass an einzelnen Transportgütern unterschiedliche Motorproteine lokalisiert sein können. Die Bewegung der Frachten über die Mikrotubuli hängt dann u.A. von der Faltung ihrer assoziierten Motorproteine ab. Da Motorproteine auch im axonalen Transport eine wesentliche Rolle spielen, kommt ihnen eine besondere Bedeutung bei vielen neuronalen Erkrankungen zu. Verändert nach (Yildiz *et al.*, 2004).

Einer der derzeitig bestuntersuchten molekularen Motoren ist das konventionelle Kinesin (Franck *et al.*, 2010). Kinesin ist unter anderem verantwortlich für den Transport von Vesikeln entlang der Mikrotubuli in eukaryotischen Zellen (Jamison *et al.*, 2010). Kinesine werden in zwölf Unterfamilien eingeteilt. Die Anzahl der Kinesine schwankt von Organismus zu Organismus: *S. cerevisiae* hat sechs Kinesine, während *C. elegans* über mehr als 60 Kinesine verfügt (Schoch *et al.*, 2003). Kinesine variieren in ihrer Form, aber die typische Kinesinstruktur ist ein dimeres Protein, das aus zwei schweren und zwei leichten Ketten besteht. Die schwere Kette umfasst einen globulären Kopf, der an Mikrotubuli binden kann und die katalytische Domäne enthält, einem Hals, einem langen Stiel, sowie einem Schwanz, der mit anderen Proteinen über eine Vielzahl von Verbindungsproteinen interagieren kann. (Kull *et al.*, 1996) (Schnitzer and Block, 1997) (Vale and Milligan, 2000). Die N-terminale Motordomäne in der Kopfreion des Kinesins ist 300 bis 400 Aminosäuren lang und hochkonserviert. Sie enthält nicht nur die Mikrotubuli-, sondern auch die ATP-Bindestelle. Die Motordomäne wird von einem kurzen Hals mit der Stiel-Domäne verbunden, die bei den meisten Kinesinen Coiled-coil-Strukturen zur Dimerisierung enthält. Am C-Terminus des Kinesins findet sich die Schwanz-Domäne, die das Transportgut bindet. Von dieser allgemeinen Struktur der Kinesine existieren in den verschiedenen Familien charakteristische Unterschiede. Kinesine sind nicht nur für den Langstreckentransport von Vesikeln und Organellen verantwortlich. Auch an der Organisation und Funktion der Spindel und am polaren Wachstum sind sie beteiligt. Zuerst wurde Kinesin 1985 beschrieben (Vale *et al.*, 1985), Ronald Vale entdeckte das konventionelle Kinesin, das Partikel entlang von Mikrotubuli transportiert. In *N. crassa* wurde das erste konventionelle

Kinesin in filamentösen Pilzen beschrieben (Steinberg and Schliwa, 1995). Konventionelles Kinesin ist in den meisten Pilzen am polaren Wachstum und dem Transport sekretorischer Vesikel beteiligt (Lehmler *et al.*, 1997) (Seiler *et al.*, 1997) (Steinberg, 1998).

Es gewinnt die für den Transport entlang eines Mikrotubulus benötigte Energie aus der Hydrolyse von ATP am katalytischen Zentrum der Kopfreion (Jeune-Smith *et al.*, 2010). Durch die ATP-Hydrolyse erfolgt eine Konformationsänderung des Kopfes und des Halses des Kinesinmoleküls, die verstärkt und in Bewegung umgesetzt wird.

Ein Kinesinmolekül besteht aus einem Kopf- und einem Schwanzteil, wobei die Domäne des Kopfteils ATP-abhängig am Mikrotubulus binden kann, während die Schwanzdomäne für die Interaktion mit anderen Proteinen sorgt. Der Kopfteil ist bei den meisten Kinesinen wichtig für die Aktivität des Motorproteins und wird daher auch als Motordomäne bezeichnet. Da am Schwanzteil andere Proteine und auch Cargos, also Transportmoleküle, binden, bezeichnet man diesen Abschnitt des Kinesins auch als Cargobindedomäne. Zwischen Motor- und Cargobindedomäne befindet sich ein Abschnitt, der als *neck linker* bezeichnet wird und die beiden Domänen miteinander verbindet, sowie eine *coiled-coil* Domäne, die die Interaktion mit anderen Untereinheiten ermöglicht (Caviston and Holzbaur, 2006).



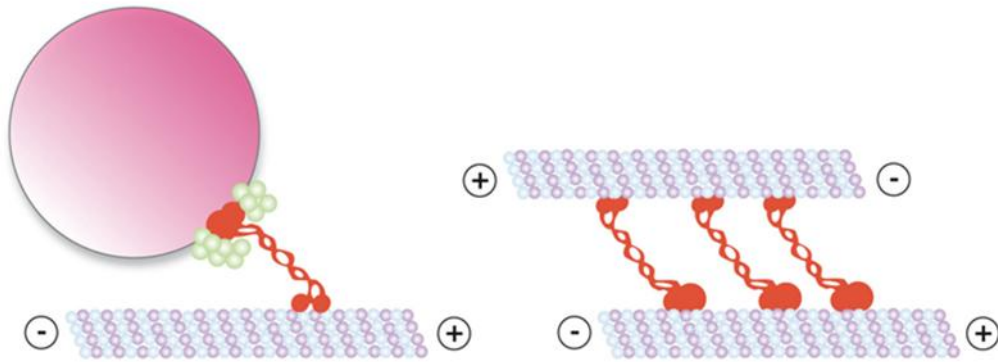
**Abbildung 6:** Prozessive Bewegung eines Kinesins entlang eines Mikrotubulus. Der Größenbalken entspricht 4 nm, weitere Erläuterungen siehe Text. Aus (Vale & Michigan 2000).

In Abbildung 6 lässt sich der Bewegungsablauf eines Kinesins entlang eines Mikrotubulus unter ATP-Verbrauch gut erkennen. Gezeigt ist lediglich die Motordomäne und ein Teil der *coiled-coil* Domäne, das beförderte Cargo ist nicht gezeigt. Die katalytischen Zentren der Motordomäne des Kinesins sind an jeweils einen Tubulin-Heterodimer gebunden, die grünen Untereinheiten stellen die  $\beta$ -Untereinheiten des Mikrotubulus, die weißen Untereinheiten die  $\alpha$ -Untereinheiten dar. In dieser Position ist auch die Stellung der beiden *neck linker* Domänen auffällig, am so genannten *trailing head*, also dem hinteren Teil der Motordomäne, zeigt der *neck linker* (in orange) nach vorne, während er am *leading head* (*neck linker* in rot) nach hinten zeigt (Abb. 6 (1)). Wird nun ATP am *leading head* gebunden, wird der *trailing head* durch ein festes Andocken des *neck linkers* um 160 Å zur nächsten Tubulinbindestelle nach vorne geworfen (Abb. 6 (2)). Der neue *leading head* hydrolysiert ATP zu ADP-Pi und der neue *trailing head* bindet fest an den Mikrotubulus (Abb. 6 (3)). Nun bindet

wieder ein ATP am *leading head* und der Zyklus beginnt von vorn (Abb. 6 (4)). Da die Bewegung des Kinesins entlang eines Mikrotubulus schrittweise abläuft, spricht man von einem prozessiven Bewegungsablauf (Vale and Milligan, 2000).

Die Kinesine bewegen sich über Mikrotubuli im Organismus fort. Ihre Fortbewegung kann dabei in etwa mit einem Zug verglichen werden, der über Schienen fährt (siehe Abb. 4). Mikrotubuli sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Heterodimeren aufgebaut (Bryan and Wilson, 1971). Es lagern sich zwölf bis 15 Dimere lateral zu einer 25 nm dicken Röhre aneinander. Diese Röhre wird durch Addition weiterer Dimere in Längsrichtung verlängert. Eine solche Röhre wird als Protofilament bezeichnet. Durch eine parallele Anordnung von jeweils 13 Protofilamenten werden die Mikrotubuli aufgebaut (Savage *et al.*, 1989). Im Zytoplasma einer Zelle liegt normalerweise ein Gleichgewicht zwischen polymerisiertem und depolymerisiertem Tubulin vor. Die Tubulin-Einheiten werden ständig sowohl am Plus- als auch am Minusende des Mikrotubulus angebaut und auch wieder depolymerisiert, so dass ein Gleichgewicht entsteht, dies wird dynamische Instabilität genannt. Beide Prozesse verlaufen am Plusende wesentlich schneller, diese Polarität resultiert aus der Anordnung der Dimere:  $\alpha$ -Tubulin liegt in Richtung Minusende,  $\beta$ -Tubulin in Richtung Plusende (Nogales *et al.*, 1999). Das Plusende der Mikrotubuli ist daher durch eine hohe Dynamik gekennzeichnet: Auf kontinuierliches Wachsen der Mikrotubuli durch Anheften von Dimeren erfolgt eine spontane Depolymerisation in einer Kettenreaktion vom selben Ende aus. Der Wechsel dieser Dynamiken wird als *catastrophe* und *rescue* bezeichnet (Howard and Hyman, 2003) (Karsenti *et al.*, 1984) (Mitchison and Kirschner, 1984). Durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine, die sogenannten MAPs, kann die Dynamik der Mikrotubuli gesteuert werden. So können einerseits sehr stabile Mikrotubuli entstehen, die beispielsweise in Flagellen benötigt werden, andererseits aber auch hoch dynamische Mikrotubuli, wie beispielsweise die zytoplasmatischen Mikrotubuli filamentöser Pilze. Mikrotubuli können durch die MAPs untereinander verbunden werden und sich zu Zilien bzw. Geißeln ( $9 \times 2 + 2$ ) oder Zentriolen ( $9 \times 3 + 0$ ) organisieren. Von einem  $9 \times 2 + 2$  Aufbau spricht man, wenn 2 Zentraltubuli von 9 Doppelmikrotubuli (Mikrotubulus A+B) umrahmt werden. Cilien und Geißeln sind aktiv beweglich (über das ATP-spaltende Protein Dynein). Die Zentriolen kommen in der Regel paarweise vor und verdoppeln sich bei der Zellteilung. Zusammen mit dem perizentriolären Körper, von dem Mikrotubuli ausgehen, werden sie als Zentrosom bezeichnet.





**Abbildung 7: Kinesine, Vesikel und Mikrotubuli.** Deutlich erkennbar ist die Polarität der Mikrotubuli. Vesikel werden mittels einer Vielzahl von Hilfsproteinen mit den Kinesinen verbunden (grüne rundliche Strukturen an Vesikel und Kinesin). Kinesine transportieren nicht nur verschiedenste Vesikel durch die Zelle, sondern sind auch an einer Vielzahl anderer Transportvorgänge beteiligt, u.A. an der Trennung der Schwesterchromatiden in Mitose und Meiose, in der sie, wie im rechten Teil der Abbildung verdeutlicht, die Mikrotubuli gegeneinander verschieben. Ein Mikrotubulus dient dann als Straße oder Schiene, ein anderer als Transportgut.

Die Organisation der Mikrotubuli unterscheidet sich sowohl von Organismus zu Organismus als auch zwischen den unterschiedlichen Phasen der Entwicklung des jeweiligen Organismus. Die Minusenden der Mikrotubuli sind über die perinuklearen Mikrotubuli-organisierenden-Zentren (MTOC) stabilisiert. In Vertebraten werden sie, wie oben bereits erwähnt, als Zentrosomen (Kirschner, 1978) bezeichnet und in Pilzen Spindelpolkörper genannt (Heath and Rethoret, 1981). In *Saccharomyces cerevisiae* wurde die einfachste Organisation der Mikrotubuli beschrieben. Zu Beginn der Prophase findet die Verdopplung des Spindelpolkörpers statt. Der Spindelpolkörper ist ein Komplex, der aus einer Vielzahl regulatorischer und struktureller Proteine besteht. Die Proteine haben Funktionen von der Checkpointkontrolle der Mitose bis zur Polymerisation der Spindel und der astralen Mikrotubuli (Carminati and Stearns, 1997). Der Spindelpolkörper ist in eine innere und eine äußere Platte unterteilt. Die beiden Platten sind durch membranspannende Proteine verbunden und sitzen auf der jeweiligen Seite der Kernmembran. Die Grundfunktion des Spindelpolkörpers ist die Polymerisation der Mikrotubuli. Im Spindelpolkörper und im Zentrosom liegt  $\gamma$ -Tubulin in großer Menge vor.  $\gamma$ -Tubulin bindet das  $\beta$ -Tubulin der Tubulin-Dimere, dadurch wird der Start der Polymerisation der Mikrotubuli initiiert (Félix *et al.*, 1994) (Yu *et al.*, 1993) (Oakley, 2000).  $\gamma$ -Tubulin konnte zuerst in *A. nidulans* entdeckt werden und wurde mittlerweile in allen untersuchten höheren Eukaryoten nachgewiesen (Joshi, 1994) (Oegema *et al.*, 1999). In *S. pombe* existieren in der Interphase zusätzlich zum Spindelpolkörper in der Nähe des Kerns eine Vielzahl weiterer MTOCs (Palestini *et al.*, 2000). Die Mikrotubuli dieser länglichen Zellen sind mit ihren Plusenden in Richtung der Spitzen ausgerichtet. Im Basidiomyceten *Ustilago maydis* sind die Mikrotubuli in der G1-Phase des Zellzyklus zunächst bipolar organisiert und entstehen ausgehend von etwa fünf MTOCs im Cytoplasma, während die Spindelpolkörper inaktiv sind.

Nachdem die Knospe zu etwa einem Drittel gebildet wurde, beginnen die Mikrotubuli, sich neu zu organisieren und alle MTOCs befinden sich an der Knospungsstelle innerhalb der Knospe. Wird die Mitosespindel gebildet, so lösen sich auch diese MTOCs auf. Die Organisation der Mikrotubuli entspricht in dieser Phase der von *S. cerevisiae*, mit dem Unterschied eines zurückwandernden Spindelpolkörpers in *U. maydis* (Straube *et al.*, 2003). Nicht vom Zentrosom ausgehende Mikrotubuli-Organisationen sind auch in höheren Eukaryoten bekannt (Hyman and Karsenti, 1998). In diesen MTOCs wurde  $\gamma$ -Tubulin ebenfalls nachgewiesen (Horio *et al.*, 1991).

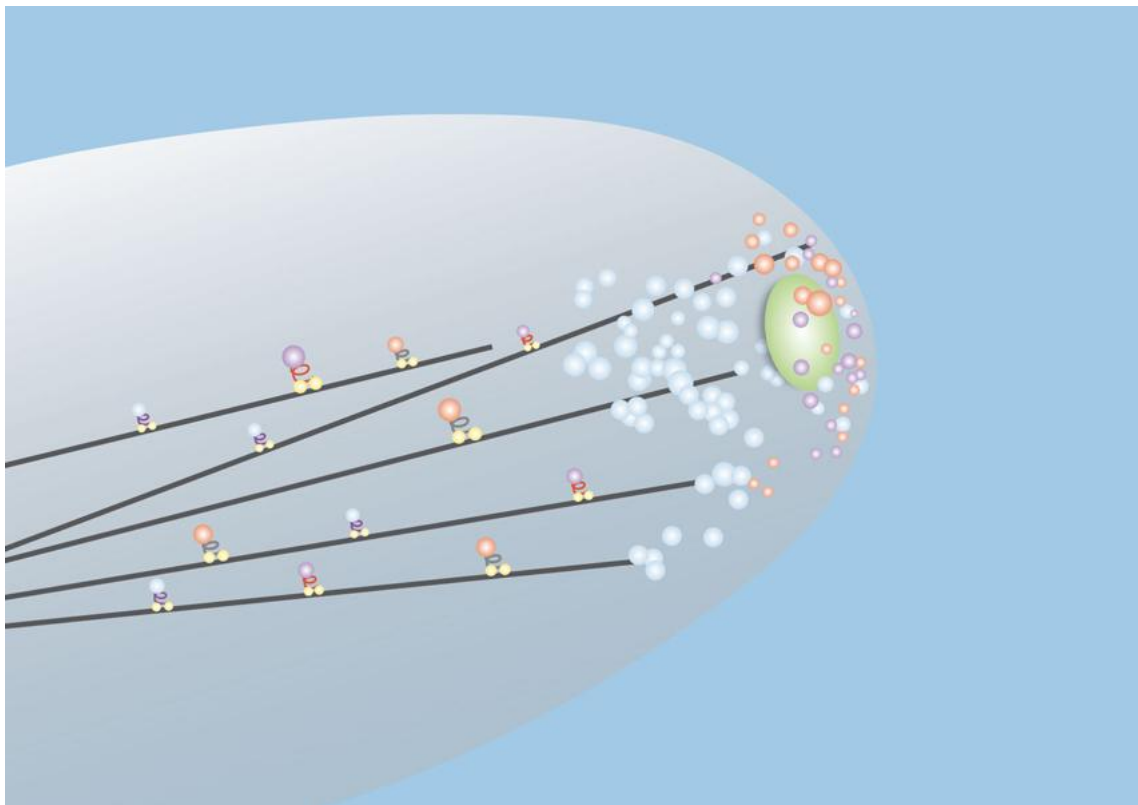
Eine starke Bedeutung kommt den Mikrotubuli bei der Bekämpfung von Krebs zu. Da sich der Spindelapparat ohne Mikrotubuli nicht entwickeln kann, können sich die Krebszellen auch nicht weiter mitotisch teilen, der Tumor wächst nicht weiter und auch Metastasen bilden sich nicht mehr. So werden die Wirkstoffe Vinblastin und Paclitaxel bei der Chemotherapie eingesetzt, um den Aufbau von Mikrotubuli zu stören. Diese Chemotherapeutika wirken nicht nur spezifisch auf Krebszellen, sondern beeinflussen alle teilungsfähigen Zellen. Da aber Haut-, Haar-, Darm-, Immun- oder Geschlechtszellen ständig erneuert werden müssen, kann es zu erheblichen Nebenwirkungen wie Haarausfall, Darmbluten oder stärkerer Infektionsanfälligkeit kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde oben erwähntes Paclitaxel benutzt, um stabile Mikrotubuli zu erzeugen. Paclitaxel blockiert die dynamische Instabilität der Mikrotubuli, indem es GDP-gebundenes Tubulin im Mikrotubulus stabilisiert. Auch wenn die Hydrolyse von GTP die Spitze des Mikrotubulus erreicht, findet dort keine Depolymerisierung statt und der Mikrotubulus schrumpft nicht.



## Der Spitzenkörper und polares Wachstum

*A. nidulans* wächst polar. Die Stoffe, die für sein Wachstum benötigt werden, müssen daher ins Zentrum des Wachstums befördert werden. Das Wachstumszentrum ist als Ansammlung sekretorischer Vesikel in der Hyphenspitze leicht auszumachen, es wird als Spitzenkörper bezeichnet und ist im Phasenkontrastmikroskop gut sichtbar. Der Transport der sekretorischen Vesikel vom Spitzenkörper zur Zellwand ist bis jetzt nicht vollständig bekannt. Es werden aber wahrscheinlich andere Motorproteine als Kinesine aktiv, da die Mikrotubuli mit ihrem Plus-Ende im Spitzenkörper aufhören und die Vesikel daher von den Mikrotubuli abfallen.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Spitzenkörpers.** Eine Vielzahl von Mikrotubuli (schwarz) dient unterschiedlichsten sekretorischen Vesikeln (bunt) als Schienen auf ihrem Weg vom Zellinneren zum Spitzenkörper. Die Vesikel werden mittels spezifischer Transportproteine zur Hyphenspitze transportiert. Die Hyphenspitze wird daher auch *vesicle supply center* genannt, ihre (hier grün gefärbte) Struktur ist auch unter dem Lichtmikroskop erkennbar. Dort fallen sie vermutlich von den Mikrotubuli ab und werden über das Aktinfilament, das in dieser Abbildung nicht gezeigt ist, weiter zu ihrem endgültigen Bestimmungsort transportiert.

Der Spitzenkörper wird auch *vesicle supply center* genannt, da an dieser Stelle, wie oben erwähnt, unterschiedliche Vesikel von den Mikrotubuli abfallen und sich so ansammeln. Die restliche Strecke bis zur Zellwand werden die Vesikel sehr wahrscheinlich über das Aktinskelett der Zelle transportiert. Da Kinesine nicht zum Transport über Aktinfilamente fähig sind, übernehmen an dieser Stelle andere Motorproteine diese Funktion. Wahrscheinlich werden die Vesikel über die restliche kurze Strecke mittels Myosin transportiert (May *et al.*, 1998). *A. nidulans* ist also ein stark polar aufgebauter Organismus. Zellpolarität ist gekennzeichnet durch

asymmetrische Zellform, asymmetrische Proteinverteilung sowie asymmetrische Zellfunktion. In Pro- und eukaryotischen Zellen ist dies ein grundlegender Bestandteil der Zellbiologie. Zellpolarität wird in Eukaryoten durch die Lokalisierung von Signalkomplexen, die Umstrukturierung des Zytoskeletts, die Interaktion des Zytoskeletts mit dem Zellkortex und dem Transport von Proteinen mit Hilfe von molekularen Motoren aufrechterhalten. Zellpolarität wird vor allem zum Membranwachstum und zur Zellverlängerung benötigt (Pollard and Borisy, 2003). In einzelligen Organismen wie *S. cerevisiae* oder *S. pombe* wird die Zellpolarität nur für die mitotische Teilung aufgebaut. Daher können die Zusammenhänge der Etablierung und Erhaltung der Polarität hier verhältnismäßig einfach und ausführlich untersucht werden. Mikrotubuli spielen auch in diesen Organismen eine Rolle im Aufbau der Zellpolarität. In *S. cerevisiae* ist diese allerdings auf die Orientierung der Spindel und das Einwandern des alten Spindelpolkörpers in die Knospe beschränkt (Gundersen and Bretscher, 2003). In *S. pombe* dagegen werden die Mikrotubuli für den gerichteten Transport von Komponenten zur Etablierung und Aufrechterhaltung des geradlinigen polaren Wachstums benötigt (Beinhauer *et al.*, 1997) (Browning *et al.*, 2000) (Palestini *et al.*, 2000) (Mata and Nurse, 1997) (Drummond and Cross, 2000). In filamentösen Pilzen wird polares Wachstum allerdings nicht nur für die mitotische Teilung benötigt. Filamentöse Pilze stellen ein hervorragendes Beispiel für extrem schnelles polares Wachstum an der Hyphenspitze dar. Die Geschwindigkeit liegt hier bei bis zu 1  $\mu\text{m/s}$  bei *N. crassa* (López-Franco *et al.*, 1994). Diese Wachstumsgeschwindigkeit wird nicht nur über einen begrenzten Zeitraum, sondern unbegrenzt erreicht. Die Hyphen der filamentösen Pilze können mehrere Kilometer im Boden wachsen. In den wachsenden Hyphen können zusätzlich neue Wachstumszonen gebildet werden. Aus diesen Zonen können neue Verzweigungsachsen entstehen, wodurch eine Vielzahl verschiedener Wachstumsachsen gebildet und aufrechterhalten werden können. Filamentöse Pilze können außerdem die Richtung der wachsenden Hyphenspitze ändern, um auf äußere Reize zu reagieren. Solche Reize können zum Beispiel physikalische Barrieren oder Nährstoffangebote darstellen (Dijksterhuis, 2003). Diese Fähigkeit fehlt den molekular sehr gut untersuchten Hefen. Gleichzeitig setzt diese Fähigkeit einen komplexen Mechanismus voraus, der auch für das Verständnis des polaren Wachstums verschiedener Zelltypen höherer Eukaryoten, wie zum Beispiel der Neuronalentwicklung, von Bedeutung sein könnte. Mikrotubuli und MAPs scheinen bei der Erhaltung des polaren Wachstums eine Rolle in filamentösen Pilzen zu spielen. Die Deletion des  *$\alpha$ -tub* Gens führt zu abnormen Hyphen, inhibiert jedoch nicht völlig das polare Wachstum (Doshi *et al.*, 1991). Behandlung mit Benomyl führt zu kurvigem Hyphenwachstum und in höheren Konzentrationen zur Bildung von Verzweigungsstellen und stark verlangsamtem Wachstum (Riquelme *et al.*, 2003) (That *et al.*,

1988) (Takeshita *et al.*, 2007). Deletionen von Dynein und Komponenten des Dynaktinkomplexes in *N. crassa* zeigen ein mäandrierendes Hyphenwachstum, eine starke Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit und Defekte in der Verteilung der Kerne und Vesikel. Die Deletion des konventionellen Kinesins bewirkt eine deutliche Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, eine defekte Kernverteilung und eine Reduktion des anterograden Vesikeltransports (Seiler *et al.*, 1997) (Seiler *et al.*, 1999). Wurden orthologe Proteine in *A. nidulans* deletiert, so zeigte der jeweilige Phänotyp keine mäandrierenden Hyphen, wohl aber die gleichen Defekte in der Kernpositionierung und dem verlangsamten Wachstum (Requena *et al.*, 2001). Weitere Hinweise über eine Beteiligung der Mikrotubuli am polaren Wachstum liefern die umfangreichen Untersuchungen an der für höhere Pilze charakteristischen Komponente im polaren Wachstum, dem Spitzenkörper (Girbardt, 1956). Er setzt sich aus einer Ansammlung verschiedenster sekretorischer Vesikel zusammen und befindet sich im Zentrum der Hyphenspitze. Die Vesikel sorgen für einen stetigen Nachschub für das extrem schnelle Wachstum der Hyphen (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995). Die Wachstumsrichtung der Hyphe wird durch die Position des Spitzenkörpers bestimmt (Riquelme *et al.*, 1998). Die Organisation des Spitzenkörpers basiert auf mikrotubuliabhängigem Transport (McDaniel and Roberson, 2000). In verschiedenen filamentösen Pilzen wurde eine Vielzahl von Mutanten erzeugt, die eine veränderte Spitzenkörpermorphologie und –positionierung zeigen. Eine Veränderung des Spitzenkörpers bewirkt immer auch eine Veränderung der Geschwindigkeit, Richtung und Anzahl der wachsenden Hyphenspitzen (Riquelme *et al.*, 2000) (Riquelme *et al.*, 2002) (Seiler *et al.*, 1997) (Seiler *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene sekretorische Vesikel isoliert und charakterisiert. Da *A. nidulans* ein polar wachsender Ascomycet ist, kommt dem Transport von sekretorischen Vesikeln eine besondere Bedeutung zu. Der Pilz stellt also einen sehr guten Modellorganismus zur Untersuchung dieser Vesikel und ihrer Rolle im polaren Wachstum dar. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die isolierten Vesikel in einem neu entwickelten *in vitro* Transportsystem im Nanomaßstab eingesetzt und untersucht. Da zum Transport der Vesikel wahrscheinlich Kinesine als Motorproteine fungieren, ist die Charakterisierung der Motorproteine eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung des Transportsystems. In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits fünf der insgesamt elf in *A. nidulans* vorhandenen Kinesine untersucht und näher charakterisiert werden (Requena *et al.*, 2001) (Konzack *et al.*, 2005) (Rischitor *et al.*, 2004) (Zekert *et al.*, 2010). Auch das Zytoskelett von *A. nidulans* wird in unserer Arbeitsgruppe erforscht (Takeshita *et al.*, 2008), sowie weitere mögliche Marker für die apikale Hyphenspitze (Higashitsuji *et al.*, 2009). Daher gibt es hier hervorragende Bedingungen für die Etablierung des Transportsystems.

## Polares Wachstum und Motoren

Die meisten in einer Zelle synthetisierten Proteine werden aktiv an ihren Bestimmungsort transportiert. Der Transport wird durch molekulare Motoren über Filamente des Zytoskeletts ermöglicht. Proteine werden in verschiedenen membranösen Organellen und Proteinkomplexen und mRNAs in großen Proteinkomplexen befördert. Direktionaler intrazellulärer Transport ist ein typisches Merkmal von polar wachsenden Zellen wie zum Beispiel *A. nidulans*, außerdem ist er fundamental für die Funktion und das Überleben solcher Zellen, da die meisten der am Ort des Wachstums benötigten Proteine aus dem Zellinneren dorthin transportiert werden müssen. Daher bietet *A. nidulans* ein hervorragendes Modellsystem, um intrazelluläre Transportmechanismen zu studieren. Unter den am intrazellulären Transport beteiligten molekularen Motoren wurden drei große Protein-Superfamilien identifiziert: Kinesine, Dyneine und Myosine. Kinesine nutzen Mikrotubuli als „Schienen“, um ihre Fracht zu transportieren (siehe Abb. 7). Sie nutzen die chemische Energie von ATP, um Konformationsänderungen zu bewirken, die in Bewegungsenergie umgesetzt werden können. Dyneine nutzen ebenfalls Mikrotubuli, um ihre Fracht zu transportieren – allerdings in die entgegengesetzte, retrograde, Richtung als Kinesine. Zilien und Flagellen werden auch von Dyneinen angetrieben. Myosine dagegen bewegen sich entlang von Aktinfilamenten fort, zum Beispiel zur Muskelkontraktion oder zum Transport über kurze Strecken innerhalb der Zelle. Alle Motorproteine verwenden, wie bereits erwähnt, die chemische Energie der ATP-Hydrolyse zur Konformationsänderung der Proteinstruktur, die zur anschließenden gerichteten Bewegung entlang des Zytoskeletts führt. Im Gegensatz zu den Kinesinen und Myosinen werden Dyneine nicht in Unterfamilien unterteilt. In *A. nidulans* wurde gezeigt, dass Dynein die Mikrotubuli destabilisiert. Außerdem zeigen Dynein-Mutanten ein wesentlich längeres Pausieren der Mikrotubuli am Kortex der Hyphenspitze. Anscheinend sind die Mikrotubuli also mit dem Kortex der wachsenden Hyphenspitze verbunden (Han *et al.*, 2001). Dynein ist zudem an der Kernwanderung und dem Transport von sekretorischen Vesikeln in filamentösen Pilzen beteiligt (Minke *et al.*, 1999) (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002) (Xiang *et al.*, 1994). Die Funktion von Motorproteinen wird direkt durch den Dynaktin-Komplex beeinflusst. Dieser fungiert als ein *linker protein* zwischen dem Motorprotein und der transportierten Fracht (Deacon *et al.*, 2003) (Schroer, 2004) (Gill *et al.*, 1991). Durch die Erbkrankheit Lissencephalie bekannt geworden ist ein anderes hochkonserviertes Protein, das ebenfalls für die Funktion von Dynein entscheidend ist. Es handelt sich um das Protein NudF/Lis1. Bei an Lissencephalie erkrankten Menschen ist das *lis1*-Gen mutiert. In *A. nidulans* ist NudF für die Minusend-gerichtete Bewegung des Dyneins essentiell (Han *et al.*, 2001) (Xiang *et al.*, 1995) (Dobyns *et al.*, 1993).

## Von Mikro zu Nano: Nanobiologie und molekulare Motoren

Mit der Entdeckung von Mikroorganismen durch Robert Hooke und Antoni van Leeuwenhoek um 1665 herum begann die mikrobiologische Forschung. Die Nanobiologie dagegen ist noch ein sehr junges Gebiet der biologischen Forschung und hatte ihren Anfang etwa im Dezember 1959, als der spätere Nobelpreisträger Richard Feynman seinen legendär gewordenen Vortrag mit dem Titel „There’s Plenty of Room at the Bottom“ hielt. Er berichtete in diesem Vortrag vom Problem der Manipulation und Beherrschung von Dingen in winzigen Maßstäben, d.h. im Bereich des Nanometers (Pierotti *et al.*, 2008). Wirtschaftsfachleute, Politiker und Wissenschaftler sind sich heute jedoch einig, dass die Nanotechnologie Disziplinen wie Physik, Biologie, Chemie, Materialwissenschaften und Informatik zur Entwicklung bahnbrechender Anwendungen, die ein enormes kommerzielles Potential haben, vereinigt. Primär geht es in der Nanotechnologie darum, aus den elementaren Bausteinen der Materie, d.h. den Atomen und Molekülen, neuartige Materialien zu entwickeln und intelligente Systeme zu bauen. Die Nanotechnologie birgt gerade für die Medizin völlig neuartige Diagnose- und Heilverfahren. Dabei kann heute nur spekuliert werden, welche Ideen und Vorstellungen letztendlich praktisch umgesetzt werden können und welche Visionen bleiben werden (Rasooly and Herold, 2009).

Ein großer Unterschied zwischen der makroskopischen und der nanoskaligen Welt besteht in der Bauweise von komplexen Objekten. In der makroskopischen Welt werden solch komplexe Objekte am Fließband Stück für Stück zusammengesetzt. Im Gegensatz dazu gibt es zum Bau komplexer Objekte im Nanomaßstab *ex vivo* lediglich zwei Prozesse: Entweder den molekularen Zusammenbau (Rothmund, 2006) (Whitesides and Grzybowski, 2002) (Barboiu and Lehn, 2002) oder das Zeit verbrauchende sequentielle Strukturieren mit technisch erschaffenen Nanotools (Ginger *et al.*, 2004) (Stroscio and Eigler, 1991) (Kim and Lieber, 1999) (Grier, 2003) (Yan *et al.*, 2004). Bis heute existieren keine vergleichbaren Gegenstücke zum Fließbandbau auf Nanoebene, die den sequenziellen Zusammenbau von verschiedenen Nanoteilen zu komplexen Systemen ermöglichen würden. Zellen nutzen molekulare Motoren für den aktiven Transport von Frachtgütern über ihre jeweiligen Filamente zu spezifischen Zielen. So regulieren sie die lokale Konzentration bestimmter Moleküle und deren sequenziellen Zusammenbau mit großer räumlicher Präzision. Analog zur makroskopischen Welt ist es faszinierend, gesteuerten Transport über eigens gebaute Schienen mittels nanoskaliger Motoren zu bewerkstelligen. Bisher gibt es keine synthetischen Motoren, die sich wie gewünscht verhalten (Browne and Feringa, 2006). Daher werden stets biologische Motoren in synthetische Umgebungen eingesetzt.

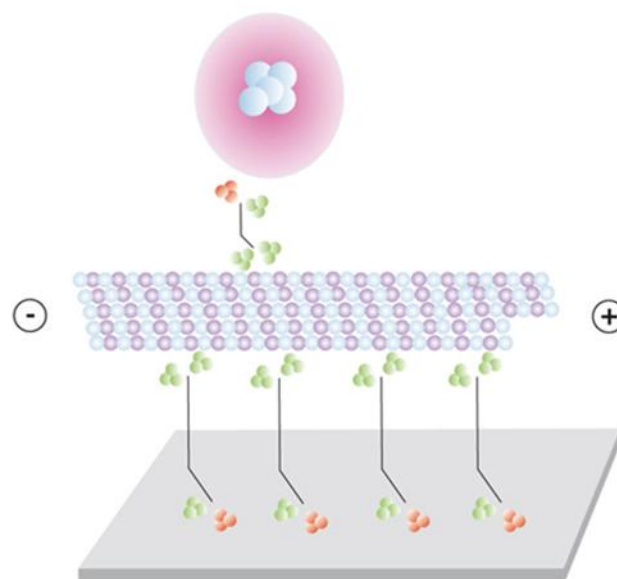
## Vesikel im Spitzenkörper

Polares Wachstum von filamentösen Pilzen benötigt einen stetigen Nachschub von sekretorischen Vesikeln. Die benötigten Vesikel werden über Schienen, die aus Zytoskelettelementen der Zelle gebildet werden, zu den Stellen des Zellwachstums transportiert (Harris, 2005) (Gero Steinberg, 2007) (Sudbery and Gladfelter, 2008) (Court and Sudbery, 2007). Die Fusion dieser membrangebundenen Vesikel mit der Plasmamembran ermöglicht die nötige Erweiterung der Plasmamembran und setzt die Enzyme und Proteine frei, die die neue Zellwand synthetisieren. Dieser Prozess wurde in *S. cerevisiae* gründlich erforscht und hält so ein Modell für Untersuchungen in anderen Pilzen bereit (Park and Bi, 2007). Vesikel werden von ihrem Entstehungsort, dem Golgi-Apparat, zu den Stellen des polaren Wachstums transportiert (Pruyne *et al.*, 1998). An der Plasmamembran angekommen, docken die sekretorischen Vesikel zunächst an einen zweiten Multiproteinkomplex an, bevor sie mit der Plasmamembran fusionieren. Dieser zweite Multiproteinkomplex wird Exozyst genannt (He *et al.*, 2007) (TerBush *et al.*, 1996) (TerBush and Novick, 1995). Die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran wird durch v-SNARES auf den Vesikeln und t-SNARES auf der Membran vermittelt (Pelham, 2001). *S. cerevisiae* ist ein exzellentes Modell, um die molekulare Genetik des polaren Wachstums zu erforschen. Der Organismus ist allerdings weniger optimal, um die räumliche Organisation der molekularen Komponenten zu untersuchen, da das polare Wachstum der Knospe auf eine kurze Periode limitiert ist. Hier stellt *A. nidulans* einen wesentlich geeigneteren Organismus dar.

## Ein *in vitro* Transportsystem im Nanomaßstab

Molekulare Motoren, wie zum Beispiel Kinesine, transportieren Zellorganellen und Vesikel als eine Art molekulare Fracht oder Ladung zu ihrem Bestimmungsort innerhalb einer Zelle (*in vivo*) (Vale, 2003) (Verhey and Hammond, 2009). Dieser Mechanismus wird als aktiver Transport durch enzymatische Reaktionen der molekularen Motoren ermöglicht, die chemische Energie aus ATP in mechanische Arbeit konvertieren und somit den gerichteten Transport über Zytoskelettelemente, wie beispielsweise Mikrotubuli, ermöglichen. Molekulare Motoren bekommen derzeit mehr und mehr Aufmerksamkeit als Bausteine im Nanomaßstab, da sie auch außerhalb einer biologischen Zelle (*in vitro*) funktionieren, wenn die Umgebungskonditionen, wie zum Beispiel Temperatur und pH-Wert, es zulassen (Hess and Vogel, 2001) (van den Heuvel and Dekker, 2007) (Spetzler *et al.*, 2007) (Goel and Viola Vogel, 2008). Außerhalb der Grundlagenforschung gibt es verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für *in vitro*-Transporte mit molekularen Motoren. Ein denkbares Einsatzgebiet stellen beispielsweise *Lab-on-a-chip* Systeme dar. Im Deutschen meist als Westentaschen- oder Chiplabor bezeichnet, stellen *on-chip*-Systeme mikrofluidische Systeme dar, die die gesamte

Funktionalität eines makroskopischen Labors auf der Größe einer Plastikkarte vereinigen. Durch Kapillarkräfte werden pico- bis millilitergroße Mengen der zu untersuchenden Flüssigkeit im System zwischen Reaktions- und Analyseammern transportiert. Für Feststoffe ist der Transport durch Kapillarkräfte natürlich nicht möglich, hier könnte durch aktiven Transport in *in vitro*-Transportsystem Abhilfe geschaffen werden. Um *on-chip*-Systeme zu konstruieren, die auf molekularen Motoren basieren und spezifische Frachten gerichtet transportieren, sind zwei Anordnungsmöglichkeiten denkbar. Eine Möglichkeit besteht in der biomimetischen Anordnung, in der die Mikrotubuli immobilisiert werden und die Fracht mit Kinesinen über die Mikrotubuli transportiert wird. In dieser Anordnung wurden bereits Silikonkugeln (Yokokawa *et al.*, 2004), Glaskugeln (Neumann *et al.*, 2001), Quantum Dots (Muthukrishnan *et al.*, 2006), Öltröpfen (Bottier *et al.*, 2009) und Lipidvesikel (Bananis *et al.*, 2000) erfolgreich transportiert. Die Mikrotubuli können in dieser Anordnung mit anti-Tubulin-Antikörpern auf der Glasoberfläche immobilisiert werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Mikrotubuli auch mit Kinesinen, die eine Rigor-Mutation aufweisen und daher nicht mehr in der Lage sind, ATP zu hydrolysieren, auf einer Glasoberfläche immobilisiert (siehe Abb. 9).

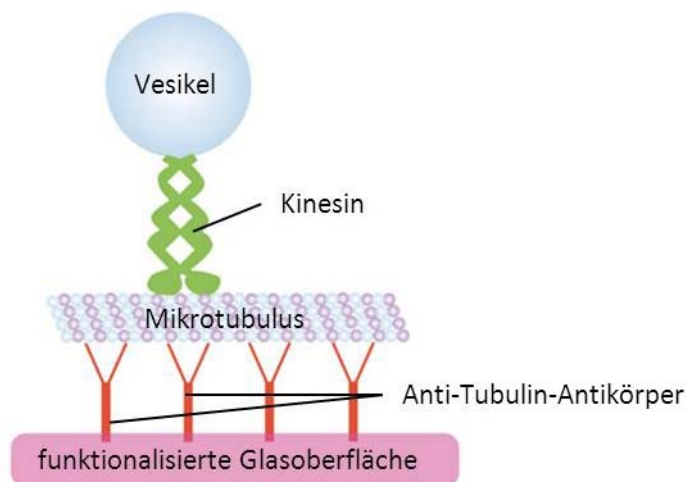


**Abbildung 9: Schematische Abbildung eines möglichen Transportsystems.** Das Motorprotein, das für den Vesikeltransport eingesetzt wird (einzeln, oberer Teil der Abbildung), ist funktionsfähig. Die Motorproteine, die die Mikrotubuli auf der Glasoberfläche fixieren (unterer Teil der Abbildung, gestreckte Moleküle), haben eine Rigor-Mutation und können daher kein ATP hydrolysieren. Die Vesikel (rosa), die in einem solchen nanoskaligen Transportsystem zum Einsatz kommen, können zum Transport spezifischer Ladungen (weiße Kreise) verwendet werden. Die Ladung wird dann in einem Vesikel verpackt, dieses mit funktionsfähigen Kinesinen beschichtet und über die durch mutierte Kinesine fixierten Mikrotubuli transportiert.

Die andere Möglichkeit ist die der synthetischen Anordnung. Hier werden die Kinesine immobilisiert und die Fracht wird mit Mikrotubuli, die über die Kinesine gleiten, transportiert.



Das *in vivo*-Prinzip wird hier also genau umgekehrt. In dieser Anordnung wurden Silikonnadeln (Tarhan *et al.*, 2010), Quantum Dots, Viruspartikel (Bachand *et al.*, 2006), Proteine (Fischer *et al.*, 2009), Deoxyribonukleinsäuren (Sauter *et al.*, 2003) und Ribonukleinsäuren (Taira *et al.*, 2006) bereits erfolgreich transportiert. Bis heute konnte allerdings in keiner der beiden Anordnungen eine gerichtete Beförderung von nativen Vesikeln gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit fanden beide Anordnungen Einsatz: Der synthetische Ansatz wurde zur Kontrolle der beteiligten Komponenten verwendet, er erlaubt sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Auswertung der Transportvorgänge. Zudem lassen sich die unter dem Fluoreszenzmikroskop gut sichtbaren Mikrotubuli deutlich besser in ihrer Bewegung verfolgen als die wesentlich kleineren und schwächer fluoreszierenden Kügelchen oder andere Ladungen der Kinesine. Der biomimetische Ansatz hingegen ist deutlich schwieriger zu beobachten sowie auszuwerten, auch, da hier eine Vielzahl an Komponenten zusätzlich benötigt wird.



**Abbildung 10: Schematische Abbildung eines möglichen Transportsystems.** Dieser Versuchsaufbau ist sehr ähnlich wie der in Abb. 9 gezeigte. Hier werden allerdings keine mutierten Kinesine zur Fixierung der Mikrotubuli verwendet. In diesem Ansatz wurden die Mikrotubuli mit anti-Tubulin-Antikörpern an der Glasoberfläche immobilisiert. Die Vesikel oder Latexkügelchen werden dann mit funktionalen Motorproteinen beschichtet und können so über die Mikrotubuli transportiert werden. Selbstverständlich ist auch hier eine Beladung der Vesikel mit spezifischen Frachten denkbar.



## Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Transportsystem im Nanomaßstab aus Bestandteilen aus *A. nidulans in vitro* erstellt. Das Transportsystem wurde anschließend zur näheren Charakterisierung der beteiligten Komponenten (vorrangig Vesikel, Motorproteine und Zytoskelettelemente) verwendet. Durch die Aufreinigung der benötigten Vesikel konnte eine Vielzahl von bisher unbekanntem Proteinen entdeckt werden, die vermutlich eine Rolle im Spitzenwachstum von *A. nidulans* spielen. Diese Proteine konnten anschließend nicht nur im *in vitro* Transportsystem, sondern auch *in vivo* näher charakterisiert werden. In der Zukunft kann dieses System nicht nur zur Charakterisierung der beteiligten Komponenten verwendet werden. Es sind vielmehr eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten vor allem im nanobiologischen Bereich vorstellbar.

## Ergebnisse

### Polares Wachstum in *A. nidulans*

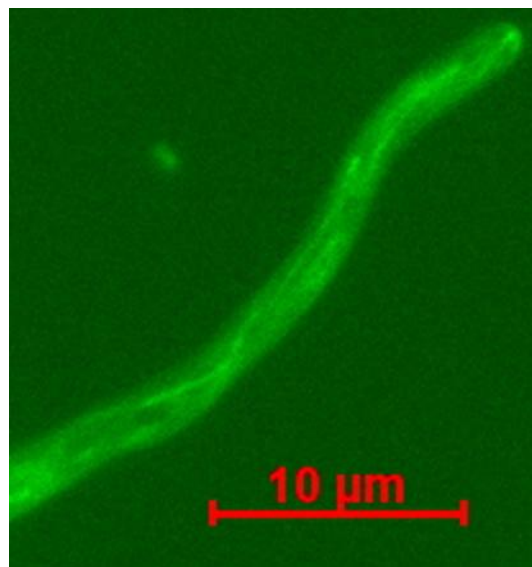
#### Identifizierung neuer Proteine im Spitzenkörper

*A. nidulans* ist ein schnell wachsender, ubiquitär vorkommender Organismus. Er muss daher über einen äußerst effizienten Transportmechanismus verfügen. Eines der Ziele dieser Arbeit war der Aufbau eines *in vitro* Transportsystems mit Bestandteilen der Transportmaschinerie aus *A. nidulans*. Die dazu isolierten Vesikel wurden näher charakterisiert. So konnten einige Proteine entdeckt werden, die anscheinend mit dem apikalen Wachstum von *A. nidulans* im Zusammenhang stehen und in diesem Zusammenhang bisher wenig beachtet wurden. Die Vesikelisolierung wurde, wie im Kapitel Zellaufschluss und beschrieben, durchgeführt. Im Gegensatz zu früheren Protokollen wurde nun ein Stufengradient verwendet und eine peristaltische Pumpe zum gleichmäßigen Fraktionieren der Gradienten. Dies führte zu deutlich besser reproduzierbaren Ergebnissen. Die sekretorischen Vesikel konnten nun stets in den gleichen Fraktionen des Gradienten gefunden werden. Im SDS-Gel der isolierten Vesikel konnte eine Vielzahl verschiedener Proteine gefunden werden. Diese Proteine wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und der Firma Toplab (Martinsried) zur weiteren Analyse zugesandt. Dort wurden die Proteine mit Trypsin verdaut. Anschließend wurde eine MALDI-TOF-Analyse mit vorhergehender Elektrospray-Ionisation durchgeführt. Über einen Datenbankvergleich der erhaltenen Peptide gegen das *A. nidulans* Proteom beim NCBI wurden rund 100 Proteine identifiziert, unter diesen befanden sich 15 Proteine, die mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 99% mit den eingesandten Proteinen übereinstimmen. Im SDS-Gel der Vesikel waren exakt 15 Banden sichtbar, auch die molekulare Masse der erhaltenen Proteine stimmte mit diesen überein. Auch die mehrmalige Wiederholung der Isolierung von Vesikeln aus dem Spitzenkörper brachte das gleiche Ergebnis, das Bandenmuster im SDS-Gel blieb stets gleich und auch die mikroskopische Kontrolle der Vesikel lieferte gleichbleibende Ergebnisse.

#### Markierung neuer Proteine

Die erhaltenen Proteine wurden hinsichtlich Sekretionssignalen und einem möglichen Zusammenhang mit dem polaren Wachstum von *A. nidulans* genauer überprüft. Es konnten mehrere Kandidaten ausgemacht werden, die im Zusammenhang mit dem polaren Wachstum von *A. nidulans* eine besondere Bedeutung haben dürften. Als besonders geeignetes Protein konnte die endo-1,4- $\beta$ -Glukanase identifiziert werden. Sie trägt die EC-Nummer 3.2.1.4 und dient der Umwandlung von Cellulose zu  $\beta$ -Glukose, der Pilz nutzt sie also zum Abbau von Holz. Da der Holzabbau vermutlich am Ort des Wachstums des Pilzes stattfindet, liegt die

Vermutung nahe, dass die endo-1,4- $\beta$ -Glukanase über Mikrotubuli zum Spitzenkörper transportiert wird. In *A. nidulans* konnte dieser Transport bisher nicht nachgewiesen werden. Die endo-1,4- $\beta$ -Glukanase von *A. nidulans* hat eine molekulare Masse von 47 kDa und besteht aus 466 Aminosäuren. Wie die anderen Endoglukanasen auch, bricht die endo-1,4- $\beta$ -Glukanase die Verbindungen innerhalb der Cellulose nur innerhalb sogenannter amorpher Bereiche auf. Nur wo die Zuckerpolymeren ungeordnet zueinander liegen und damit keine kristallinen Bereiche aufbauen, können Endoglukanasen angreifen und damit eine größere Anzahl von Kettenenden hervorbringen. Endoglukanasen haben eine nicht geringe wirtschaftliche Bedeutung: Anwendung finden Cellulasen beispielsweise bei der Isolation von pflanzlichen Protoplasten. Auch in der Verarbeitung von Kaffee werden sie verwendet, wo sie eine Hydrolyse der Cellulose in den Bohnen während des Trocknungsvorganges bewirken. Des Weiteren werden Cellulasen für die Behandlung von Phytobezoaren benutzt, einer Form von Cellulose-Bezoar im menschlichen Magen. In der Textilindustrie werden sie eingesetzt, um v. a. Jeansartikeln den beliebten „Used-Look“ zu geben. Auch in vielen Waschmitteln sind Cellulasen enthalten.

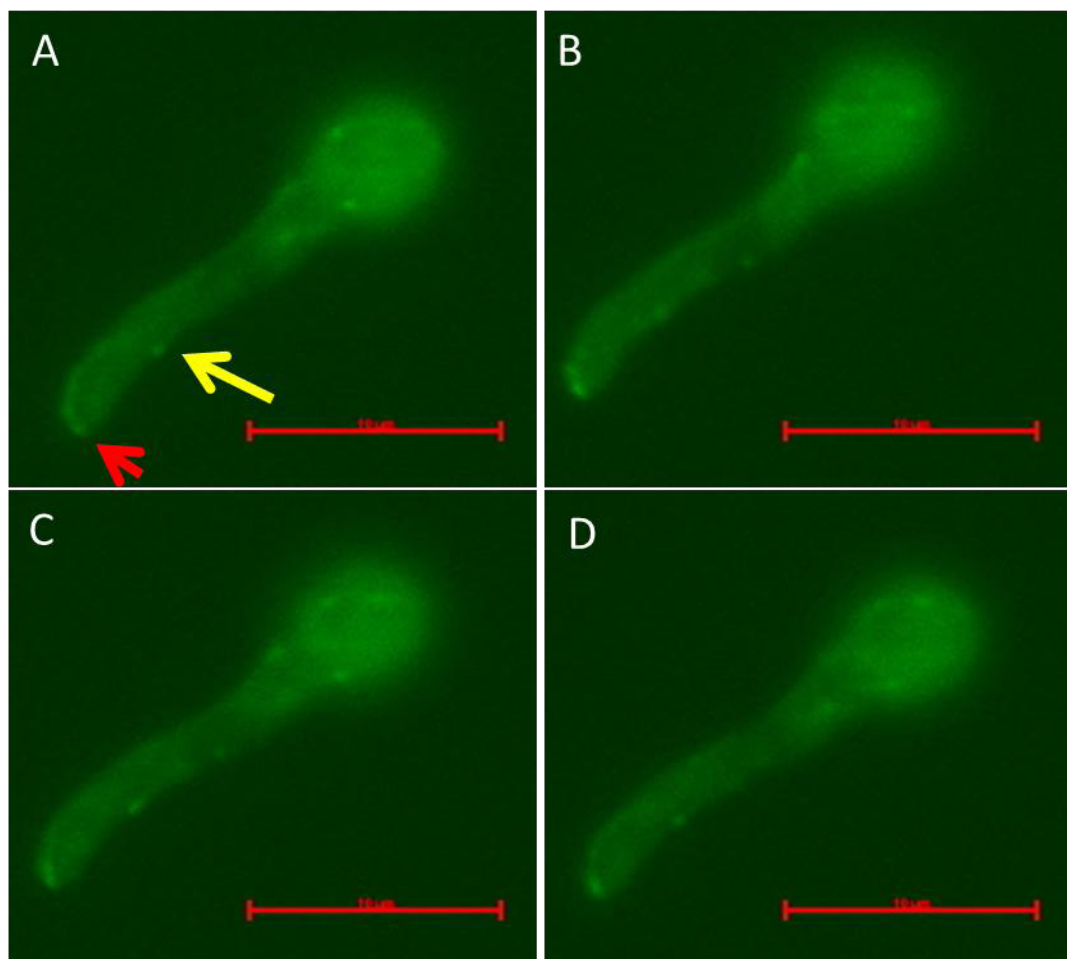


**Abbildung 11: Wachsende Hyphe von *A. nidulans*.** Im verwendeten Stamm wurde die Endoglukanase mit GFP unter dem induzierbaren Promotor *alcA* markiert. Die Hyphe wurde ca. 24h bei Raumtemperatur in threoninhaltigem MM inkubiert, der *alcA*-Promotor also induziert. Deutlich zu erkennen sind einzelne Mikrotubuli sowie eine Ansammlung der markierten Vesikel in der Hyphenspitze, d.h. am Spitzenkörper.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die  $\beta$ -1,4,-endo-Glukanase von *A. nidulans* mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP markiert. Als Promotor wurde das *alcA*-Gen verwendet, so konnte die Expression des fluoreszenzmarkierten Proteins durch verschiedene Kohlenstoffquellen reguliert und direkt mit der Wildtypsituation verglichen werden (s. a. Material und Methoden). Bei Hyphen, die in Induktionsmedium gewachsen waren, konnte der Transport des Enzyms *in vivo* beobachtet werden. Die Glukanase akkumuliert deutlich im

Spitzenkörper, dieser ist als Ansammlung von grün-fluoreszierenden Vesikeln zu erkennen (Abb. 11).

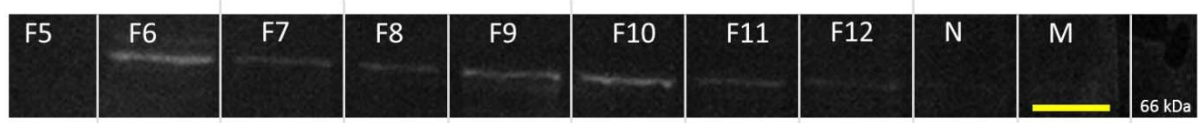
Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte der Transport des Proteins über Mikrotubuli beobachtet werden. Die Mikrotubuli erscheinen grün gefärbt und es konnte eine Bewegung einzelner Vesikel aufgezeichnet werden (Abb. 12). Diese wurden mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von  $1,87 \mu\text{m/s}$  transportiert. Die deutliche Grünfärbung der Mikrotubuli weist auf eine hohe Transportrate der Endoglukanase hin.



**Abbildung 12: Wachsende Hyphe von *A. nidulans*.** Im verwendeten Stamm wurde die Endoglukanase mit GFP unter dem induzierbaren Promotor *alcA* markiert. Die Hyphe wurde ca. 20h bei Raumtemperatur in threoninhaltigem MM inkubiert, der *alcA*-Promotor also induziert. Der gelbe Pfeil markiert ein einzelnes Vesikel, das sich über einen Mikrotubulus bewegt. Der rote Pfeil markiert die Akkumulierung von sekretorischen Vesikeln im Spitzenkörper. Es ist ein Pulsieren des Spitzenkörpers erkennbar, das Signal der sekretorischen Vesikel im Spitzenkörper schwächt zunächst ab, um anschließend wieder stärker sichtbar zu werden. Die einzelnen Aufnahmen wurden im Abstand von jeweils 5 s aufgenommen.

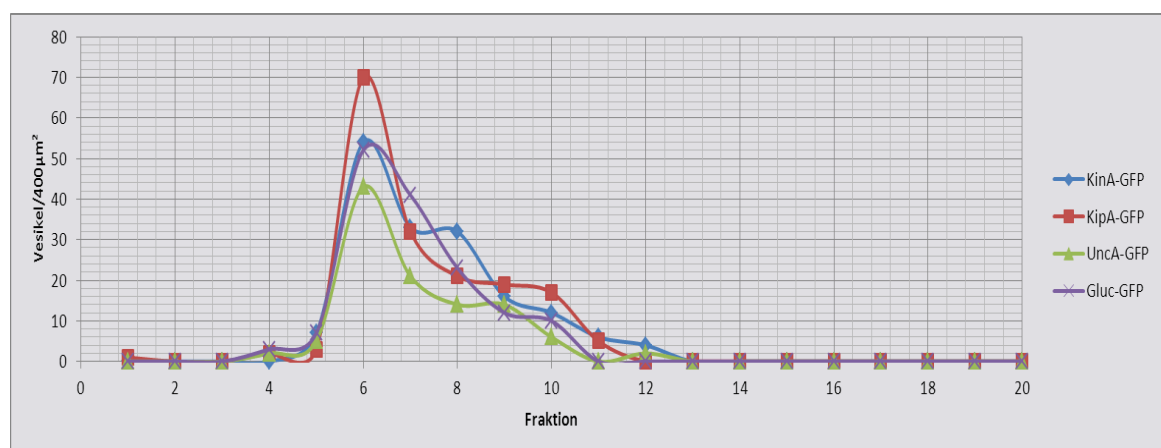
Es konnten stets mehrere Vesikel beim Transport über die Mikrotubuli beobachtet werden (Abb. 12 und Abb. 15). Auch beim transformierten Stamm wurde eine Vesikelisolierung durchgeführt. Im anschließenden Western-Blot wurde deutlich, dass die Endoglukanase in den

gleichen Fraktionen akkumuliert wie die sekretorischen Vesikel (Abb. 13). Dies spricht für den Transport der Endoglukanase in sekretorischen Vesikeln.



**Abbildung 13: Western-Blot.** Geblottet wurden die einzelnen Fraktionen einer Vesikelisolierung eines Stammes von *A. nidulans*, bei dem die Endoglukanase mit GFP markiert wurde. Im SDS-Gel wurden jeweils 15 ng Protein pro Spur geladen. Als primärer Antikörper wurde ein anti-GFP-Antikörper verwendet. Die nachgewiesene Bande liegt etwa bei 75 kDa, dies entspricht der atomaren Masse des Fusionsproteins. Deutlich wird hier, dass das GFP-Signal ab der sechsten Fraktion (F6) auftritt und dann allmählich abschwächt. Ab der 13. Fraktion war kein GFP mehr nachweisbar.

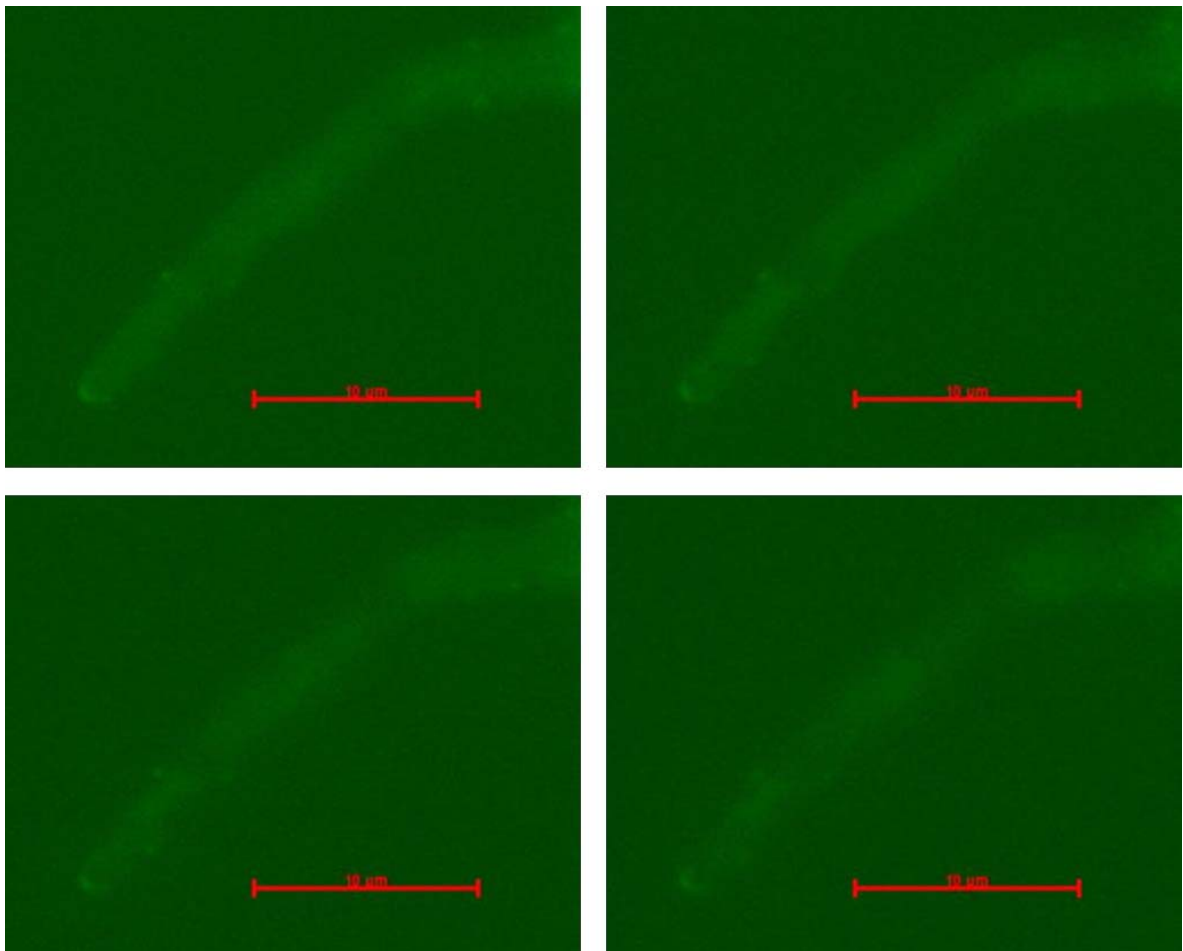
Ein Vergleich der Vesikelisolierung aus unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämmen zeigt deutlich, dass die Vesikel nach Ultrazentrifugation durch den Saccharosegradienten stets in den gleichen Fraktionen akkumulieren. Die drei untersuchten Motorproteine KinA, KipA und UncA liegen in den gleichen Fraktionen vor wie die Endoglukanase. Auch dies spricht für einen aktiven Transport des Enzyms durch Motorproteine über Mikrotubuli.



**Abbildung 14: Vesikelmenge pro Fraktion.** Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die sichtbaren Vesikel in einem klar definierten Bereich ausgezählt. Verwendet wurden sämtliche Fraktionen von Vesikelisolierungen aus Stämmen, in denen verschiedene Proteine mit dem grünfluoreszierenden Protein GFP markiert wurden. Hier wird das Ergebnis aus dem Western-Blot noch einmal bestätigt. In allen untersuchten Stämmen sind zwischen der sechsten und der 13. Fraktion Vesikel unter dem Fluoreszenzmikroskop sicht- und auszählbar.

Sowohl die *in vivo* Untersuchungen der fluoreszenzmarkierten Stämme als auch die anschließenden *in vitro* Experimente mit den isolierten Vesikeln weisen darauf hin, dass Motorproteine am Langstreckentransport der Vesikel durch die Zelle eine wichtige Rolle spielen. *In vivo* konnte dies sowohl bei älteren als auch bei jüngeren Hyphen festgestellt werden. *In vitro* konnte dann ein Transport der isolierten Vesikel über Mikrotubuli nachgewiesen werden. Die Vesikel wurden über mehrere Minuten über die Mikrotubuli transportiert und konnten dabei beobachtet werden. Ein mehrmaliges Abfallen der Vesikel hinderte sie nicht daran, anschließend auf benachbarten Mikrotubuli weiter transportiert zu

werden. Bei Zugabe von AMP-PNP, einer nicht hydrolysierbaren Variante von ATP, konnte ein Festhaften der Vesikel auf den Mikrotubuli beobachtet werden. Bei längerer Dauer des Experiments wurden die Mikrotubuli gleichmäßig und beinahe vollständig von Vesikeln bedeckt. Anschließende Zugabe von ATP löste diesen Zustand auf und es konnte ein erneuter Transport der Vesikel beobachtet werden. Die isolierten Vesikel konnten, wie die artifiziellen Vesikel, d.h. die Latex- und Glaskügelchen verschiedenster Größen und Farben, auch mit anti-Tubulin-Antikörpern beschichtet werden. Auch nach diesem Verfahren waren die Mikrotubuli fast vollständig von Vesikeln bedeckt, dieser Vorgang konnte allerdings nicht rückgängig gemacht werden.

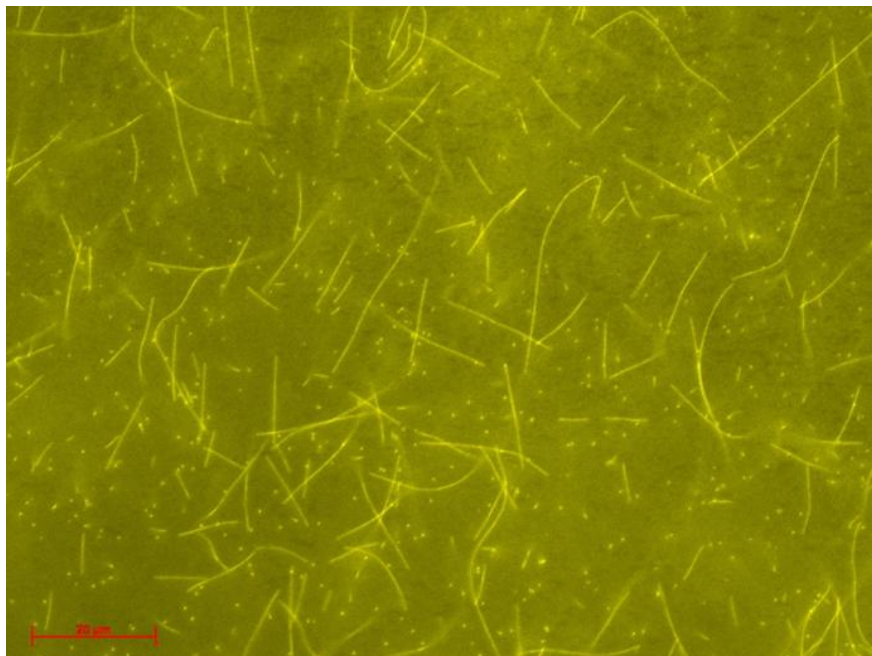


**Abbildung 15: Ältere Hyphe von *A. nidulans*.** Im verwendeten Stamm wurde die Endoglukanase mit GFP unter dem induzierbaren Promotor *alcA* markiert. Die Hyphe wurde ca. 48h bei Raumtemperatur in threoninhaltigem MM inkubiert, der *alcA*-Promotor also induziert. Der Spitzenkörper ist wieder deutlich in der Hyphenspitze zu erkennen. Auch in älteren Hyphen scheint der Spitzenkörper zu pulsieren, d.h. sein Signal wird stärker und schwächt dann wieder ab, um anschließend wieder stärker sichtbar zu werden. Einzelne Vesikel, die zum Spitzenkörper transportiert werden, sind sichtbar.

## Ein nanoskaliges Transportsystem entsteht

### Etablierung der Tubulinisolierung

Es wurden Tubulinproteine aus Schweinehirnen isoliert und dabei ein optimiertes Protokoll nach Williams verwendet (Williams and Lee, 1982). Dabei wird möglichst frisches Hirn benötigt. Die Isolierung des Tubulins basiert hauptsächlich auf der Polymerisation der Tubulin-Untereinheiten bei warmen Temperaturen (ab 35°C) und deren Depolymerisation bei Temperaturen unter 35°C. Polymerisierte Mikrotubuli sedimentieren in einer Ultrazentrifugation im Pellet, während sich die depolymerisierten Tubulin-Einheiten nach der Zentrifugation im Überstand befinden. Im Rahmen der Isolierung wurden die Mikrotubuli durch aufeinander folgende Polymerisations- und Depolymerisationsschritte aufgereinigt. Ein Teil des Tubulins wurde als fluoreszenzmarkiertes Tubulin benötigt, um die Mikrotubuli später unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Tubulinmarkierung wurde nach (Hyman *et al.*, 1991) durchgeführt. Das Tubulin wurde mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert: Mit dem rot fluoreszierenden Rhodamin (Tamra C-1171, Molecular Probes, Invitrogen) (Abb. 18) oder dem gelb fluoreszierenden Fluoreszein Isothiocyanate (F7250, Sigma-Aldrich) (Abb. 16). Die Protokolle der Tubulinmarkierung unterschieden sich dabei in beiden Fällen nicht. Es wurde mit beiden Protokollen eine gleichmäßige Färbung des Tubulins und damit später auch der Mikrotubuli erreicht.

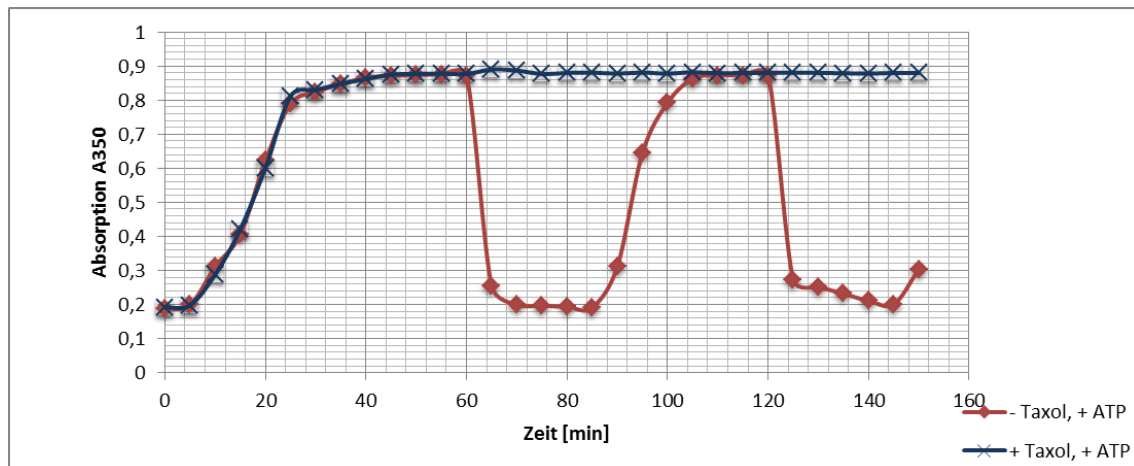


**Abbildung 16: Gelb markierte Mikrotubuli.** Die Markierung des Tubulins kann mit unterschiedlichsten Farbstoffen für Proteine durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl gelbe als auch rote Mikrotubuli verwendet. Die Färbung der Mikrotubuli wirkt sich nicht auf die Folgeversuche aus, sowohl rot als auch gelb gefärbte Mikrotubuli verhalten sich in sämtlichen *in vitro* Versuchen identisch. Für diese Abbildung wurden die Tubulinmonomere zunächst gelb gefärbt und anschließend polymerisiert. Einzelne Mikrotubuli werden so deutlich sichtbar.



### Etablierung der Mikrotubulipolymerisierung

Die Polymerisations- und Depolymerisationsfähigkeit des Tubulins konnte mittels photometrischer Beobachtung problemlos nachgewiesen werden. Die Mikrotubuli konnten beliebig oft durch Inkubation im Wasserbad polymerisiert bzw. durch Inkubation im Eisbad depolymerisiert werden. Auch dies ist ein Zeichen für die Qualität der Mikrotubuli-Präparation.



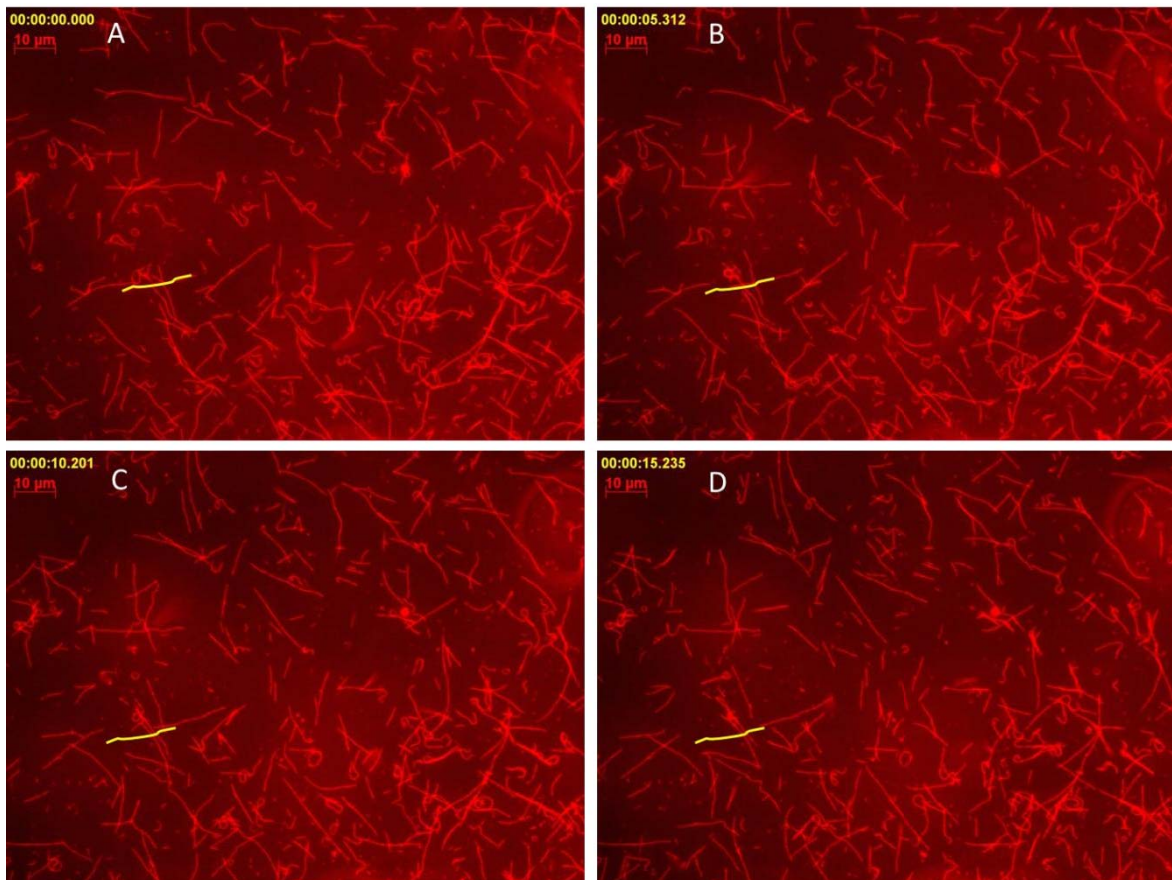
**Abbildung 17: Polymerisationsassay.** Die Absorption bei Licht der Wellenlänge 350 nm unterscheidet sich zwischen polymerisiertem und unpolymerisiertem Tubulin deutlich. Bei diesem Experiment wurde Tubulin zunächst bei 37°C und unter Zugabe von ATP zu Mikrotubuli polymerisiert. Nach 60 min wurde es durch Abkühlen auf Eis wieder zu Tubulin depolymerisiert. Dann konnte es durch Inkubation bei 37°C (ab 85 min) wieder polymerisiert werden. Dieser Vorgang ließ sich beliebig oft wiederholen, nach 120 min wurden die Mikrotubuli wieder auf Eis gekühlt, nach 145 min wieder bei 37°C inkubiert. Bei Zugabe von Taxol depolymerisierten die Mikrotubuli nicht mehr, auch nicht beim Abkühlen auf Eis.

### Test der Kinesinkonstrukte und der Mikrotubuli im Gliding Assay

Die Mikrotubuli wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, unter Zugabe verschiedener Motorproteine (exprimiert in *E. coli* von T. Schunck, Karlsruhe) und ATP für *in vitro* Bewegungsexperimente genutzt. Das Gleiten der Mikrotubuli über den Objektträger konnte mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet, aufgezeichnet und hinsichtlich der Länge und Geschwindigkeit der Mikrotubuli quantitativ ausgewertet werden. Die Mikrotubuli hatten eine durchschnittliche Länge von etwa 13  $\mu\text{m}$  und bewegten sich mit einer Geschwindigkeit von etwa 1,3  $\mu\text{m/s}$  über den Objektträger. Besonders wichtig bei diesen Experimenten war die Verwendung von frischem Enzymmix (BME, GOD, CAT). Bei Untersuchungen ohne Verwendung von Enzymmix konnte eine extrem schnelle Abnahme der Fluoreszenz der Mikrotubuli beobachtet werden. Auch die verwendeten Motoren hatten einen großen Einfluss auf die Bewegung der Mikrotubuli, waren sie nicht frisch, so konnte lediglich ein Zucken der Mikrotubuli, nicht aber deren zielgerichtete Bewegung, beobachtet werden. Kinesinmutanten mit fehlender Schwanzdomäne hafteten zudem nicht am Deckglas, eine Bewegung der Mikrotubuli konnte daher nur beobachtet werden, wenn vollständige Motoren verwendet



wurden bzw. die Motoren mittels einer Hexa-Histidin-Markierung sowie Phospholipiden mit gebundener Nickel-NTA auf dem Objektträger gehalten wurden.



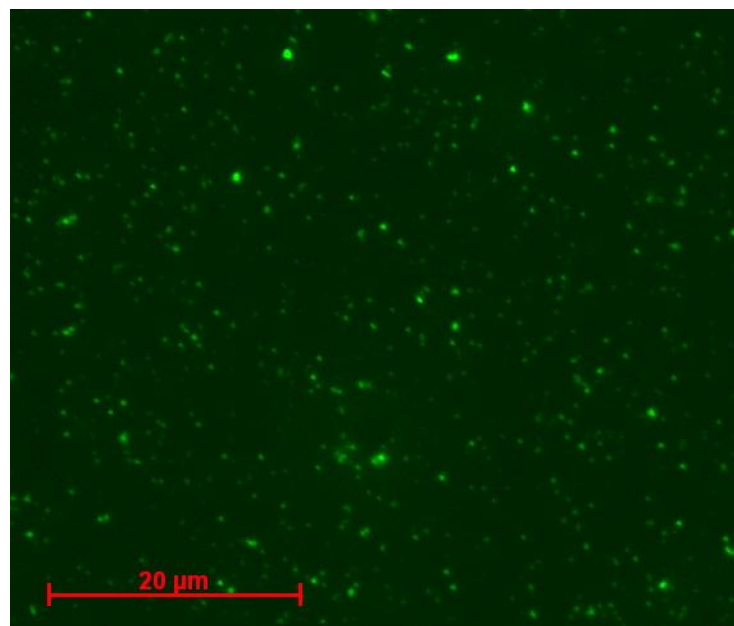
**Abbildung 18: Gliding Assay.** Bei diesem Experiment wird die Oberfläche des Objektträgers zunächst mit funktionalem Kinesin (in diesem Fall kinA aus *A. nidulans*) beschichtet. Das Kinesin bindet innerhalb von fünf Minuten fest an den Objektträger. Werden nun polymerisierte und fluoreszenzmarkierte Mikrotubuli und ATP in Puffer hinzugegeben, kann eine Bewegung der Mikrotubuli über die Oberfläche beobachtet und aufgezeichnet werden. Die gelbe Markierung kennzeichnet einen einzelnen Mikrotubulus zum Startpunkt der Aufzeichnung. Die Geschwindigkeit der Mikrotubulibewegung variiert in diesem Experiment je nach Temperatur, verwendetem Kinesin und der zugesetzten Menge an ATP.

### Etablierung der Vesikelisolierung

Im polaren Wachstum von *A. nidulans* kommt dem spezifischen Transport von sekretorischen Vesikeln eine große Bedeutung zu. Seit den späten siebziger Jahren wurden Chitosomen in vielen verschiedenen Pilzarten erfolgreich isoliert und untersucht (Leal-Morales *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Dissertation konnten Chitosomen und andere sekretorische Vesikel aus *A. nidulans* isoliert und untersucht werden.

Die meisten der zur Chitosomenisolierung verwendeten Protokolle basieren auf einem Zellaufschluss und einer anschließenden Auftrennung des Zellextraktes in die unterschiedlichen Kompartimente durch eine Ultrazentrifugation über einen Saccharose-

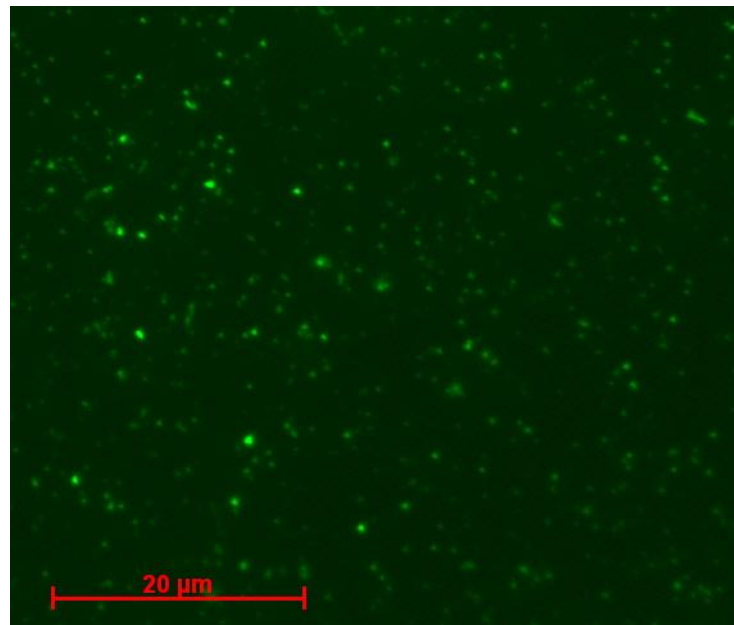
Gradienten. Dabei variieren Zentrifugationszeiten und Gradientenzusammensetzung stark. Die Ultrazentrifugationszeit variiert von 21 h (Leal-Morales *et al.*, 1988) bis 30 min (Kang and Cabib, 1986), die Konzentration der Saccharose-Gradienten liegt stets zwischen 5% und 70%, allerdings verwenden einige Autoren Stufengradienten, während andere lineare Saccharose-Gradienten zur Chitosomenisolierung bevorzugen (Mouriño-Pérez *et al.*, 2006). Es wurden verschiedene Protokolle getestet, die der Isolierung von Chitosomen und anderen sekretorischen Vesikeln aus unterschiedlichen filamentösen Pilzen dienen. Diese Protokolle wurden an *A. nidulans* angepasst und optimiert. Das daraus entstehende Protokoll ist einem Protokoll zur Isolierung von Peroxisomen aus *Neurospora crassa* recht ähnlich (Schliebs *et al.*, 2006).



**Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Vesikelisolierung.** Gezeigt ist hier die unverdünnte sechste Fraktion einer Vesikelisolierung aus einem Stamm von *A. nidulans*, in dem das Motorprotein KinA mit GFP fusioniert ist. Deutlich sichtbar sind hier unterschiedlich große Vesikel. Wahrscheinlich werden unterschiedliche Vesikel von unterschiedlich vielen Motorproteinen transportiert.

Nach Ultrazentrifugation des Zellextraktes über einen stufenweisen Saccharosegradienten von 60% (w/v) bis 30% (w/v) Saccharosekonzentration für 2 h bei 4°C mit 100.000 g konnte eine Fraktion in allen untersuchten Stämmen als ca. 0,75 cm dicke dunkle Bande erkannt werden. Diese Bande ist ein charakteristisches Zeichen der Chitosomenfraktionen (Kamada *et al.*, 1991). Sie lag - je nach Konzentration des verwendeten Gradienten - stets im unteren Drittel des Zentrifugenröhrchens. Wurde der Gradient von unten nach oben mit einer Peristaltikpumpe in Schritten von 1 ml fraktioniert, konnten ungefähr 25 Fraktionen gewonnen werden, wobei die Chitosomenbande etwa in die Fraktionen 6-9 einging. Mit Spritze und dünner Kanüle konnte die Bande auch vorsichtig direkt aus dem Gradienten gezogen werden. Sowohl bei wesentlich längeren als auch bei wesentlich kürzeren Zentrifugationszeiten als 2 h

wurde die Bande nicht deutlicher. Bei einer Zentrifugationszeit von 30 min war keine Bande sichtbar. Die zunächst erprobte Verwendung eines linearen Gradienten mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen brachte keinen Erfolg. Nach der 2-20 h dauernden Ultrazentrifugation konnten weder verschiedene Saccharosekonzentrationen, noch eine oder mehrere Interphasen visuell differenziert werden. Auch das Beladen des linearen Gradienten war nicht so problemlos wie das Beladen des Stufengradienten. Nachdem der Zellextrakt auf den Stufengradienten pipettiert wurde, war er dort - je nach niedrigster Konzentration des Gradienten - gut als abgesetzte Phase sichtbar. Auch beim linearen Gradienten konnte eine abgesetzte Phase beobachtet werden, allerdings nicht so deutlich wie beim Stufengradienten.



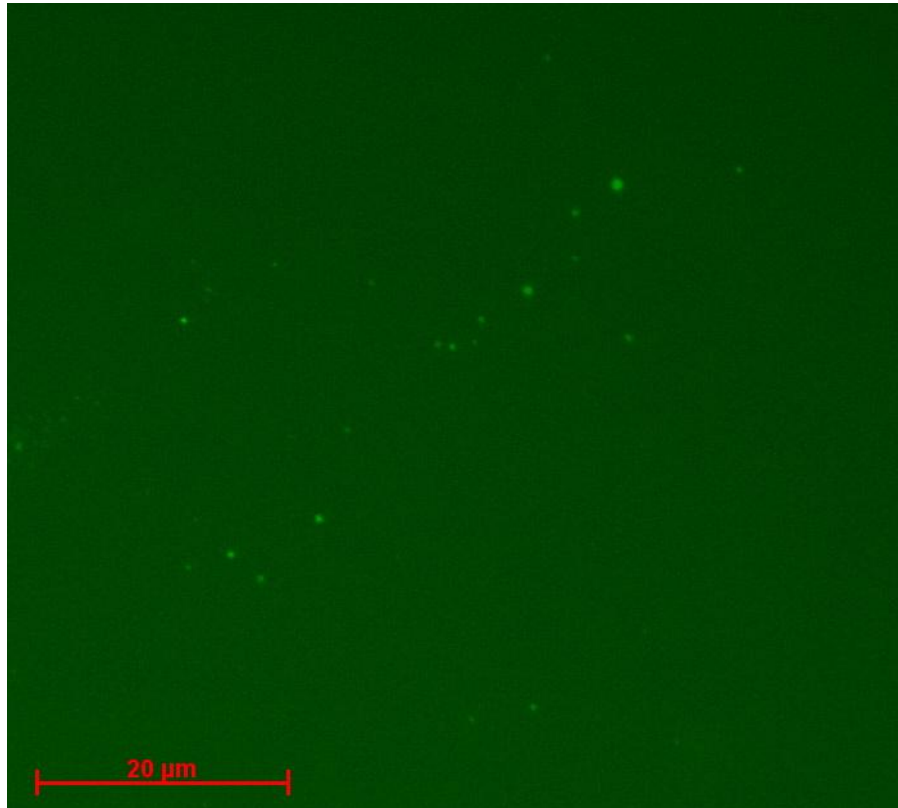
**Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Vesikelisolierung.** Gezeigt ist hier die unverdünnte sechste Fraktion einer Vesikelisolierung aus einem Stamm von *A. nidulans*, in dem das Enzym Endoglukanase mit GFP fusioniert ist. Deutlich sichtbar sind hier unterschiedlich große Vesikel.

Die untersuchten Stämme von *A. nidulans* unterschieden sich hinsichtlich der Chitosomenbande nicht. Bei allen Stämmen war nach der Ultrazentrifugation eine dunkle Bande im unteren Drittel des Zentrifugenröhrchens sichtbar.

Die Zeit im Induktionsmedium hatte keinen Einfluss auf die Qualität der Chitosomenfraktionen, auch ein Überimpfen der Kulturen von Minimalmedium auf Induktionsmedium änderte die Fraktionen nicht.

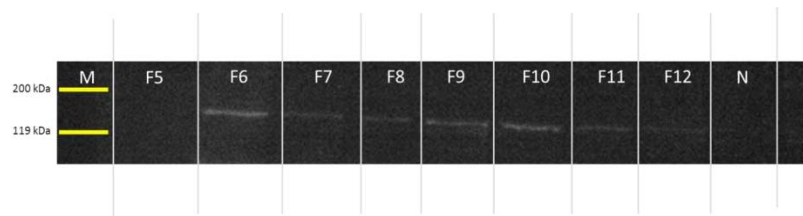
Es wurden Vesikelisolierungen bei verschiedenen *A. nidulans*-Stämmen durchgeführt. Stets war ein Protein mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP markiert. Sowohl Stämme, in denen Motorproteine mit GFP markiert waren, als auch Stämme, in denen andere Proteine,

die vermutlich zum Spitzenkörper transportiert werden, markiert waren, wurden zur Vesikelisolierung verwendet.



**Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Vesikelisolierung.** Gezeigt ist hier die zehnte Fraktion einer Vesikelisolierung aus einem Stamm von *A. nidulans*, in dem das Enzym Endoglukanase mit GFP fusioniert ist. Deutlich sichtbar sind hier unterschiedlich große Vesikel, diese allerdings in wesentlich geringerer Anzahl als in der sechsten Fraktion. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den Stämmen, in denen andere Proteine markiert wurden. Die verwendete Verdünnung entspricht der Verdünnung, in der die sechste Fraktion mikroskopiert wurde.

Die unterschiedlichen Fraktionen der Vesikelisolierungen wurden anschließend im Fluoreszenzmikroskop sowie mittels Western-Blot näher untersucht. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen festgestellt werden. Die größte Menge an markierten Vesikeln fand sich stets in der sechsten und siebten Fraktion. Dies war bei allen untersuchten Stämmen von *A. nidulans* der Fall. Unter dem Mikroskop wurde die Vesikelmenge durch Auszählen der Vesikel, die sich in einer vorher definierten Fläche befanden, festgestellt.



**Abbildung 22: Western-Blot einer Vesikelisolierung.** In diesem Fall wurde die Vesikelisolierung in einem Stamm durchgeführt, in dem das konventionelle Kinesin mit GFP markiert wurde. Je Spur wurden in der SDS-PAGE 15 ng Protein geladen. Deutlich sichtbar ist die höchste Konzentration des Fusionsproteins in der sechsten Fraktion. Anschließend nimmt die Konzentration allmählich ab. Motorproteine und assoziierte Vesikel wurden in den gleichen Fraktionen nachgewiesen.

Im Western- und Dot-Blot wurden die isolierten Vesikelfractionen direkt verdünnt oder unverdünnt verwendet. Mit allen drei Verfahren konnten die gleichen Zusammenhänge hergestellt werden. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die meisten sekretorischen Vesikel und ihre Motorproteine in der sechsten Fraktion vorhanden sind. Auch in den folgenden Fraktionen finden sich noch einige Vesikel, deren Anzahl jedoch von Fraktion zu Fraktion weiter abnimmt.



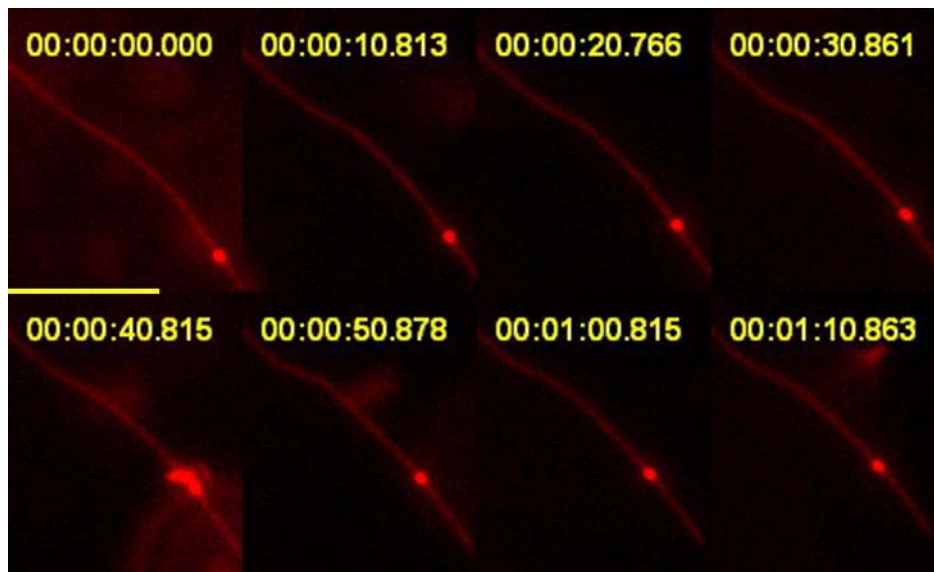
**Abbildung 23: Dot-Blot einer Vesikelisolierung aus einem Stamm mit GFP-markiertem konventionellen Kinesin.** Der Dot-Blot diente dem schnellen Nachweis eines GFP-Signals in verschiedenen Fraktionen. Die Fraktionen wurden unverdünnt direkt nach ihrer Isolierung aufgetropft. Es wurde jeweils 20  $\mu$ l der Originalfraktion verwendet. Auch im Dot-Blot wurde das GFP-Signal zwischen der sechsten und der 13. Fraktion detektiert, die Ergebnisse aus den Western-Blots wurden also bestätigt.

### Verschiedene Vesikel in künstlichen Transportsystemen

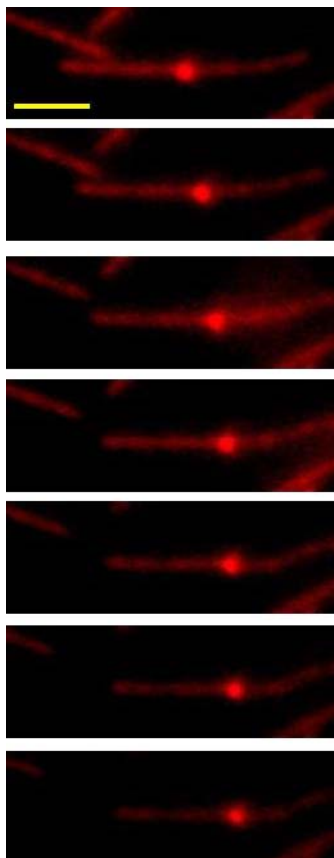
Die isolierten Vesikel wurden, genau wie Latexkügelchen mit unterschiedlichen Durchmessern als künstliche Vesikel auch, als Transportgüter in künstlichen Transportsystemen eingesetzt. Es wurden unterschiedlichste Versuche durchgeführt. Die Vesikel konnten mit Kinesinen beschichtet und über mit anti-Tubulin-Antikörpern fixierte Mikrotubuli transportiert werden. Bei diesen Versuchen wurde die Geschwindigkeit der Vesikel gemessen, im Falle der



künstlichen Vesikel betrug sie durchschnittlich  $1,23 \mu\text{m/s}$ . Die aus *A. nidulans* isolierten Vesikel konnten nur über eine kurze Strecke beim Transport beobachtet werden, danach fielen sie von den Mikrotubuli ab bzw. wurde ihr Fluoreszenzsignal bis zur Auflösungsgrenze abgeschwächt.



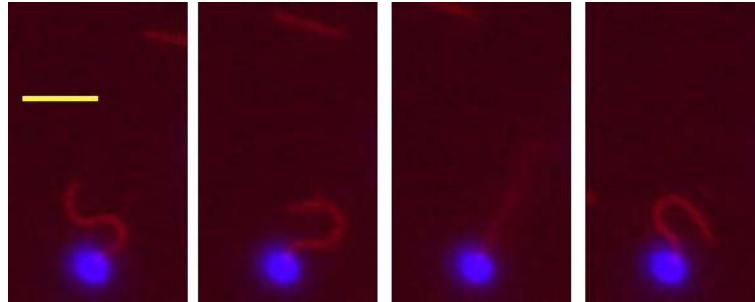
**Abbildung 24: Transport eines Latexkügelchens über einen einzelnen Mikrotubulus.** Es ließen sich einzelne Kügelchen beobachten, die über einzelne Mikrotubuli transportiert wurden. Die Latexkügelchen wurden in diesem Fall mit KinA beschichtet und die Mikrotubuli mit anti-Tubulin-Antikörpern auf der Glasoberfläche fixiert. Nach Zugabe von ATP konnte eine Bewegung der Kügelchen aufgezeichnet werden. Die Beobachtung war meist nur bei einzelnen Kügelchen möglich, viele Kügelchen fielen nach einigen Sekunden Bewegung über die Mikrotubuli von diesen herunter, um anschließend auf einem benachbarten Mikrotubulus erneut transportiert zu werden. Der Größenmaßstab entspricht  $7 \mu\text{m}$ .



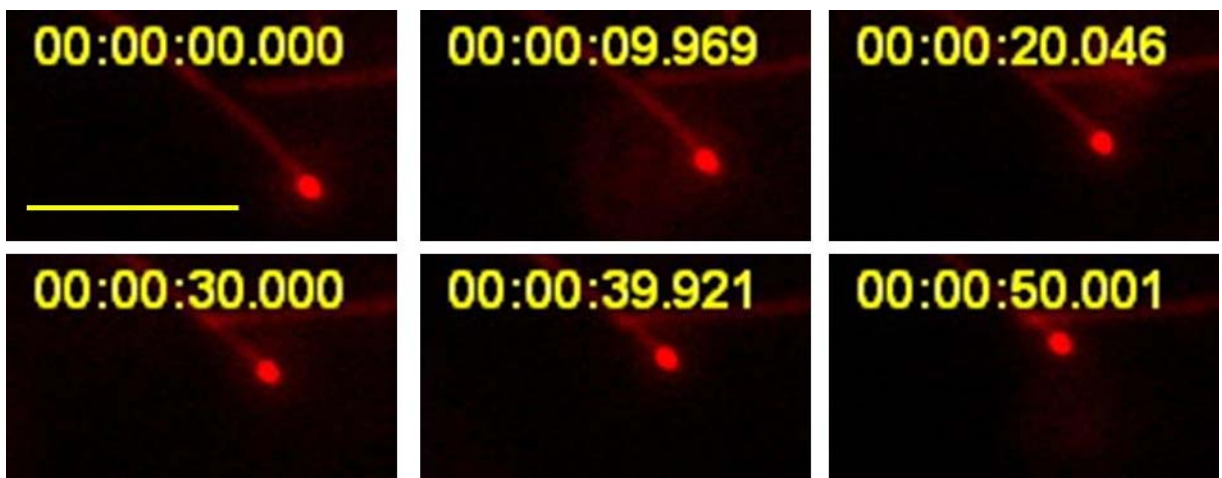
Dieses System konnte auch herumgedreht und die Mikrotubuli mitsamt gebundenen Vesikeln transportiert werden. In dieser Versuchsanordnung wurden die künstlichen Vesikel mit anti-Tubulin-Antikörpern beschichtet und an die Mikrotubuli gebunden. Die Mikrotubuli wurden dann auf einen Objektträger pipettiert, der vorher mit funktionalen Motorproteinen beschichtet wurde. In diesem Fall konnte ein Transport der Vesikel durch die gleitenden Mikrotubuli beobachtet werden. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Mikrotubuli betrug in diesem Fall  $1,45 \mu\text{m/s}$ . Die Vesikel waren durch die Antikörper fest an die Mikrotubuli gebunden, ein Abfallen der Vesikel konnte nicht beobachtet werden.

**Abbildung 25: Transport eines Mikrotubulus mit gebundenem Latexkügelchen.** Der Größenmaßstab entspricht  $3 \mu\text{m}$ . Die Oberfläche des Objektträgers wurde mit funktionalem, konventionellem Kinesin aus *A. nidulans* beschichtet. Die Mikrotubuli wurden mit anti-Tubulin-Antikörper-beschichteten Latexkügelchen mit einem Durchmesser von  $1 \mu\text{m}$  gemischt, bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit ATP-haltigem Puffer auf den beschichteten Objektträger gespült.

Wurden Vesikel mit einem Durchmesser von mehr als  $1\ \mu\text{m}$  verwendet, so konnten diese nicht mehr von einem einzelnen Mikrotubulus transportiert werden. Ein Transport dieser größeren Vesikel durch mehrere parallele Mikrotubuli konnte in seltenen Ausnahmefällen beobachtet werden. In entsprechender Verdünnung wurden die Mikrotubuli jedoch an die Latexkügelchen gebunden und konnten diese nicht mehr fortbewegen.



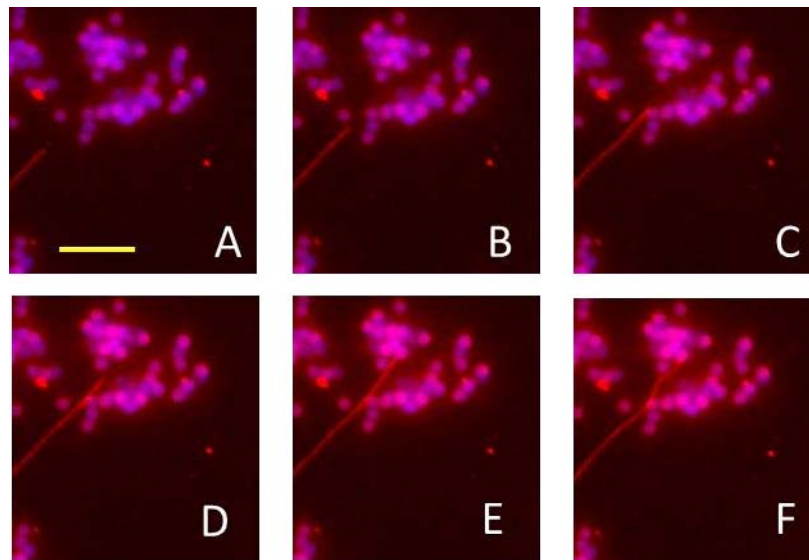
**Abbildung 26: Bindung eines Mikrotubulus an ein immobiles Latexkügelchen.** Die Latexkügelchen hatten einen Durchmesser von  $2\ \mu\text{m}$  und wurden mit konventionellem Kinesin mit einer Rigormutation beschichtet. Anschließend wurden sie auf einem Objektträger pipettiert. Nach Zugabe von rot gefärbten Mikrotubuli und ATP konnte eine Bindung der Mikrotubuli an die Kügelchen beobachtet werden. Der Mikrotubulus wurde mit der Spitze an das Kügelchen gebunden und dadurch ebenfalls immobilisiert. Der Größenmaßstab entspricht  $4\ \mu\text{m}$ , die Bilder wurden in einem Abstand von jeweils  $5\ \text{s}$  zueinander aufgenommen.



**Abbildung 27: Transport eines einzelnen Latexkügelchens über einen einzelnen Mikrotubulus.** Der Versuchsaufbau ist wie bei Abb. 24, hier wurde allerdings das menschliche Kinesin Kif5a zur Beschichtung der Latexkügelchen verwendet. Auch in diesem Experiment konnte ein Herunterfallen mit anschließender Wiederaufnahme des Transports auf einem anderen Mikrotubulus beobachtet werden. Einzelne Kügelchen konnten jedoch, wie hier gezeigt, bei einem längeren Transport über die Mikrotubuli beobachtet werden. Der Größenmaßstab entspricht  $10\ \mu\text{m}$ .

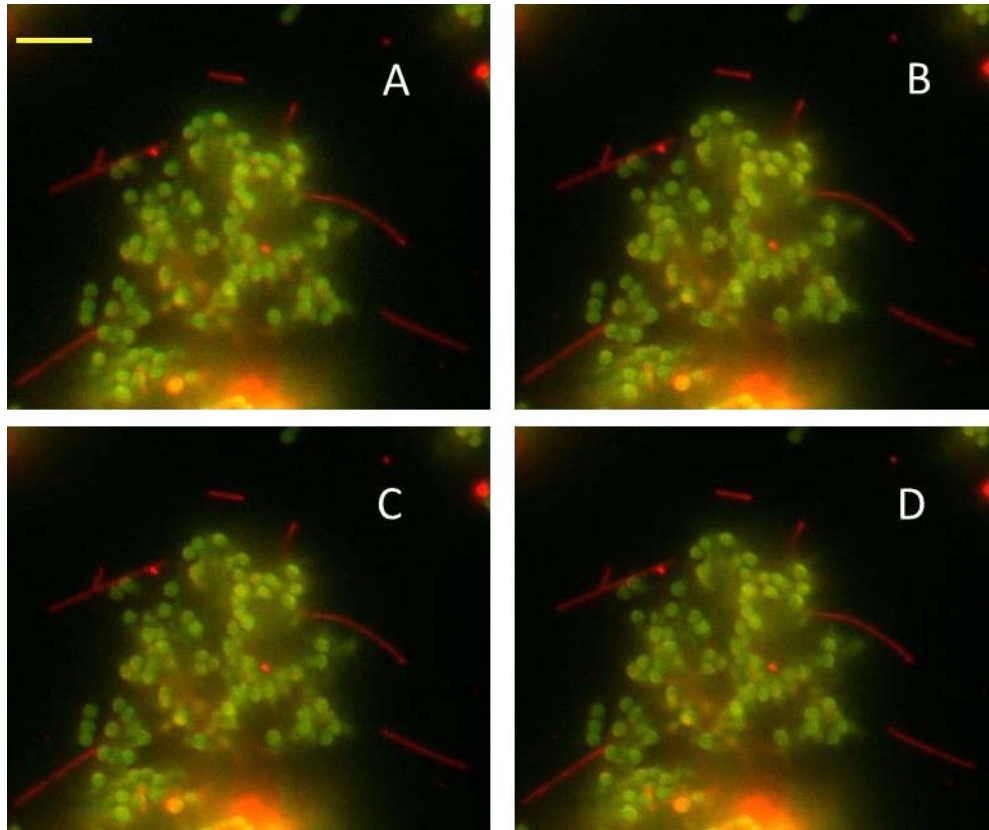
Wurden die Latexkügelchen in niedrigerer Verdünnung eingesetzt, konnte eine Agglutinierung beobachtet werden. Durch dieses Verhalten wurde eine Änderung der Mikrotubulibewegung erzielt: Die Mikrotubuli wurden durch die natürlichen Hindernisse deutlich sichtbar in ihrer Bewegung gehindert. Es konnte ein Transport der Mikrotubuli zwischen den Hindernissen hindurch beobachtet werden. Die Mikrotubuli wurden dabei von den Latexkügelchen

abgelenkt, es konnte ein regelrechtes Anstoßen vor der Richtungsänderung der Mikrotubuli beobachtet werden. Durch die vorherige Beschichtung der Latexkügelchen mit anti-Tubulin-Antikörpern konnten die agglutinierten Kügelchen als Fallen für die Mikrotubuli verwendet werden. Diese wurden an die Kügelchen gebunden und waren anschließend unfähig zur weiteren Bewegung.



**Abbildung 28: Agglutinierte Latexkügelchen als Hindernisse für Mikrotubuli.** In diesem Versuchsaufbau gleitet ein einzelner Mikrotubulus in ein Gebilde aus mehreren Latexkügelchen hinein. Die Kügelchen wirken als räumliches Hindernis. Es kann eine deutliche Richtungsänderung der Mikrotubuli beobachtet werden. Der Größenmaßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ , die Bilder wurden im Abstand von jeweils 5 s aufgenommen.

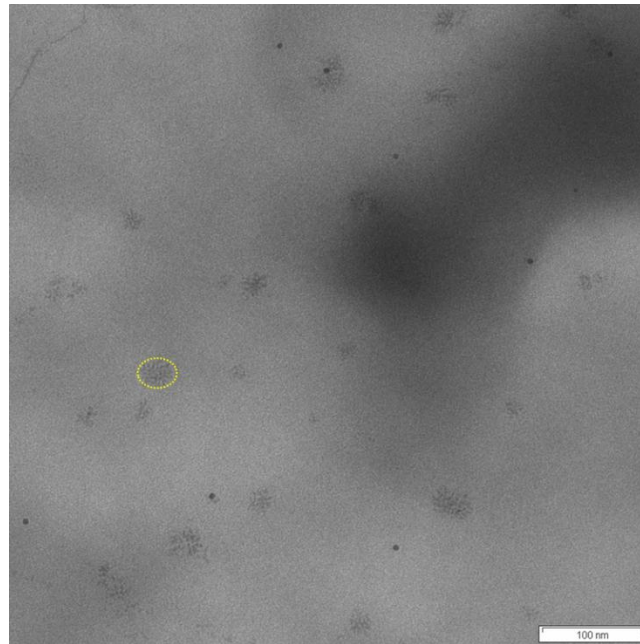




**Abbildung 29: Beschichtete Latexkugeln als Falle für Mikrotubuli.** Die Latexkugeln wurden mit anti-Tubulin-Antikörpern beschichtet. Glitten Mikrotubuli in das Gebilde hinein, waren sie anschließend angeheftet und damit bewegungsunfähig. Außerhalb des Kugelengebilde konnte eine Bewegung der Mikrotubuli wie in den anderen Experimenten beobachtet werden. Der Größenmaßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ , die Aufnahmen wurden im Abstand von 5 s aufgenommen.

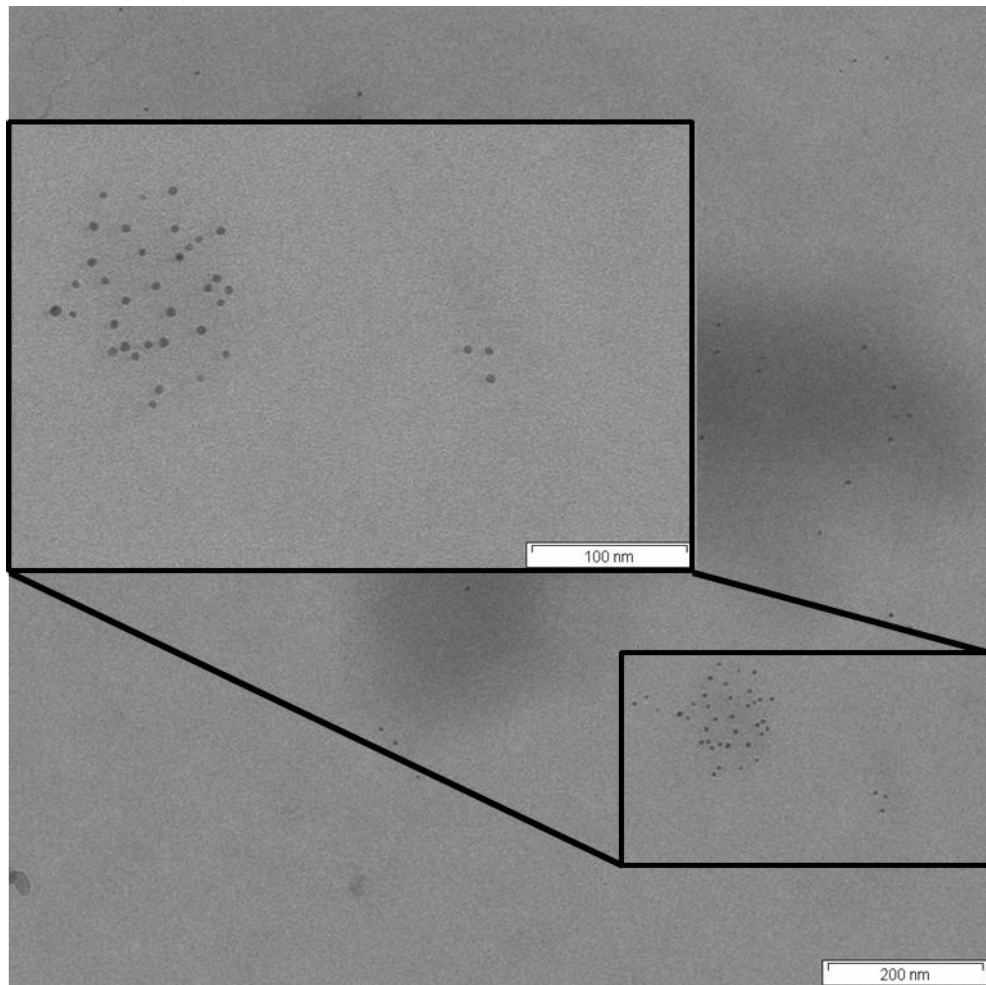
### Elektronenmikroskopie

Die Vesikelfractionen wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie (LEM) am KIT näher untersucht. Hierzu wurden die Vesikelfractionen, in denen durch Dot- oder Western-Blot bereits die Motorproteine nachgewiesen werden konnten, mit anti-GFP-Goldpartikeln markiert. Das angewandte Verfahren ähnelt dem eines Western-Blots. Die vesikelhaltige Probe wurde in unterschiedlichen Verdünnungen direkt auf einen Probenhalter zur Elektronenmikroskopie aufgetropft, mit Glutaraldehyd fixiert, dehydratisiert und dann wie unter Material und Methoden beschrieben weiter behandelt.

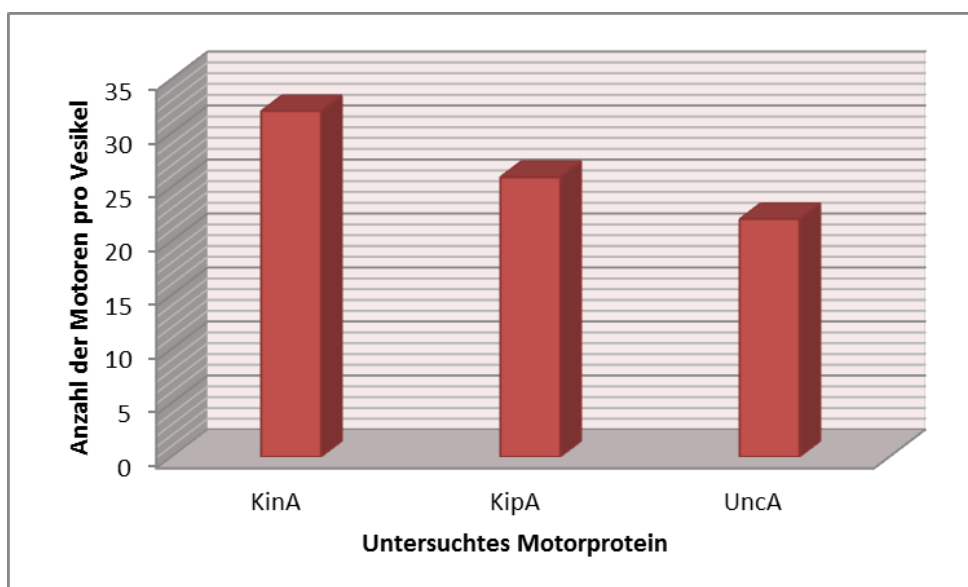


**Abbildung 30: TEM-Aufnahme einer Vesikelfraktion.** Die verwendete Vesikelfraktion war die sechste Fraktion einer Isolierung von Vesikeln aus einem Stamm, in dem das Motorprotein KinA mit GFP markiert war. Die Vesikelfraktion wurde unverdünnt auf einen Probenhalter aufgetropft, mit anti-GFP-Antikörper und anschließend mit goldpartikelhaltigem Sekundärantikörper behandelt. In dieser Aufnahme sind mehrere einzelne Vesikel sichtbar, an denen viele Motorproteine, die mit Goldpartikeln markiert und damit sichtbar gemacht wurden, zu sehen sind. Ein Vesikel wurde durch die gelbe gestrichelte Umrandung herausgehoben. Durch diese Methode sind die Vesikel nicht direkt sichtbar, wohl aber die ihnen anhängenden Motorproteine. Das Experiment lässt daher Rückschlüsse auf die Anzahl der assoziierten Motorproteine zu.

Das verwendete Transmissionselektronenmikroskop der Firma Carl Zeiss konnte die einzelnen Goldpartikel detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass an einzelnen Vesikeln stets mehrere Motorproteine gebunden waren. Die Anzahl der an ein einzelnes Vesikel gebundenen Motorproteinen variierte jedoch von Präparation zu Präparation und von Motorprotein zu Motorprotein stark. Die Vesikelfraktionen wurden möglichst frisch für die Elektronenmikroskopie vorbereitet sowie stets auf Eis aufbewahrt, allerdings vergingen zwischen Vesikelisolierung und Elektronenmikroskopie stets einige Stunden. Vermutlich verlieren in diesem Zeitraum einige Motoren ihre Bindung an die Vesikel. Auch in der aufwändigen Vorbereitung für das TEM gingen sehr wahrscheinlich viele Motoren verloren. Die tatsächliche Anzahl der Motoren pro Vesikel dürfte also *in vivo* deutlich höher sein als bei den *in vitro*-Untersuchungen gefunden wurden.



**Abbildung 31: Vergrößerung eines einzelnen Vesikels.** Diese Aufnahme wurde so präpariert, wie bei Abb. 30 beschrieben. Deutlich sichtbar sind hier mehrere Goldpartikel, die alle an einem in dieser Aufnahme nur undeutlich sichtbaren Vesikel gebunden sind. Jeder Goldpartikel ist an ein einzelnes Kinesinmolekül gebunden. Der obere Kasten ist eine Vergrößerung des unteren Ausschnitts.



**Abbildung 32: Durchschnittliche Anzahl der Motorproteinmoleküle pro Vesikel.** Die Anzahl der gebundenen Goldpartikel je Vesikel wurde manuell ausgezählt. Es wurden jeweils 100 Vesikel ausgewertet.

## Diskussion

### Isolierung und Charakterisierung sekretorischer Vesikel

#### Sekretion in *A. nidulans* und anderen filamentösen Pilzen

In *in vitro*-Experimenten wachsen und schrumpfen Mikrotubuli kontinuierlich, sie befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht. Da die sekretierten Proteine in *A. nidulans* und anderen filamentösen Pilzen über das Mikrotubuli-Zytoskelett in Richtung Peripherie transportiert werden, sind Mikrotubuli *in vivo* am Minusende stabilisiert und schrumpfen und wachsen hauptsächlich am Plusende dynamisch. In den meisten höheren Eukaryoten entstehen Mikrotubuli am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC), ihr Plusende wächst dabei in Richtung Zellperipherie (Keating and Borisy, 1999). In *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass zytoplasmatische MTOCs sowie MTOCs, die mit Septen assoziiert sind, verantwortlich für die Bildung und Aufrechterhaltung des Mikrotubulinetzwerkes innerhalb der Zelle sind (Veith *et al.*, 2005). Die Mikrotubuli sind entlang der Längsachsen orientiert (Höög and Antony, 2007). Um die Sekretion verschiedenster Proteine in *A. nidulans* und anderen filamentösen Pilzen zu verstehen, wird derzeit intensiv an der Mikrotubuli dynamik inner- und außerhalb von Zellen geforscht. Verschiedene Proteine, die sich am Plusende wachsender Mikrotubuli sammeln, regulieren die Dynamik der Mikrotubuli und sind sehr wichtig für die Interaktion von Mikrotubuli und Cortex (Akhmanova and Hoogenraad, 2005) (Efimov *et al.*, 2006). Diese Proteine stehen daher im Zentrum des Interesses vieler Untersuchungen. Wichtig für das Wachstum des Pilzes sind Mikrotubuli hauptsächlich als Transportwege für verschiedene, im Zellinneren sekretierte Proteine. Die Proteine werden über die Mikrotubuli an ihren Bestimmungsort, die Zellperipherie, transportiert.

Hyphenwachstum von filamentösen Pilzen ist ein komplizierter und stark regulierter Komplex, der durch viele verschiedene Prozesse beeinflusst wird. Die Zellwand wird synthetisiert und geformt, die Membran wird transportiert und stetig vergrößert, das Zytoplasma bewegt sich und viele andere Prozesse laufen stetig ab (Torralba and Heath, 2001) (Virag and Harris, 2006). In der Hyphenspitze lässt sich eine Struktur ausmachen, die für das Spitzenwachstum mit verantwortlich ist: der Spitzenkörper. Er besteht aus akkumulierten Vesikeln und bestimmt die Wachstumsrichtung der Hyphe (Grove and Bracker, 1970) (Riquelme *et al.*, 1998). Seine genaue Struktur und Organisation konnte bis heute nicht genau geklärt werden. Es wird allerdings vermutet, dass er als vesicle supply center für die wachsende Hyphe dient. Nach diesem Modell werden Vesikel zum Spitzenkörper über Mikrotubuli transportiert, um dort über Aktinfilamente zum Zellkortex weitertransportiert zu werden. Beweise für dieses Modell gibt es zum derzeitigen Zeitpunkt nicht, wohl aber deutliche Hinweise. Werden Mikrotubuli in

der lebenden Zelle durch Benomyl oder ähnliche Reagenzien gestört, so ist der intrazelluläre Vesikeltransport deutlich eingeschränkt (Howard and Aist, 1980) (Howard, 1981). Auch durch eine Beeinflussung der beteiligten Motorproteine wird dieses Modell gestützt. Wird das konventionelle Kinesin in *A. nidulans* oder *N. crassa* deletiert, so wird die Wachstumsrate der Pilze deutlich eingeschränkt (Seiler *et al.*, 1997) (Requena *et al.*, 2001). In *N. crassa* konnte in diesen Mutanten die Spitzenkörperstabilität und die Proteinsekretion als deutlich eingeschränkt beobachtet werden (Seiler *et al.*, 1997) (Seiler *et al.*, 1999). Dies deutet darauf hin, dass in filamentösen Pilzen der Vesikeltransport ähnlich reguliert wird wie der axonale Transport in Neuronen. Es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass exozytische Vesikel am Spitzenkörper akkumulieren und von dort zur Membran transportiert werden (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). An der Membran, einige Mikrometer hinter der wachsenden Hyphenspitze, werden die Proteine durch Endozytose wiederverwertet. Daher sind Exo- und Endozytose wichtige Prozesse für das Hyphenwachstum filamentöser Pilze. An der Hyphenspitze übernehmen wahrscheinlich Aktinfilamente den Transport zur Membran. Das Aktinzytoskelett in filamentösen Pilzen ist deutlich schwächer ausgeprägt als das Mikrotubulinetzwerk. Es wird daher angenommen, dass Aktin wichtig für die Sekretion der Proteine ist, aber alleine nicht ausreicht, um ein Wachstum der Hyphe zu ermöglichen (Wendland and Philippsen, 2001) (Basilana and Arkowitz, 2006).

Experimente mit verschiedenen Proteinen weisen auf einen eventuell vorhandenen alternativen Transportweg der Proteine zum Spitzenkörper hin. So existieren in einigen eukaryotischen Zellen auch Transportwege ohne ein funktionierendes Golgi/ER-System, über die beispielweise Proteine wie FGF-1, FGF-2, Galectin-1 und *Leishmania* HASPB transportiert werden (Nickel, 2003). In diesen Fällen gibt es in der Plasmamembran der Zelle bestimmte Transporter, die für den Transport der Proteine verantwortlich sind. Eine andere Möglichkeit des unkonventionellen Proteintransports besteht auch in der Auflösung der Membran und dem dadurch bedingten Freisetzen der Proteine (Nickel, 2005). Andere Autoren gehen davon aus, dass die Proteine zufällig durch die Zelle transportiert werden oder diffundieren und ihren Zielort durch bestimmte kurze Proteinsequenzen erkennen (Rayner and Pelham, 1997). Bei einigen alternativen Transportwegen spielt Ubiquitin eine entscheidende Rolle. Ubiquitinierte Membranproteine werden in vielen Fällen in endosomale Vesikel aufgenommen (Reggiori and Pelham, 2001). Einige Untersuchungen weisen auch auf eine Kompartimentierung der eukaryotischen Zelle hin. In den einzelnen Kompartimenten dieser Zellen ist der Transport auf unterschiedliche Art verwirklicht (Riquelme *et al.*, 2002). Unterschiedliche Transportmethoden in ein und derselben Zelle werden auch für strukturell sehr ähnliche Proteine beschrieben (Roncero, 2002). Auch die Mikrotubuli sind in vielen Zellen an einen bestimmten Ort

gebunden, so dass die Proteine, die über den herkömmlichen Transportweg transportiert werden, an ihren Bestimmungsort gelangen (Díaz *et al.*, 1992). Bestimmte Mikrovesikel assemblieren sich nach Auffassung einiger Autoren selber aus 16S-Untereinheiten, anstatt aus membranösen Strukturen auszuknospen. Eine solche Selbst-Assemblierung kann im Zytoplasma oder in Vakuolen stattfinden, so dass multivesikuläre Strukturen entstehen können (Bracker *et al.*, 1976). Die Experimente der vorliegenden Arbeit weisen auf den konventionellen Transportweg der untersuchten Proteine hin. Die untersuchten sekretorischen Vesikel werden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* über das System aus Mikrotubuli und Motorproteinen transportiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daher auf den konventionellen Transportweg sekretorischer Vesikel in *A. nidulans* hin.

### Identifizierung und Markierung neuer Proteine im Spitzenkörper

Durch die Etablierung eines Systems zur Isolierung von sekretorischen Vesikeln aus dem Spitzenkörper von *A. nidulans* stehen nun alle Komponenten für den Aufbau eines *in vitro* Transportsystems zur Verfügung: Mikrotubuli können über das oben beschriebene System der Polymerisierung und Depolymerisierung aus Schweinehirn isoliert werden, verschiedene Kinesine und Kinesinkonstrukte können in *E. coli* exprimiert werden und sekretorische Vesikel können aus *A. nidulans* isoliert werden. Da Mikrotubuli und Vesikel fluoreszenz markiert sind, kann das komplette System unter dem Mikroskop beobachtet werden. Im Rahmen der Isolierung der sekretorischen Vesikel konnten die verschiedenen Fraktionen miteinander verglichen werden. In der SDS-PAGE konnten einige Proteine lokalisiert werden, die in Vesikeln verpackt in den Spitzenkörper transportiert werden. Diese Proteine konnten von der Firma toplab mittels Elektrospray-Ionisierung und anschließender MALDI-TOF näher charakterisiert werden. Neben einigen bisher uncharakterisierten Proteinen befand sich auch das Enzym endo-1,4- $\beta$ -Glukanase in den isolierten sekretorischen Vesikeln. Dieses Enzym wurde beispielhaft fluoreszenzmarkiert. Die Untersuchungen der fluoreszenzmarkierten Stämme von *A. nidulans* zeigen deutlich den Transport der Glukanase zum Spitzenkörper. Das Enzym wird dabei über Mikrotubuli transportiert, die in ihrer Struktur gut erkennbar sind. Die Glukanase kann also zukünftig als Markerprotein für den Spitzenkörper eingesetzt werden. Viele weitere Proteine, die im Spitzenkörper akkumulieren, können durch diesen Ansatz gefunden und markiert werden. Die fluoreszenzmarkierten Glukanase-Vesikel wurden anschließend isoliert und im *in vitro* Transportsystem eingesetzt. Es konnte eine Bewegung über Mikrotubuli beobachtet und quantitativ ausgewertet werden. In Zukunft können die isolierten Vesikel weiter funktionalisiert werden und dadurch mehr und mehr an das nanoskalige Transportsystem angepasst werden. Die Funktion der Endoglukanase *in vivo* ist die Hydrolyse von Zellulose. Diese Hydrolyse findet an der Hyphenspitze statt und ermöglicht dem Pilz



dadurch, sich mehr Platz zur Fortbewegung zu verschaffen. Da das Protein jedoch im Zellinneren sekretiert wird, muss es zunächst über das Zytoskelett des filamentösen Pilzes zur Peripherie transportiert werden. Proteine mit ähnlicher Funktion können in Zukunft ebenfalls fluoreszenzmarkiert werden und in diesem Transportsystem eingesetzt werden.

### Ein Transportsystem aus pilzlichen Bestandteilen

Der filamentöse Ascomycet *A. nidulans* ist, wie andere Pilze aus dieser Abteilung auch, ein hervorragender Modellorganismus zur zellbiologischen Untersuchung von sehr polaren Zellen. Aus Untersuchungen zum polaren Wachstum von *A. nidulans* können Rückschlüsse auf das Wachstum von polaren Zellen höherer Eukaryoten geschlossen werden. Solche polaren Zellen sind zum Beispiel Neuronen. Doch auch das polare Wachstum des Ascomyceten ist ein äußerst faszinierender Prozess, sein Verständnis kann helfen, Pilzerkrankungen in Menschen, Tieren und Pflanzen besser zu verstehen und zu kontrollieren. Auch die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Pilzen in der Biotechnologie werden mit einem besseren Verständnis der Wachstumsprozesse von *A. nidulans* in der Zukunft weiter zunehmen. In dieser Arbeit ging es jedoch nicht nur darum, elementare Bestandteile des Wachstumsprozesses von *A. nidulans* näher zu charakterisieren. Diese Bestandteile sollten vielmehr in einem Transportsystem im Nanomaßstab außerhalb des Pilzes Verwendung finden. Solche Transportsysteme werden in nicht allzu ferner Zukunft in *lab-on-a-chip*-Anwendungen genutzt werden (Hess *et al.*, 2004) (Muthukrishnan *et al.*, 2006). Einer der großen Vorteile solcher aktiven Transportsysteme mit Bestandteilen aus lebenden Zellen ist, dass hier auch Transportgüter gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert werden können. Auch der Transport in Nanoröhren, in denen enorme Kapillarkräfte wirken, wird so ermöglicht. Außerdem benötigt ein solches Transportsystem keine Energiezufuhr von außen, sämtliche benötigte Energie wird durch das ATP direkt am Ort des Verbrauchs bereitgestellt (Den and Huang, 2006). Ein großes Problem dieser nanoskaligen Transportsysteme ist der gerichtete Transport der Frachten. Daher werden die molekularen Motoren und ihre Schienen, die Mikrotubuli, in Zukunft in künstliche miniaturisierte Systeme integriert werden müssen. Eine ganze Reihe von Arbeitsgruppen beschäftigt sich derzeit mit diesen Problemen, sie konnten zeigen, dass miniaturisierte Hindernisse wie Wände und Kanäle dazu benutzt werden können, die Richtung und Geschwindigkeit von transportierten Mikrotubuli und Gütern zu beeinflussen (Hiratsuka *et al.*, 2001). In allen bisherigen Versuchen ist die Oberfläche der Kanäle offen, damit die Pufferlösungen überhaupt an die gewünschten Orte fließen können. Daher diffundieren etliche der gebundenen Mikrotubuli mit der Zeit aus der Versuchsanordnung heraus, bei einigen Autoren mehr als die Hälfte aller beobachteten Mikrotubuli (Clemmens *et al.*, 2004) (van den Heuvel *et al.*, 2005). Daher ist es sehr schwierig, eine kontrollierte Bewegung über lange

Distanzen zu erzielen. Genauso schwierig ist es, mit den existierenden Systemen eine hohe Dichte an gleich orientierten Mikrotubuli zu erreichen. In der Zukunft wird es daher von enormer Bedeutung sein, Methoden zu entwickeln, mit denen geschlossene nanoskalige Systeme geschaffen werden können, die mit Motoren funktionalisiert werden können und in denen die Mikrotubuli nicht aus den Kanälen herausdiffundieren können.

### **Bestandteile des Transportsystems: Tubulin**

Einen essentiellen Bestandteil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche stellt das benötigte Tubulin in seiner polymerisierten Form als Mikrotubuli dar. Die Tubulinisolierung wurde nach einem modifizierten Protokoll von Williams (Williams and Lee, 1982) durchgeführt. Am ursprünglichen Protokoll mussten zur erfolgreichen Reproduzierbarkeit einige Veränderungen durchgeführt werden, allerdings gelangen die anschließenden Tubulinisolierungen dann problemlos. Im Originalprotokoll wird die Tubulinisolierung mit Rinderhirn durchgeführt. Da Rinderhirne derzeit zunächst auf eventuelle Plaques durch BSE untersucht werden, gab es keine Möglichkeit, frisches Rinderhirn für die Tubulinisolierung zu erhalten. Das nötige Rinderhirn wurde daher, wie bei anderen Autoren auch, durch Schweinehirn ersetzt (Castoldi and Popov, 2003). Es wurden jeweils zehn Schweinehirne zur Tubulinisolierung verwendet, diese wurde je nach Bedarf etwa alle zwei Monate durchgeführt. Die Qualität des erhaltenen Tubulins hing in erster Linie von der Frische der verwendeten Schweinehirne ab. Es musste zügig und exakt gearbeitet werden, um eine hohe Ausbeute reinen Tubulins zu erhalten. Ein Teil des isolierten Tubulins wurde anschließend fluoreszenzmarkiert (Desai and Mitchison, 1998). Dabei wurden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, so dass rotes und gelbes Tubulin erzeugt werden konnte. Beide Fluoreszenzmarkierungen erreichten die gleiche Qualität. Es existieren eine ganze Reihe unterschiedlichster Fluoreszenzfarbstoffe auf dem Markt, es ist also möglich, Tubulin in einer ganzen Bandbreite verschiedenster Farben zu erzeugen. Das markierte Tubulin konnte mit unmarkiertem gemischt und nach Zugabe von GTP polymerisiert werden. Auch hinsichtlich der Polymerisation und des Mischungsverhältnisses traten keine großen Unterschiede zwischen gelbem und rotem Tubulin auf. Im *Gliding assay* konnte die Bewegung der markierten Mikrotubuli über einen Objektträger aufgezeichnet und ausgewertet werden. Auch hier gab es – bei der Verwendung der gleichen Motorproteine – keine Unterschiede in der Geschwindigkeit zwischen gelben und roten Mikrotubuli.



### Aufbau der Straßen: Polymerisierung des Tubulins

In der vorliegenden Arbeit wurden Tubulin-Proteine aus Schweinehirnen isoliert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiert. Die Proteine konnten mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden. Die markierten Tubulin-Proteine konnten mit unmarkierten verdünnt und zu Mikrotubuli polymerisiert werden. Polymerisation und Depolymerisation der Mikrotubuli wurden sowohl unter dem Mikroskop als auch photometrisch nachgewiesen. Die Polymerisation konnte dabei über einen längeren Zeitraum beobachtet werden und durch ein Absenken der Temperatur verlangsamt bzw. gestoppt werden. Die polymerisierten Mikrotubuli konnten mit unterschiedlichen Konstrukten der Motorproteine KinA und KipA auf einem Objektträger in ihrer Bewegung beobachtet werden. Dieser Assay kann noch für eine Vielzahl weiterer Motorproteine verwendet werden. Auch Rigormutanten der verwendeten Motorproteine wurden mit diesem Versuchsaufbau getestet. Mit dieser Mutante können die Mikrotubuli auf einer Oberfläche fixiert werden, aber auch Latex-Kügelchen und Quantum Dots beschichtet werden. Die so beschichteten Kügelchen können dann - unfähig zur Bewegung - auf Mikrotubuli befestigt werden. Die Kügelchen wurden mit verschiedenen anderen Motorproteinen beschichtet und ihre anschließende Bewegung über die Mikrotubuli ausgewertet. Im Rahmen dieser Dissertation wurden außerdem Strukturen aus Phospholipiden erzeugt, die, mittels Nickel-NTA-Zusatz und verschiedener Kinesine, als Straßen zur Bewegung der Mikrotubuli genutzt werden konnten. Die Motorproteine konnten zum Zweck der Straßenbildung auch direkt mit DPN auf ein Deckglas aufgebracht werden. Wurden die Untersuchungen mit eingefrorenen und wiederaufgetauten Kinesinen durchgeführt, so konnte lediglich ein Zucken der Mikrotubuli, aber keine gerichtete Bewegung beobachtet werden. Die Motorproteine verlieren also durch Einfrieren und Abtauen ihre Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse und binden die Mikrotubuli dann mehr oder weniger fest an die Glasoberfläche. ATP- und zur Polymerisation benötigte GTP-Lösungen mussten frisch angesetzt werden, ebenso der Enzymmix und die Glukoselösung. Die polymerisierten und Taxol-stabilisierten Mikrotubuli konnten problemlos für etwa eine Woche bei Raumtemperatur aufbewahrt und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

### Test der Komponenten: *Gliding Assay*

Zur schnellen Überprüfung der Komponenten des angestrebten Transportsystems wurden *Gliding Assays* durchgeführt. Durch diese Versuche konnte schnell festgestellt werden, ob die Komponenten des Transportsystems sowie die verwendeten Puffer funktionsfähig waren. Die Kinesinkonstrukte wurden auf einen Objektträger aufgebracht, anschließend wurden Mikrotubuli, ATP und die benötigten Puffer zugegeben. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte nun – sofern alle Komponenten funktionsfähig waren – eine Bewegung der Mikrotubuli beobachtet werden. Auch andere Autoren nutzen *Gliding Assays* als schnelle Testmethode (Jeune-Smith *et al.*, 2010). Die Geschwindigkeit der Mikrotubuli variiert in den *Gliding Assays* je nach verwendetem Motorproteinkonstrukt. Die Verwendung unterschiedlicher Mikrotubuli (unterschiedliche Länge oder unterschiedliche Farbe) zeigte keine Unterschiede in der gemessenen Geschwindigkeit der Mikrotubuli.

### Etablierung der Vesikelisolierung

Für den Bau eines nanoskaligen *in vitro* Transportsystems wurden neben den Mikrotubuli als Straßen oder Schienen und den Motoren zudem Transportfrachten benötigt. Es wurde sowohl mit künstlichen Transportfrachten wie Latex-Kügelchen und Quantum-Dots, als auch mit natürlichen Vesikeln gearbeitet. Im Rahmen dieser Dissertation wurden sekretorische Vesikel aus dem Spitzenkörper von *A. nidulans* isoliert. Diese Vesikel wurden in einer oder mehreren Fraktionen des Saccharosegradienten nachgewiesen. Es sind kleine leuchtende Pünktchen sichtbar, die sich deutlich von der Autofluoreszenz anderer Objekte abheben und eine Größe von unter 0,1  $\mu\text{m}$  aufweisen. Die Fraktionen konnten mehrmals eingefroren und aufgetaut werden, ihre Fluoreszenz ging dadurch nicht verloren. Allerdings konnte nach mehrmaligem Einfrieren und anschließendem Auftauen keine Bewegung der Vesikel über die Mikrotubuli mehr beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde auch mit den verwendeten Kinesinen gemacht (siehe unten). Die Etablierung einer reproduzierbaren Isolierung der Vesikel erforderte einige Vergleiche schon bestehender Isolierungsmethoden. Schon in den 1970er Jahren entwickelte Salomon Bartnicki-Garcia ein Verfahren zur Chitosomenisolierung (Bracker *et al.*, 1976). Dieses Verfahren wurde im Laufe der Jahre verbessert (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1984) (Kamada *et al.*, 1991) (Bartnicki-Garcia, 2006). Auch zellbiologische Arbeitsgruppen benutzen isolierte Vesikel für *in vitro* Versuche (Astanina and Jacob, 2010). Die Protokolle beider Methoden wurden für die vorliegende Dissertation kombiniert und für *A. nidulans* optimiert, bis die Ergebnisse zufriedenstellend waren. Mit dem nun etablierten Protokoll können aus *A. nidulans* und *N. crassa* und damit wahrscheinlich aus vielen anderen filamentösen Pilzen auch, sekretorische Vesikel aus dem Spitzenkörper isoliert werden. Die

isolierten Vesikel sind voll Funktionsfähig und können durch ihre eigenen Motorproteine auch im *in vitro*-Versuchsaufbau transportiert werden.

### Artifizielle und natürliche Vesikel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedlichste *Vesicle Assays* durchgeführt und etabliert. Es wurden Experimente mit künstlichen sowie mit natürlichen Vesikeln gemacht. Zunächst wurden die Vesikel oder Latexkügelchen mit anti-Tubulin-Antikörpern beschichtet und konnten anschließend an Mikrotubuli gebunden werden. Wurden diese Mikrotubuli im *Gliding Assay* eingesetzt, so wurden die gebundenen Transportgüter mit den Mikrotubuli zusammen transportiert. Für verschieden große Latexkügelchen konnte ein solcher Transport gezeigt werden, die gemessenen Geschwindigkeiten entsprechen dabei den vorher berechneten Geschwindigkeiten der jeweils eingesetzten Motorproteine. Gebundene Vesikel beeinflussen die Geschwindigkeit der gleitenden Mikrotubuli daher nicht, sie werden weder schneller noch langsamer. Dies wurde durch ähnliche, frühere Experimente anderer Autoren ebenfalls gezeigt (Korten and Diez, 2008) (Nitzsche *et al.*, 2008). Dem Transport von an Mikrotubuli angehefteten Gütern wird sehr wahrscheinlich in Zukunft keine größere Bedeutung zukommen. Es müssen erst wirkungsvolle Methoden gefunden werden, die Frachten wieder von den Mikrotubuli zu lösen. Zudem müssen Methoden geschaffen werden, die Mikrotubuli gerichtet zu transportieren. Dies kann durch Kanäle (Den and Huang, 2006) oder durch den Einsatz bestimmter Beschichtungsverfahren, wie zum Beispiel der DPN in dieser Arbeit, erfolgen. Eine für spätere *lab-on-chip* Verfahren geeignetere Methode des gerichteten Transports stellt die Beförderung der Vesikel über fixierte Mikrotubuli dar. Bei dieser Transportmethode werden die Mikrotubuli so fixiert, dass sie als Straßen oder Schienen zur Beförderung genutzt werden können. Auch bei dieser Methode müssen zunächst noch Möglichkeiten zur gerichteten Fixierung der Mikrotubuli gefunden werden. Auch hier können Kanäle und/oder DPN eingesetzt werden. In dieser Arbeit konnte der Transport sowohl von nativen Vesikeln aus *A. nidulans* als auch von künstlichen Latexkügelchen verschiedenster Größen gezeigt werden. Die Geschwindigkeit der transportierten Vesikel und Kügelchen wurde bei diesen Versuchen von der Geschwindigkeit des jeweils transportierten Motors bestimmt. Natürliche Vesikel bewegten sich im *in vitro* System mit annähernd der gleichen Geschwindigkeit, wie sie auch *in vivo* bestimmt werden konnte.

## Elektronenmikroskopie

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit der Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die aus *A. nidulans* isolierten Vesikel von jeweils einer größeren Anzahl an Motorproteinen bewegt werden. Bisher ist nicht endgültig geklärt, ob Vesikel von einem oder mehreren Motoren über das Zytoskelett transportiert werden (Ou *et al.*, 2010) (Xue *et al.*, 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass an einzelnen sekretorischen Vesikeln deutlich mehr als ein einzelnes Motorprotein gebunden ist. Die sogenannte *push-and-pull*-Theorie (Duke, 2002) geht davon aus, dass an einem Vesikel mehrere unterschiedliche Motorproteine sitzen. Je nach Überzahl der einen oder anderen Motorproteine bewegt sich das Vesikel in die eine oder andere Richtung. Weitergehende Tests auf andere Motorproteine außerhalb der Kinesin-Familie könnten hier Klarheit bringen. Es ist denkbar, solche elektronenmikroskopische Aufnahmen in Zukunft auch mit Vesikeln aus *A. nidulans*-Stämmen, in denen andere Motorproteine markiert wurden, durchzuführen. Vermutlich werden an den Vesikeln auch Dyneine und Myosine gebunden sein, wenn auch sehr wahrscheinlich in deutlich geringerer Anzahl (DeVilleville and Vanden-Eijnden, 2008).

## Material und Methoden

### Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Sigma (Taufkirchen), BioMol (Hamburg) und Stratagene (Amsterdam, NL) bezogen. Die Polyvinylidendifluorid-Membran stammte von der Firma A. Hartenstein (Würzburg), Miracloth-Filtermaterial von Calbiochem (Heidelberg).

Alle mikroskopischen Arbeiten wurden an einem Zeiss AxioImagerZ.1 mit einer Zeiss AxioCamMR durchgeführt, die Steuerung des Mikroskopes erfolgte durch die Software AxioVision von Zeiss.

### Organismen und mikrobiologische Methoden

#### Organismen und Stämme

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Stämmen von *A. nidulans* und *E. coli* gearbeitet:

**Tabelle 1: Verwendete *A. nidulans*-Stämme mit Genotypen und Herkunft**

Stamm	Genotyp	Referenz
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	G.May, Houston, USA
SDV90b	$\Delta kinA$ ; <i>alcA(p)::kinA::GFP</i>	Veith, 2006
SSK92	<i>alcA(p)::GFP::kipA; pyroA4</i>	Konzack <i>et al.</i> , 2005
SNZ2	<i>alcA(p)::GFP::uncA; pyroA4</i>	Zekert, 2006
SJS21	<i>alcA(p)::GFP::chsa</i>	diese Arbeit
SJS22	<i>alcA(p)::GFP::chsb</i>	diese Arbeit
SJS34	<i>chsa::GFP</i>	diese Arbeit
SJS37	<i>alcA(p)::GFP::eglA</i>	diese Arbeit
SJS38	<i>alcA(p)::GFP::eglB</i>	diese Arbeit
SJS39	<i>eglA::GFP</i>	diese Arbeit

SJS40

*eglB::GFP*

diese Arbeit

**Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Stämme mit Genotypen und Herkunft**

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1- Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, eriA1, lac[F'proAB lacIQZΔM15:Tn10 (TetR)]</i>	Stratagene, LaJolla, USA
Top10F`	F' <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Ø80 lacZ ΔM15ΔlacX74, deoR, recA1, araD139Δ(ara- leu) 7679, galU, galK, rpsL, (Strr) endA1, nupG</i>	Invitrogen, Leek, NL

### **Kultivierung von *A. nidulans* und *E. coli***

Die Medien zur Kultivierung von *A. nidulans* wurden wie von Pontecorvo beschrieben hergestellt (Pontecorvo, 1953). Je nach Stamm und Versuch wurden die Medien mit Vitaminen und/oder Aminosäuren komplementiert. Zur Herstellung von Festmedien wurden zusätzlich 1,5% (w/v) Agar eingewogen.

Die Medien zur Kultivierung von *E. coli* wurden wie von Sambrook beschrieben (Sambrook 1989) hergestellt und je nach Versuchsansatz mit Antibiotika und Nachweisreagenzien supplementiert.

**Tabelle 3: Medien und Zusätze für *A. nidulans***

Medium	Zusammensetzung je l
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung 20 g Glucose 2 g Pepton 1 g Hefeextrakt 1 ml Vitaminlösung 1 ml Spurenelementelösung mit 10 M NaOH auf pH ~6,5 eingestellt
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung 1 ml Spurenelementelösung 20 g Glukose oder alternative C-Quelle mit 10 M NaOH auf pH ~6,5 eingestellt
Salz-Stammlösung (20-fach)	120 g NaNO <sub>3</sub> 10,4 g KCl 10,4 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 30,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Spurenelementelösung (1000-fach)	22 g ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 11 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 5 g MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O 5 g FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 1,6 g CoCl <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O 1,6 g CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O 1,1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O 50 g Na <sub>4</sub> EDTA mit Kaliumhydroxidplätzchen auf pH 6,5-6,8 eingestellt
Vitaminlösung (1000-fach)	0,1 g D-Biotin 0,1 g Pyridoxin-HCl 0,1 g Thiamin-HCl 0,1 g p-Aminobenzoensäure

**Tabelle 4: Vitamine, Aminosäuren und andere Medienkomponenten**

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Eingesetzte Menge je l
Arginin	500 mM (100fach)	10 ml
Uracil	-	1 g
Uridin	-	1 g
Biotin	0,05 %	1 ml
Pyridoxin-HCl	0,1 %	1 ml
p-Aminobenzoessäure	0,1 %	1 ml
Riboflavin	0,25%	1 ml

Die Kulturen von *A. nidulans* und *E. coli* wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37°C aerob inkubiert. Flüssigkulturen wurden dabei im Schüttelinkubator (Infors Minitron) oder Wasserbadschüttler (Gyrotory, G76) bei 200 rpm geschüttelt. Medien und Lösungen wurden 25 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert, Glas- und Keramikwaren bei mindestens 180°C im Hitzeschrank sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wie Aminosäuren und Vitamine wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm bzw. 0,45 µm Porengröße; Schleicher und Schüll, Dassel).

#### Induktion des *alcA*-Promotors

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit *A. nidulans*-Stämmen gearbeitet, die Expressionskonstrukte mit dem *alcA*-Promotor inseriert haben. Zur Induktion des Promotors wurden die Stämme für 16 h in Glukose-Medium bei 200 rpm und 37°C auf einem Schüttler inkubiert, das Myzel mit Miracloth-Filtermembran abfiltriert, mit reichlich sterilem Wasser gewaschen und anschließend in Induktions-Medium (2% Threonin oder 2% Glycerin anstelle von Glukose) transferiert oder direkt für die Extraktion der Proteine aufbewahrt. Die in Induktions-Medium transferierten Stämme wurden für weitere vier Stunden bei 200 rpm und 37°C auf einem Schüttler inkubiert, ehe sie erneut durch eine Miracloth-Filtermembran abfiltriert wurden. Alternativ wurden die Stämme über 30 h in MM mit 2% Threonin oder 2% Glycerin und 0,2% Glukose angezüchtet und anschließend direkt eine Proteinextraktion durchgeführt. Aus dem Myzel wurde die Extraktion der Proteine vorgenommen. Für die



Präparation der Stämme für die Mikroskopie wurden Konidiosporen direkt in Induktionsmedium angeimpft.

## Molekularbiologische Methoden

### DNA

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

Für die Plasmid- Minipräparation wurde eine Übernachtskultur des *E. coli*- Stammes in 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika hergestellt und bei 37° C im Schüttler inkubiert. Nach 16 h Wachstum wurden 1,5 ml *E. coli*- Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und kurz zentrifugiert. Das Pellet wurde zum Abbau von Ribonukleinsäuren zunächst in 200 µl Puffer 1 resuspendiert, anschließend zur alkalischen Lyse mit 200 µl Puffer 2 vorsichtig gemischt. Zur Neutralisation der stark basischen Zellsuspension wurde diese mit 200 µl 1,5 M Kaliumacetat pH 4,8 versetzt. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min wurden Zelltrümmer und präzipitierte Proteine mit dem Pellet abgetrennt. Der klare Überstand wurde zur Fällung der DNA mit 500 µl 100% Isopropanol versetzt, die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, anschließend mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur und geöffnetem Eppendorfgefäß getrocknet, nachfolgend in 30 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 68° C für 5 min im Wasserbad inkubiert.

Um Plasmid- DNA in größeren Mengen isolieren zu können, wurde das Kit Nucleobond AX der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet.

**Tabelle 5: Lösungen zur Plasmid-Minipräparation aus E.coli Lösung**

	Zusammensetzung
Puffer 1 (100 ml)	5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 ; 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0; 10 mg RNase
Puffer 2	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Kaliumacetat	1,5 M Kaliumacetat, pH 4,8
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 mM EDTA pH 8.0

### **Präparation genomischer DNA aus *A. nidulans***

Um Myzel aus *A. nidulans* zu gewinnen wurden Petrischalen mit etwa 20 ml Vollmedium (CM) dick mit Sporen beimpft. Nach 12-15 Std. wurde die aufschwimmende Kahmhaut geerntet, zwischen Papierhandtüchern trockengepresst und mittels flüssigen Stickstoffs gefriergetrocknet. Das Myzel wurde anschließend fein gemörsert und in Extraktionspuffer (50mM EDTA; 0,2% SDS) bei 68°C aufgeschlossen. Dann wurden die Proteine mit einer 8M Kaliumacetatlösung gefällt und abzentrifugiert. Außer einer alkoholischen Fällung erfolgte keine weitere Reinigung der genomischen DNA.

### **Kontrollverdau von DNA mit Restriktions-Endonuklease**

Der Restriktionsverdau wurde mit 10 µl Gesamtvolumen angesetzt und von dem Restriktionsenzym wurden 0,5-1 µl (1-20 U/µl) eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 bis 2 Stunden bei 37 °C in den vom Hersteller angegebenen Puffern inkubiert.

### **Dephosphorylierung von verdauter DNA**

Nach dem Restriktionsverdau wurde der geschnittene Vektor mittels *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) behandelt um die Phosphatgruppe vom 5` Ende der DNA zu entfernen und so eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Die SAP- Behandlung wurde nur für *blunt end* Ligationen eingesetzt.

### **Gelelektrophorese, DNA-Isolierung und -Ligation**

#### **Agarosegelelektrophorese von DNA**

Die DNA-Fragmente wurden auf ein 1 %-iges Agarose-Gel aufgetragen und in 0,5-fachem TAE-Puffer (50x Stammlösung: 40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden zum Beladen der Geltaschen mit Ladepuffer versetzt. Zum Vergleich wurde ein Größenmarker (1kb DNA Ladder; NEB) mitgeführt. Die Gele wurden für 15 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/µl in 0,5xTAE) gefärbt, die DNA-Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Für weitere Klonierungsschritte wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (QUIAquick gel extraction kit, Quiagen, Hilden).

#### **Ligation von DNA**

Ligationen wurden mit der *T4 Ligase* von NEB (Frankfurt) bei 16°C über Nacht in einem Volumen von 15 µl durchgeführt. Konzentrationen der Insert- bzw. Vektor-DNA wurden vorher photometrisch gemessen. Für die Ligation von kohäsiven Enden lag das Verhältnis von Vektor zu Insert bei etwa 1:3.

Für TA- Klonierungen wurden die PCR-Produkte direkt in pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert.

## Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierung von PCR-Produkten

### *Polymerase-Kettenreaktion*

Die PCR wurde mit *Taq*- (Qiogene, Heidelberg), *Pfu*- (Promega, Madison, WI, USA) bzw. *Phusion*- Polymerase (NEB, Frankfurt) und Nukleotiden von Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden bei Biomers (Ulm) oder MWG (Ebersberg) bestellt, es wurde jeweils 10 pmol in 10 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Sowohl der Rapid Cycler von Idaho Technology (Neuried), als auch der TRIO-Thermoblock von Biometra (Göttingen) wurden eingesetzt. Die Programme wurden der zu amplifizierenden Fragmentlänge und der berechneten Annealingtemperatur der Primer angepasst. Denaturiert wurde bei 95°C bzw. 98°C, die Elongation erfolgte bei 72°C bzw. 68°C, je nach Polymerase.

### *Sporen-PCR bei A. nidulans*

DNA-Extraktion aus filamentösen Pilzen zur PCR-Analyse ist relativ zeitaufwendig und teuer, vor allem, wenn damit eine größere Anzahl an Transformanten auf verschiedene Mutationen getestet werden soll. Um dies zu vermeiden, wurden Konidiosporen von *A. nidulans* direkt zur PCR-Analyse verwendet, ohne vorherige Isolierung der DNA. Die PCR wurde mit Konidiosporen von Kolonien, die bei 37°C oder 30°C für zwei Tage auf Agarplatten gewachsen waren, durchgeführt. Die Sporen wurden durch vorsichtiges Abkratzen der Kolonieoberfläche mit einem sterilen Spatel geerntet und in den Deckel eines Eppendorf-Reaktionsgefäßes, der mit 100µl sterilem ddH<sub>2</sub>O gefüllt war, überführt. Da Agar die PCR-Reaktion behindert, wurde darauf geachtet, kein Medium zu überführen. Die Proben wurden gründlich gemischt und die Sporenkonzentration in einem Reaktionsgefäß auf 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> Sporen pro Reaktion eingestellt. Anschließend wurden die Proben für 10-15 min bei -80°C eingefroren. Der Mix wurde zu den Proben gegeben und die PCR wie folgt durchgeführt: Denaturierung bei 95°C für 5 min, 30 Zyklen bei 95°C für 18 s, entsprechende Annealing-Temperatur und -Zeit, 72°C für 1-2 min, 72°C für 5-10 min.

## Transformation

### *Transformation von E. coli*

Die bei - 80 °C gelagerten chemokompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 5 µl des Ligationsansatzes vermischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde für 30 sek ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Nach anschließender Zugabe von 300 µl vorgewärmtem SOC- Puffer wurden die Bakterien 1 h bei 37 C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf vorgewärmte LB- Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

### *Transformation von A. nidulans*

Für die Transformation von *A. nidulans*<sup>8</sup> wurden 500 ml MM, supplementiert mit den entsprechenden Auxotrophiesubstanzen, mit ca. 10<sup>9</sup> frischen Konidiosporen inokuliert. Die Pilzkultur wurde für 12-15 h bei 30°C in einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Pilzmyzel über eine sterile Mira cloth-Membran abfiltriert und mit Waschlösung (WL) gewaschen. Das Myzel wurde zwischen Zellstofftüchern vorsichtig getrocknet. In 5 ml osmotischem Medium wurde 1 g Myzel resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml Glucanexlösung (140 mg/ml) und 0,5 ml Albuminlösung (6 mg/ml) für 90 min bei 30°C unter vorsichtigem Schütteln bei 100 rpm inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 10 ml Überschichtungspuffer (ÜP) vorsichtig überschichtet und für 15 min bei 5000 rpm im Ausschwingrotor (Universal 320R von Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Die Protoplastenbande, die sich an der Interphase bildete, wurde vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen. Zu den Protoplasten wurden 10 ml Sorbitol-Tris-Calcium-Puffer (STC) gegeben und für 10 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das entstehende Protoplastenpellet mit STC gewaschen und in 200-500 µl STC resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl Protoplastensuspension eingesetzt, 5 µg DNA (in 100 µl STC gelöst) zugegeben und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Polyethylenglykol-Lösung (PEG) beigemischt und die Suspension für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml STC wurde die Suspension auf etwa drei MM-Platten verteilt, die neben den entsprechenden Wachstumsfaktoren auch 0,6 M KCl als Osmoprotektanz enthielten. Nach etwa drei Tagen wurden die Transformanten sichtbar.

**Tabelle 6: Lösungen für die Aspergillus-Transformation Lösung**

Zusammensetzung pro Liter	
MWL (Myzel Waschlösung)	0,5 M MgSO <sub>4</sub>
OM (Osmotisches Medium)	1,2 M MgSO <sub>4</sub> ; 10 mM NaPO <sub>4</sub> -Puffer pH 5.8
ÜP (Überschichtungspuffer)	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris-HCl; pH 7.0
STC (Sorbitol-Tris-Kalzium Puffer)	1,2 M Sorbitol; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM Tris-HCl; pH 7.0
PL (PEG Lösung)	60 % Polyethylenglykol 4000; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM Tris-HCl; pH 7.0

## Mikroskopische Methoden

### Präparation von *A. nidulans* für die Mikroskopie

#### *Präparation von Keimlingen*

Es wurden jeweils vier Deckgläser abgeflammt, in eine Petrischale gelegt und mit ca. 400µl Medium überschichtet. Das Medium wurde mit etwa 1µl einer Sporensuspension angeimpft und bei Raumtemperatur 18-24 Stunden inkubiert. Da die Keimlinge am Deckglas haften, kann das Medium abgenommen werden und das Deckglas anschließend auf einem Objektträger mit den unten liegenden Pilzhyphen mikroskopiert werden.

#### *Präparation älterer Hyphen*

Ein steriler und abgeflammt Objektträger wurde mit einer dünnen Schicht MM mit 0,8% Agarose versehen und mit etwa 1µl einer Sporensuspension angeimpft. In eine Petrischale wurde TE-Agar (10 mM Tris, pH 7; 1 mM EDTA) gefüllt und auf diesen Agar der Objektträger gelegt. Durch diese Vorrichtung vor dem Austrocknen geschützt, konnten Kulturen bis zu zwei

Wochen wachsen. Zum Mikroskopieren wurde ein Tropfen 0,1% Tween 20 auf die Kultur gebracht, diese mit einem Deckglas bedeckt und anschließend betrachtet.

### Epifluoreszenzmikroskopie

Der AxioImagerZ.1 von Carl Zeiss wurde für sämtliche Epifluoreszenzbeobachtungen und – aufnahmen benutzt. Die verwendete Software war AxioVision, zur Bildaufnahme diente die Kamera AxioCamMR. Die benutzten Objektive waren ebenfalls von Carl Zeiss, es handelte sich um Plan-ApoChromat Objektive mit Vergrößerungen von 5- bis 100-fach. Als Quelle für Fluoreszenzlicht diente eine HBO103 Quecksilberdampfampe der Firma Osram.

**Tabelle 7: Verwendete Filterkombinationen**

Fluoreszenzfarbstoff	Erregerfilter (Bandpassfilter)	Farbteiler	Sperrfilter (Langpassfilter)
GFP	450-490	510	520
YFP	510-520	530	540
Rhodamin	546	580	590
Hoechst 33342	365	395	397

Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde das Differential Interference Contrast –Verfahren, kurz DIC, nach Nomarski angewandt. Mit dieser Methode werden Unterschiede in der optischen Dichte des Präparats in Kontrastunterschiede des Bildes umgewandelt. Damit lassen sich pseudoplastische Bilder erstellen, die allerdings nicht die wahren räumlichen Strukturen im Präparat wiedergeben.

### Elektronenmikroskopie

Die zur Transmissionselektronenmikroskopie verwendeten Vesikel wurden zunächst wie beschrieben aus unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämmen isoliert. Dann wurden jeweils 15 µl der einzelnen Fraktionen auf die Probenhalter für die TEM aufgebracht. Diese wurden kurz getrocknet und anschließend der Immunogoldfärbung unterzogen. Zunächst wurden die Probenhalter mit 5% BSA in TBS 45 min bei Raumtemperatur geblockt, um überschüssige Bindestellen für die Antikörper zu blockieren. Anschließend wurde der primäre Antikörper in einer 1:100 Verdünnung in 5% BSA in TBS aufgetropft und 1 h inkubiert.

Dann wurde fünf Mal jeweils 2 min mit 5% BSA in TBS gewaschen, anschließend wurde der sekundäre Antikörper ebenfalls in einer Verdünnung von 1:100 in 5% BSA in TBS 1h auf den Probenhaltern inkubiert.

Nun wurde zwei Mal mit 5% BSA und 0,02% Tween in TBS gewaschen, anschließend zwei Mal mit TBS, pH=7,3.

Danach wurde mit 2,5% Glutaraldehyd in TBS für 2 min fixiert und zwei Mal mit TBS gewaschen.

Abschließend wurde zwei Mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

Die Proben konnten nun mit dem TEM untersucht werden. Optional konnte mit Uranylacetat nachkontrastiert werden.



**Abbildung 33: Probenpräparation zur TEM.** Deutlich erkennbar ist das Handling der Probenhalter.

## Biochemische Methoden

### Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der proteinhaltigen Proben wurde mit der Methode nach Bradford quantitativ bestimmt. Die Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 nach der Bildung von Komplexen mit Seitenketten der Proteine in saurer Lösung von 270 nm nach 595 nm (MM, 1976) (Bradford, 1976).

Die Bestimmung wurde mit dem Bio-Rad Microassay (Bio-Rad, München) durchgeführt. 0,8 ml Probe oder Standard mit einer Proteinkonzentration von 0-10 µg/ml wurden mit 0,2 ml Roti-Quant-Lösung versetzt und 5 min im Dunkeln in der Küvette inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen H<sub>2</sub>O als Referenzwert bestimmt. Als Standard diente Serumalbumin vom Rind (BSA).

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Ein SDS-Gel setzt sich aus Trenn- und Sammelgel zusammen. Zunächst wurde das Trenngel in die Apparatur (Mighty Small, Hoefer) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet sowie ein Kamm eingesetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 4-fach Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Dann wurden die Proben sowie 10 µl eines Protein-Molekulargewichtsmarkers im Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur bis zum Probeneinlauf in das Trenngel mit 70 V, anschließend mit 150 V durchgeführt.

**Tabelle 8: Lösungen für die SDS-PAGE**

Lösung	Zusammensetzung
Trenngel (10%)	4,0 ml H <sub>2</sub> O 3,3 ml 30% Acrylamid-Mix (Sigma) 0,1 ml 10% SDS 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10% APS 0,004 ml TEMED
Sammelgel (5%)	3,4 ml H <sub>2</sub> O 0,83 ml 30% Acrylamid-Mix (Sigma) 0,05 ml 10% SDS 0,63 ml 1,5 M Tris pH 6,8 0,05 ml 10% APS 0,005 ml TEMED
SDS-Ladepuffer (4-fach)	200 mM Tris-HCl pH 6,8 400 mM DTT 8% SDS 0,4 % Bromphenolblau 40% Glyzerin
Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris 250 mM Glyzin, 0,1% SDS



### Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 30 min in der Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert, anschließend bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Entfärber geschüttelt. Auf gleiche Weise funktionierte die Färbung der PVDF-Membran (Schleicher&Schuell, Dassel).

**Tabelle 9: Lösungen für die Coomassie-Färbung**

Lösung	Zusammensetzung
Färbelösung	100 mg Coomassie-Brillant-Blue G250 gelöst in 50 ml 90% Ethanol 50 ml 20% Essigsäure
Entfärber	20% Ethanol 10% Eisessig

### Western-Blot-Analyse und Immundetektion von Proteinen

Es wurden Proteinextrakte über eine SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel zusammen mit einer Membran (Nitrocellulose oder PVDF) luftblasenfrei zwischen puffergetränktes Filterpapier gelegt. Die PVDF-Membran musste durch kurzes Eintauchen in 100% Methanol vor Zusammenbau der Blot-Apparatur aktiviert werden. Gel und Membran wurden in eine Mini-Blot-Apparatur (Bio-Rad, München) eingebaut, die komplett mit Transferpuffer gefüllt wurde. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 mA für 2-3 h auf Eis oder über Nacht bei 30 mA in der Kühlzelle und konnte anschließend durch Anfärben der Membran mit Ponceau-S-Lösung kontrolliert werden. Nach dem Blocken der Membran über 1 h mit Magermilch-Pulver in TBS-T wurde die Membran für 1 h mit dem Primärantikörper (G 1544, Sigma) in der entsprechenden Verdünnung in Blocking-Lösung inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden anschließend durch viermaliges Waschen der Membran mit TBS-T für jeweils 5 min entfernt. Danach wurde mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war, gelöst in der entsprechenden Verdünnung in TBS-T 1 h inkubiert. Die Membran wurde wieder viermal für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Immundetektion in der Dunkelkammer durchgeführt. Als Substrat für die Peroxidase wurde Luminol verwendet. Dazu wurden 1 ml Lösung A, 100 µl Lösung B und 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt, auf der Membran verteilt und die Entwicklung von Chemolumineszenz mittels Röntgenfilm detektiert.

**Tabelle 10: Lösungen für Western-Blot und Immundetektion**

Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	20 mM Tris 100 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol
Ponceau-S	3% Trichloressigsäure 3% Sulfanilsalicylsäure 0,2% Ponceau-S
TBS-T	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0,1% Tween 20
Blocking-Lösung	5% Magermilchpulver in TBS-T
Luminol	Lösung A: 50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6 Lösung B: 11 mg <i>p</i> -Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO 35% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Entwickler/Fixierer	Produkte von Kodak, Stuttgart

### Dot-Blot

Der Dot-Blot wurde verwendet um die Fraktionen der Chitosomenisolierung schnell auf eine Anwesenheit von GFP-markiertem Protein zu testen. Hierfür wurden auf eine durch kurzes Eintauchen in 100% Methanol aktivierte PVDF- bzw. Nitrocellulosemembran punktförmig jeweils 10 µl Probe aufgebracht. Die Membran wurde zuvor in eine Apparatur, die das Anlegen eines Vakuums und das gezielte, punktuelle, Aufbringen der Proben ermöglicht, eingespannt. Die Membran wurde an der Luft getrocknet, dann wurden noch zweimal jeweils 10 µl Probe an der gleichen Stelle aufgebracht. Nach gründlicher Trocknung der Membran an der Luft wurde diese dem oben erläuterten Verfahren der Immundetektion unterzogen.

### Zellaufschluss und Vesikelisolierung

Die in Induktionsmedium über Nacht bei 200 rpm im Schüttelinkubator (Infors Minitron) gewachsenen Zellen wurden über Miracloth vom Medium getrennt, mit sterilem Wasser gewaschen und gewogen. Es wurde 1 g/g Feuchtgewicht Quarzsand hinzugegeben und, nach Zugabe von 4 ml/g Feuchtgewicht Extraktionspuffer, auf Eis gemörsert. Anschließend wurde die Masse erneut durch Miracloth gefiltert und bei 500 g und 4°C in einem HB6-Ausschwingrotor (SORVALL, Bad Homburg) 5 min in der Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 6506) abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde diese Zentrifugation nochmals wiederholt, der entstehende Überstand wurde als Zellextrakt genommen und bei -20°C eingefroren bzw. frisch verwendet.

Mit der FPLC wurde ein kontinuierlicher Saccharosegradient von 60 % (w/v) bis 30 % (w/v) aus zwei Gradientenpuffer-Reservoirien mit einem Anteil von 30 % (w/v) bzw. 60 % (w/v) Saccharose in ein Zentrifugenröhrchen gegossen. Der Gradient hatte eine Menge von 20 ml. Mit einer Spritze und Kanüle wurde dieser Gradient vorsichtig mit 4 ml Zellextrakt beschickt und anschließend bei 100.000 g, 4°C mit ausgeschalteter Bremse in einem TST28.35-Ausschwingrotor (Kontron) in der Kontron Ultracentrifuge TGA-65 Ultrazentrifuge 120 min zentrifugiert. Danach wurde der Gradient mit Spritze und Kanüle in Schritten von jeweils 1 ml von oben nach unten fraktioniert. Die Fraktionen wurden bei -20°C eingefroren oder frisch verwendet.

**Tabelle 11: Puffer für die Chitosomenisolierung**

Puffer	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	150 mM Trizin, pH auf 7,4 eingestellt 0,44 M Saccharose 10 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 8 µM Antipain 0,3 µM Aprotinin 1 mM Benzamidin 1 µM Bestatin 10 µM Chymostatin 5 µM Leupeptin 1,5 µM Pepstatin 1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid
Gradientenpuffer	10 mM Tricin, pH auf 7,4 eingestellt 1 mM EDTA 30 % (w/v) bzw. 60 % (w/v) Saccharose

### Isolierung von Tubulin aus Schweinehirn

Die Isolierung von Tubulin erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Williams (Williams & Lee, 1982).

Für eine effektive Isolierung von Tubulin aus Schweinehirnen werden mindestens 700 g Hirnmasse benötigt, dies entspricht etwa 10 ganzen Schweinehirnen. Die Schweinehirne wurden frisch vom Schlachthof geholt, möglichst zügig ins Labor transportiert und dabei stets ohne Verpackung von Eis bedeckt gehalten. Sämtliche benötigten Rotoren wurden rechtzeitig durch warmes Wasser oder Eis auf die jeweils benötigte Temperatur gebracht, auch die Zentrifugentemperatur musste frühzeitig angepasst werden.

Die Schweinehirne wurden zunächst im Kühlraum auf Eis möglichst zügig von Bindegewebe, Adern und Meningen befreit. Jeweils 350 g Hirnmasse wurde mit 350 ml Puffer A (mit frischem

ATP und DTT) im Mixer homogenisiert. Dabei wurde in 5-Sekunden-Intervallen gemixt, bis das Gemisch eine cremige Milkshake-Erscheinung annahm. Die beiden Homogenisate wurden nun auf zwei GSA Zentrifugenbecher verteilt und 70 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Das Volumen der Überstände wurde bestimmt und ein ¼ Volumen vorgewärmtes Glycerin sowie 2 mM ATP hinzu gegeben. Anschließend polymerisierten die Mikrotubuli 30 min lang in einem Erlenmeyer-Kolben im Wasserbad bei 35°C unter leichtem Schütteln. Die polymerisierten Mikrotubuli konnten nun abzentrifugiert werden, in der Ultrazentrifuge bei 140.000 g, 50 min, 32°C. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets vorsichtig in ca. 5 ml Puffer C gelöst. Anschließend wurde die Masse im Homogenisator vorsichtig homogenisiert.

Die Mikrotubuli wurden nun erneut depolymerisiert, dies geschah für 25 min auf Eis, zwischendurch wurde vorsichtig homogenisiert. Nun wurde die Masse für 30 min bei 100.000 g und 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde das Volumen des Überstands bestimmt und ATP bis zu einer Endkonzentration von 2 mM hinzu gegeben. Die Flüssigkeit wurde erneut bei 35°C leicht schüttelnd inkubiert. Nach 30 min wurden die nun abermals polymerisierten Mikrotubuli 60 min bei 80.000 g und 35°C sedimentiert, der Überstand wurde verworfen und die Pellets vorsichtig gesammelt.

An dieser Stelle konnten die Pellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt werden, um am nächsten Tag mit der Aufreinigung fortzufahren.

Die Mikrotubuli-Pellets wurden aufgetaut, mit möglichst wenig Puffer B (maximal 50 ml) im Homogenisator resuspendiert und 25 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde gelegentlich homogenisiert. Danach wurden die Mikrotubuli bei 4°C und 100.000 g 30 min zentrifugiert.

Anschließend wurde das Volumen des Überstandes bestimmt, 1/10 Volumen DMSO sowie 2 mM ATP hinzugefügt und alles zusammen 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Die nun wieder polymerisierten Mikrotubuli wurden 60 min bei 35°C und 80.000 g abzentrifugiert.

Das Pellet wurde mit Spateln vorsichtig in einen Homogenisator überführt und in etwa 5 ml Puffer D homogenisiert. Danach wurden die Mikrotubuli für 30 min auf Eis depolymerisiert und anschließend durch Zentrifugation bei 80.000 g und 4°C über 30 min von den Präzipitaten getrennt. Der Überstand wurde auf eine P11-Säule aufgetragen und mit einer Durchflussrate von 0,1ml/min mit Puffer D langsam eluiert. Die Hauptfraktionen der Elution, die eine

Konzentration von etwa 2mg/ml Protein aufweisen, wurden vereinigt und 0,1 mM GTP hinzugefügt. Der Mikrotubuli-Pool wurde in jeweils 50 µl-Einheiten aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Per SDS-PAGE wurde die Präparation kontrolliert, im Bradford-Assay die Proteinkonzentration bestimmt.

**Tabelle 9: Puffer für die Tubulin-Isolierung**

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	0,1 M Pipes 2 mM EGTA 1 mM MgSO <sub>4</sub> mit NaOH auf pH 6,9 eingestellt frisch dazu: 0,1 mM ATP 1 mM DTT
Puffer B	0,5 M NaK-Pipes 2 mM EGTA 1 mM MgSO <sub>4</sub> mit NaOH auf pH 6,9 eingestellt
Puffer C	0,1 M Pipes 1 mM EGTA 1 mM MgSO <sub>4</sub> frisch dazu: 1 mM ATP 1 mM DTT
Puffer D	0,1 M Pipes mit NaOH auf pH 6,94 eingestellt 2 mM EGTA 1 mM MgSO <sub>4</sub> frisch dazu: 0,05 mM ATP 22 µM GTP 1 mM DTT

### Fluoreszenz-Markierung von Tubulin

Die Fluoreszenz-Markierung von Tubulin wurde nach einem Protokoll von Tim Mitchinson durchgeführt. Auch bei der Markierung mussten sämtliche Rotoren, Zentrifugen, Gefäße und Lösungen rechtzeitig vorgewärmt bzw. abgekühlt werden, die Einhaltung der Temperaturen ist wie bei der Tubulin-Isolierung sehr wichtig!



Zunächst wurden 12 ml Tubulin aufgetaut, in einem 50 ml Falcon-Tube auf Eis zusammengeführt und 1/20 Volumen BRB80 zugefügt. Die Konzentration von  $\text{MgCl}_2$  wurde auf insgesamt 4 mM erhöht. Es wurde 1 mM GTP hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung auf 37°C erwärmt, 1/3 Volumen Glycerin zugegeben und für 40 min bei 37°C inkubiert.

Das polymerisierte Tubulin wurde auf warme Glycerin-Kissen 1-Lösung gegeben und für 60 min bei 37°C und 180.000 g zentrifugiert. Die Kissen wurden einmal mit warmem Markierungspuffer gewaschen und die Pellets in insgesamt 2,5 ml Markierungspuffer gelöst.

Der Fluoreszenzfarbstoff Tamra C-1171 (Molecular Probes, Invitrogen) wurde in DMSO gelöst, seine Konzentration betrug 100 mM. Zu den polymerisierten Mikrotubuli wurden 4 mM des Fluoreszenzfarbstoffes gegeben und bei 37°C 30 min inkubiert, dabei wurde alle 2-3 min vorsichtig invertiert. Dann wurde die gleiche Menge Quench hinzugegeben.

Jeweils 2 ml der Mikrotubuli wurden anschließend auf 1 ml warme Glycerin-Kissen 2 pipettiert und für 30 min bei 37°C und 200.000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Kissen zweimal mit Wasser gewaschen. Danach wurden die Pellets in jeweils 0,5 ml eiskalter IB-Lösung resuspendiert, in einem Homogenisator vereinigt und 30 min auf Eis inkubiert, wobei etwa alle 30 s homogenisiert wurde.

Die depolymerisierten Mikrotubuli wurden 10 min bei 2°C und 400.000 g zentrifugiert. Nun wurde 1/5 Volumen BRB80 hinzugegeben, die Konzentration von  $\text{MgCl}_2$  auf 4 mM, die Konzentration von GTP auf 1 mM erhöht und 45 min bei 37°C inkubiert.

Die jetzt wieder polymerisierten Mikrotubuli wurden auf zwei 0,7 ml Glycerin-Kissen 2 verteilt und für 30 min bei 37°C und 200.000 g zentrifugiert.

Das Kissen wurde zweimal mit warmem Wasser gewaschen, die Pellets zweimal mit warmem BRB80-Puffer. Zu jedem Pellet wurden 150  $\mu\text{l}$  IB-Lösung hinzugegeben, die Pellets gelöst, zusammengeführt, jedes Zentrifugenröhrchen mit 150  $\mu\text{l}$  IB-Lösung gespült und alles für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die depolymerisierten Mikrotubuli für 5 min bei 4°C und 400.000 g zentrifugiert, danach die Überstände vereinigt und in Aliquots von 3  $\mu\text{l}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren.

**Tabelle 10: Puffer für die Tubulin-Markierung**

Puffer	Zusammensetzung
BRB 80 (einfach)	80 mM Pipes 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA pH auf 6,8 mit KOH eingestellt
Glyzerin-Kissen 1	0,1 M HEPES pH auf 8,6 eingestellt 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 60% (v/v) Glyzerin
Glyzerin-Kissen 2	60% (v/v) Glyzerin in BRB80
Markierungspuffer	0,1 M HEPES pH auf 8,6 eingestellt 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 40% (v/v) Glyzerin
Quench	2-fach BRB80 100 mM KGlutamat 40% (v/v) Glyzerin
IB-Lösung (10-fach)	500 mM KGlutamat 5 mM MgCl <sub>2</sub>

### Photometrische Beobachtung der Mikrotubuli-Polymerisation

Polymerisierte Mikrotubuli weisen bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 350 nm eine deutlich höhere Absorption auf als unpolymerisiertes Tubulin. Die Polymerisation und Depolymerisation von Mikrotubuli kann daher auf einfache Art und Weise am Photometer verfolgt werden. Hierzu wurde Tubulin auf Eis aufgetaut, anschließend 48 µl mit 50 µl eiskaltem BRB80 (s. Abschnitt 0) und 2 µl GTP in eine Küvette pipettiert. Die Küvette wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle 5 min wurde die Absorption bei 350 nm bestimmt. Erreichte die Absorption einen konstanten Level, wurde die Küvette 30 min auf Eis inkubiert. Danach

wurde die Absorption erneut gemessen, die Küvette wieder erwärmt und die Messung alle 5 min wiederholt. Dieser Vorgang konnte mehr als dreimal wiederholt werden.

### Herstellung Taxol-stabilisierter Mikrotubuli

Taxol bindet an die  $\beta$ -Untereinheit von Tubulin und stabilisiert mit GTP polymerisierte Mikrotubuli. Um die Mikrotubuli unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurde zunächst 1  $\mu$ l Fluoreszenz-markiertes Tubulin mit 50  $\mu$ l nativem Tubulin gemischt. Zur Polymerisation von Mikrotubuli aus diesem Ansatz wurde in einem 500  $\mu$ l-Reaktionsgefäß folgender Ansatz zusammenpipettiert und gründlich gevortext:

**Tabelle 11: Polymerisationsansatz**

Volumen	Lösung	Konzentration Stocklösung	Endkonzentration
10 $\mu$ l	Tubulin	10 mg/ml	~32 mM
0,6 $\mu$ l	DMSO	100%	5%
0,5 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub>	100 mM	4 mM
0,5 $\mu$ l	GTP	25 mM	1 mM
0,9 $\mu$ l	BRB80		

Der Ansatz wurde für 30 min im Heizblock bei 37°C inkubiert. 5  $\mu$ l des Ansatzes wurden nach der Polymerisation zu 495  $\mu$ l 10  $\mu$ M Taxol in BRB80 pipettiert und 5 s gevortext. Die so gewonnenen, stabilen Mikrotubuli konnten direkt mikroskopiert werden und bis zu eine Woche im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

### Bewegung der Mikrotubuli auf einem Objektträger

Durch die Verwendung von Kinesinkonstrukten, die auf einem Objektträger haften und deren Motordomäne funktionsfähig ist, kann die Bewegung von Mikrotubuli auf der Oberfläche des Objektträgers beobachtet und quantitativ ausgewertet werden. Hierzu wurden in einem Reaktionsgefäß 5  $\mu$ l Casein-Lösung, 1  $\mu$ l Kinesin-Lösung, 1  $\mu$ l BRB80, 1  $\mu$ l ATP, 1  $\mu$ l Glukose-Lösung, 1  $\mu$ l Enzym-Mix und 1  $\mu$ l Taxol-stabilisierte Mikrotubuli gemischt und in eine Fließkammer pipettiert. Die Fließkammer wurde gebaut indem zwei Streifen doppelseitiges

Klebeband (rib, Taufkirchen) mit einer Dicke von 130  $\mu\text{m}$  in einem Abstand von etwa 3 mm nebeneinander auf einen Objektträger geklebt wurden. Auf die Klebebandstreifen wurde ein Deckglas geklebt, die so entstandene Fließkammer hatte ein Volumen von etwa 5-10  $\mu\text{l}$ .

Nachdem die Mikrotubuli in die Fließkammer gespült wurden, wurde diese etwa 5 min in einer Petrischale mit einem feuchten Papiertuch („feuchte Kammer“) inkubiert, anschließend konnte die Bewegung der Mikrotubuli über den Objektträger unter dem Mikroskop beobachtet werden.

Es wurden Objektträger und/oder Deckgläschen mit durch DPN erzeugte Muster von Phospholipiden und ohne diese verwendet. Die Phospholipide verfügten über einen Nickelzusatz, so dass Kinesinkonstrukte mit funktionsfähiger Motor- aber ohne Schwanzdomäne an diesen haften blieben. So konnten Muster, die als Straßen für die Mikrotubuli dienten, erzeugt werden.

### **Transport von Vesikeln oder Latex-Kügelchen durch Mikrotubuli**

Verschiedene Kinesinkonstrukte wurden unspezifisch an carboxylierte Latex-Kügelchen (Polysciences, Warrington, USA), die einen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  hatten, gebunden. Aufgereinigte Kinesinkonstrukte wurden verdünnt und mit der gleichen Menge Kügelchen (1:5 verdünnt in BRB80) und Casein (5 mg/ml) gemischt. Diese Lösung wurde mindestens 5 min inkubiert und konnte auf Eis maximal 30 min gelagert werden. Direkt vor dem Mikroskopieren wurde 1  $\mu\text{l}$  der Kinesin-Kügelchen-Lösung in 400  $\mu\text{l}$  BRB80 mit 0,1 mg/ml Casein verdünnt. 4  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurde dann mit 12  $\mu\text{l}$  Motilitätspuffer (BRB80 mit 100 mM KCl, 2 mM ATP, 1 mg/ml Casein) gemischt und in eine Fließkammer (siehe 0) mit immobilisierten Mikrotubuli pipettiert.

Um Mikrotubuli in der Fließkammer zu immobilisieren, wurde die Kammer zunächst mit einem polyklonalen anti-Tubulin-Antikörper (anti- $\alpha$  oder anti- $\beta$ , Sigma) für mindestens 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurde die Kammer mit drei Volumen BRB80 gespült und anschließend eine 1:50 Verdünnung von Fluoreszenz-markierten Mikrotubuli eingespült. Nach einer Inkubationszeit von 1-3 min wurden ungebundene Mikrotubuli durch Spülen der Kammer mit drei Volumen BRB80 mit 1 mg/ml Casein entfernt. Bevor die Kammer mit den Kinesin-Kügelchen gefüllt wurde, wurde das Binden der Mikrotubuli an den Objektträger mikroskopisch kontrolliert.

Anstelle der Kinesin-beschichteten Latex-Kügelchen konnten auch direkt entsprechend verdünnte Fraktionen der Vesikel-Isolierung (siehe 0) in die Kammer gespült werden.

## Literaturverzeichnis

- Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., and Machida, M.** (2006). Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia*, **162**, 143-153.
- Akhmanova, A. and Hoogenraad, C. C.** (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr. Opin. Cell Biol*, **17**, 47-54.
- Astanina, K. and Jacob, R.** (2010). KIF5C, a kinesin motor involved in apical trafficking of MDCK cells. *Cell. Mol. Life Sci*, **67**, 1331-1342.
- Bachand, G. D., Rivera, S. B., Carroll-Portillo, A., Hess, H., and Bachand, M.** (2006). Active capture and transport of virus particles using a biomolecular motor-driven, nanoscale antibody sandwich assay. *Small*, **2**, 381-385.
- Banani, E., Murray, J. W., Stockert, R. J., Satir, P., and Wolkoff, A. W.** (2000). Microtubule and motor-dependent endocytic vesicle sorting in vitro. *J. Cell Biol*, **151**, 179-186.
- Barboiu, M. and Lehn, J.** (2002). Dynamic chemical devices: modulation of contraction/extension molecular motion by coupled-ion binding/pH change-induced structural switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 5201-5206.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., López-Franco, R., and Bracker, C. E.** (1995). Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp. Mycol*, **19**, 153-159.
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C. E., Lippman, E., and Ruiz-Herrera, J.** (1984). Chitosomes from the wall-less "slime" mutant of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol*, **139**, 105-112.
- Bartnicki-Garcia, S.** (2006). Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res*, **6**, 957-965.
- Bassilana, M. and Arkowitz, R. A.** (2006). Rac1 and Cdc42 have different roles in *Candida albicans* development. *Eukaryotic Cell*, **5**, 321-329.
- Beinhauer, J. D., Hagan, I. M., Hegemann, J. H., and Fleig, U.** (1997). Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J. Cell Biol*, **139**, 717-728.
- Bottier, C., Fattaccioli, J., Tarhan, M. C., Yokokawa, R., Morin, F. O., Kim, B., Collard, D., and Fujita, H.** (2009). Active transport of oil droplets along oriented microtubules by kinesin molecular motors. *Lab Chip*, **9**, 1694-1700.
- Bracker, C. E., Ruiz-Herrera, J., and Bartnicki-Garcia, S.** (1976). Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 4570-4574.

- Browne, W. R. and Feringa, B. L.** (2006). Making molecular machines work. *Nat Nanotechnol*, **1**, 25-35.
- Browning, H., Hayles, J., Mata, J., Aveline, L., Nurse, P., and McIntosh, J. R.** (2000). Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *J. Cell Biol*, **151**, 15-28.
- Bryan, J. and Wilson, L.** (1971). Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1762-1766.
- Carminati, J. L. and Stearns, T.** (1997). Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J. Cell Biol*, **138**, 629-641.
- Castoldi, M. and Popov, A. V.** (2003). Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif*, **32**, 83-88.
- Caviston, J. P. and Holzbaur, E. L. F.** (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol*, **16**, 530-537.
- Clemmens, J., Hess, H., Doot, R., Matzke, C. M., Bachand, G. D., and Vogel, V.** (2004). Motor-protein "roundabouts": microtubules moving on kinesin-coated tracks through engineered networks. *Lab Chip*, **4**, 83-86.
- Court, H. and Sudbery, P.** (2007). Regulation of Cdc42 GTPase activity in the formation of hyphae in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 265-281.
- Deacon, S. W., Serpinskaya, A. S., Vaughan, P. S., Lopez Fanarraga, M., Vernos, I., Vaughan, K. T., and Gelfand, V. I.** (2003). Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J. Cell Biol*, **160**, 297-301.
- Den, W. and Huang, C.** (2006). Parameter optimization and design aspect for electrocoagulation of silica nano-particles in wafer polishing wastewater. *Water Sci. Technol*, **53**, 187-194.
- Desai, A. and Mitchison, T. J.** (1998). Preparation and characterization of caged fluorescein tubulin. *Meth. Enzymol*, **298**, 125-132.
- DeVilje, R. E. L. and Vanden-Eijnden, E.** (2008). Regular gaits and optimal velocities for motor proteins. *Biophys. J*, **95**, 2681-2691.
- Díaz, S., Zínker, S., and Ruiz-Herrera, J.** (1992). Alterations in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* induced by the alpha sex factor or a mutation in the cell cycle. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **61**, 269-276.
- Dijksterhuis, J.** (2003). Confocal microscopy of Spitzenkörper dynamics during growth and differentiation of rust fungi. *Protoplasma*, **222**, 53-59.
- Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R., and Ledbetter, D. H.** (1993). Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the

- LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA*, **270**, 2838-2842.
- Doshi, P., Bossie, C. A., Doonan, J. H., May, G. S., and Morris, N. R.** (1991). Two alpha-tubulin genes of *Aspergillus nidulans* encode divergent proteins. *Mol. Gen. Genet*, **225**, 129-141.
- Drummond, D. R. and Cross, R. A.** (2000). Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Biol*, **10**, 766-775.
- Duke, T.** (2002). Push or pull? Teams of motor proteins have it both ways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 6521-6523.
- Efimov, V. P., Zhang, J., and Xiang, X.** (2006). CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 2021-2034.
- Félix, M. A., Antony, C., Wright, M., and Maro, B.** (1994). Centrosome assembly in vitro: role of gamma-tubulin recruitment in *Xenopus* sperm aster formation. *J. Cell Biol*, **124**, 19-31.
- Fischer, T., Agarwal, A., and Hess, H.** (2009). A smart dust biosensor powered by kinesin motors. *Nat Nanotechnol*, **4**, 162-166.
- Franck, A. D., Powers, A. F., Gestaut, D. R., Davis, T. N., and Asbury, C. L.** (2010). Direct physical study of kinetochore-microtubule interactions by reconstitution and interrogation with an optical force clamp. *Methods*, **51**, 242-250.
- Fridolfsson, H. N. and Starr, D. A.** (2010). Kinesin-1 and dynein at the nuclear envelope mediate the bidirectional migrations of nuclei. *J. Cell Biol*, **191**, 115-128.
- Gill, S. R., Schroer, T. A., Szilak, I., Steuer, E. R., Sheetz, M. P., and Cleveland, D. W.** (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol*, **115**, 1639-1650.
- Ginger, D. S., Zhang, H., and Mirkin, C. A.** (2004). The evolution of dip-pen nanolithography. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, **43**, 30-45.
- GIRBARDT, M.** (1956). [A method for comparison of living and fixed structures in fungi]. *Z Wiss Mikrosk*, **63**, 16-21.
- Goel, A. and Vogel, V.** (2008). Harnessing biological motors to engineer systems for nanoscale transport and assembly. *Nat Nanotechnol*, **3**, 465-475.
- Grier, D. G.** (2003). A revolution in optical manipulation. *Nature*, **424**, 810-816.
- Grove, S. N. and Bracker, C. E.** (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *J. Bacteriol*, **104**, 989-1009.
- Gundersen, G. G. and Bretscher, A.** (2003). Cell biology. Microtubule asymmetry.

*Science*, **300**, 2040-2041.

- Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N. R., and Xiang, X.** (2001). The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr. Biol*, **11**, 719-724.
- Harris, S. D.** (2005). Morphogenesis in germinating *Fusarium graminearum* macroconidia. *Mycologia*, **97**, 880-887.
- He, B., Xi, F., Zhang, J., TerBush, D., Zhang, X., and Guo, W.** (2007). Exo70p mediates the secretion of specific exocytic vesicles at early stages of the cell cycle for polarized cell growth. *J. Cell Biol*, **176**, 771-777.
- Heath, I. B. and Rethoret, K.** (1981). Nuclear cycle of *Saprolegnia ferax*. *J. Cell. Sci*, **49**, 353-367.
- Hess, H. and Vogel, V.** (2001). Molecular shuttles based on motor proteins: active transport in synthetic environments. *J. Biotechnol*, **82**, 67-85.
- Hess, H., Bachand, G. D., and Vogel, V.** (2004). Powering nanodevices with biomolecular motors. *Chemistry*, **10**, 2110-2116.
- van den Heuvel, M. G. L., Butcher, C. T., Lemay, S. G., Diez, S., and Dekker, C.** (2005). Electrical docking of microtubules for kinesin-driven motility in nanostructures. *Nano Lett*, **5**, 235-241.
- van den Heuvel, M. G. L. and Dekker, C.** (2007). Motor proteins at work for nanotechnology. *Science*, **317**, 333-336.
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N., and Fischer, R.** (2009). The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, **8**, 957-967.
- Hiratsuka, Y., Tada, T., Oiwa, K., Kanayama, T., and Uyeda, T. Q.** (2001). Controlling the direction of kinesin-driven microtubule movements along microlithographic tracks. *Biophys. J*, **81**, 1555-1561.
- Höög, J. L. and Antony, C.** (2007). Whole-cell investigation of microtubule cytoskeleton architecture by electron tomography. *Methods Cell Biol*, **79**, 145-167.
- Horio, T., Uzawa, S., Jung, M. K., Oakley, B. R., Tanaka, K., and Yanagida, M.** (1991). The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J. Cell. Sci*, **99 ( Pt 4)**, 693-700.
- Howard, J.** (1996). The movement of kinesin along microtubules. *Annu. Rev. Physiol*, **58**, 703-729.
- Howard, J. and Hyman, A. A.** (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, **422**, 753-758.



- Howard, R. J.** (1981). Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J. Cell. Sci.*, **48**, 89-103.
- Howard, R. J. and Aist, J. R.** (1980). Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. *J. Cell Biol.*, **87**, 55-64.
- Hyman, A. and Karsenti, E.** (1998). The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J. Cell. Sci.*, **111 ( Pt 15)**, 2077-2083.
- Jamison, D. K., Driver, J. W., Rogers, A. R., Constantinou, P. E., and Diehl, M. R.** (2010). Two kinesins transport cargo primarily via the action of one motor: implications for intracellular transport. *Biophys. J.*, **99**, 2967-2977.
- Jeune-Smith, Y., Agarwal, A., and Hess, H.** (2010). Cargo loading onto kinesin powered molecular shuttles. *J Vis Exp.*
- Joshi, H. C.** (1994). Microtubule organizing centers and gamma-tubulin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 54-62.
- Kamada, T., Bracker, C. E., and Bartnicki-Garcia, S.** (1991). Chitosomes and chitin synthetase in the asexual life cycle of *Mucor rouxii*: spores, mycelium and yeast cells. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 1241-1252.
- Kang, M. S. and Cabib, E.** (1986). Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1----3)-beta-D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5808-5812.
- Karsenti, E., Kobayashi, S., Mitchison, T., and Kirschner, M.** (1984). Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. *J. Cell Biol.*, **98**, 1763-1776.
- Keating, T. J. and Borisy, G. G.** (1999). Centrosomal and non-centrosomal microtubules. *Biol. Cell*, **91**, 321-329.
- Kim and Lieber** (1999). Nanotube nanotweezers. *Science*, **286**, 2148-2150.
- Kirschner, M. W.** (1978). Microtubule assembly and nucleation. *Int. Rev. Cytol.*, **54**, 1-71.
- Konzack, S., Rischitor, P. E., Enke, C., and Fischer, R.** (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 497-506.
- Korten, T. and Diez, S.** (2008). Setting up roadblocks for kinesin-1: mechanism for the selective speed control of cargo carrying microtubules. *Lab Chip*, **8**, 1441-1447.
- Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J., and Vale, R. D.** (1996). Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*, **380**, 550-555.

- Leal-Morales, C. A., Bracker, C. E., and Bartnicki-Garcia, S.** (1988). Localization of chitin synthetase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 8516-8520.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K. M., Schliwa, M., Kahmann, R., and Bölker, M.** (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **16**, 3464-3473.
- López-Franco, R., Bartnicki-Garcia, S., and Bracker, C. E.** (1994). Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12228-12232.
- Mata, J. and Nurse, P.** (1997). *tea1* and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell*, **89**, 939-949.
- May, K. M., Win, T. Z., and Hyams, J. S.** (1998). Yeast myosin II: a new subclass of unconventional conventional myosins? *Cell Motil. Cytoskeleton*, **39**, 195-200.
- McDaniel, D. P. and Roberson, R. W.** (2000). Microtubules Are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genet. Biol*, **31**, 233-244.
- Minke, P. F., Lee, I. H., Tinsley, J. H., Bruno, K. S., and Plamann, M.** (1999). *Neurospora crassa* ro-10 and ro-11 genes encode novel proteins required for nuclear distribution. *Mol. Microbiol*, **32**, 1065-1076.
- Mitchison, T. and Kirschner, M.** (1984). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, **312**, 232-237.
- Mouriño-Pérez, R. R., Roberson, R. W., and Bartnicki-García, S.** (2006). Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol*, **43**, 389-400.
- Muthukrishnan, G., Hutchins, B. M., Williams, M. E., and Hancock, W. O.** (2006). Transport of semiconductor nanocrystals by kinesin molecular motors. *Small*, **2**, 626-630.
- Neumann, T., Kirschstein, S. O., Camacho Gomez, J. A., Kittler, L., and Unger, E.** (2001). Determination of the net exchange rate of tubulin dimer in steady-state microtubules by fluorescence correlation spectroscopy. *Biol. Chem*, **382**, 387-391.
- Nickel, W.** (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem*, **270**, 2109-2119.
- Nickel, W.** (2005). Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*, **6**, 607-614.
- Nitzsche, B., Ruhnnow, F., and Diez, S.** (2008). Quantum-dot-assisted characterization of microtubule rotations during cargo transport. *Nat Nanotechnol*, **3**, 552-556.

- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., and Downing, K. H.** (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*, **96**, 79-88.
- Oakley, B. R.** (2000). gamma-Tubulin. *Curr. Top. Dev. Biol*, **49**, 27-54.
- Oegema, K., Wiese, C., Martin, O. C., Milligan, R. A., Iwamatsu, A., Mitchison, T. J., and Zheng, Y.** (1999). Characterization of two related Drosophila gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J. Cell Biol*, **144**, 721-733.
- Ou, X., Li, S., Xu, B., Wang, Z., Quan, S., Li, M., Zhang, Q., Ouyang, Y., Schatten, H., Xing, F., et al.** (2010). p38 $\alpha$  MAPK is a MTOC-associated protein regulating spindle assembly, spindle length and accurate chromosome segregation during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle*, **9**, 4130-4143.
- Palestini, P., Pitto, M., Tedeschi, G., Ferraretto, A., Parenti, M., Brunner, J., and Masserini, M.** (2000). Tubulin anchoring to glycolipid-enriched, detergent-resistant domains of the neuronal plasma membrane. *J. Biol. Chem*, **275**, 9978-9985.
- Park, H. and Bi, E.** (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, **71**, 48-96.
- Pelham, H. R.** (2001). SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol*, **11**, 99-101.
- Pierotti, M. A., Lombardo, C., and Rosano, C.** (2008). Nanotechnology: going small for a giant leap in cancer diagnostics and therapeutics. *Tumori*, **94**, 191-196.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**, 453-465.
- PONTECORVO, G., ROPER, J. A., HEMMONS, L. M., MACDONALD, K. D., and BUFTON, A. W. J.** (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet*, **5**, 141-238.
- Pruyne, D. W., Schott, D. H., and Bretscher, A.** (1998). Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J. Cell Biol*, **143**, 1931-1945.
- Rasooly, A. and Herold, K. E.** (2009). Biosensors and biodetection: methods and protocols. Preface. *Methods Mol. Biol*, **503**, v-ix.
- Rayner, J. C. and Pelham, H. R.** (1997). Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J*, **16**, 1832-1841.
- Reggiori, F. and Pelham, H. R.** (2001). Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J*, **20**, 5176-5186.
- Requena, N., Alberti-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen,**

- P., Liese, R., and Fischer, R.** (2001). Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol*, **42**, 121-132.
- Richardson and Kokki** (1999). Lipid preparations of amphotericin for the treatment of fungal infections. *Br. J. Haematol*, **105**, 847-849.
- Riquelme, M., Fischer, R., and Bartnicki-García, S.** (2003). Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma*, **222**, 211-215.
- Riquelme, M., Gierz, G., and Bartnicki-García, S.** (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology (Reading, Engl.)*, **146 ( Pt 7)**, 1743-1752.
- Riquelme, M., Reynaga-Peña, C. G., Gierz, G., and Bartnicki-García, S.** (1998). What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genet. Biol*, **24**, 101-109.
- Riquelme, M., Roberson, R. W., McDaniel, D. P., and Bartnicki-García, S.** (2002). The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol*, **37**, 171-179.
- Rischitor, P. E., Konzack, S., and Fischer, R.** (2004). The Kip3-like kinesin KipB moves along microtubules and determines spindle position during synchronized mitoses in *Aspergillus nidulans* hyphae. *Eukaryotic Cell*, **3**, 632-645.
- Roncero, C.** (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet*, **41**, 367-378.
- Rothmund, P. W. K.** (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, **440**, 297-302.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., and Creppy, E. E.** (2002). Fungal flora and ochratoxin a production in grapes and musts from france. *J. Agric. Food Chem*, **50**, 1306-1311.
- Sauter, A., Howard, S. P., and Braun, V.** (2003). In vivo evidence for TonB dimerization. *J. Bacteriol*, **185**, 5747-5754.
- Savage, C., Hamelin, M., Culotti, J. G., Coulson, A., Albertson, D. G., and Chalfie, M.** (1989). *mec-7* is a beta-tubulin gene required for the production of 15- protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, **3**, 870-881.
- Schliebs, W., Würtz, C., Kunau, W., Veenhuis, M., and Rottensteiner, H.** (2006). A eukaryote without catalase-containing microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. *Eukaryotic Cell*, **5**, 1490-1502.

- Schnitzer, M. J. and Block, S. M.** (1997). Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature*, **388**, 386-390.
- Schoch, C. L., Aist, J. R., Yoder, O. C., and Gillian Turgeon, B.** (2003). A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.*, **39**, 1-15.
- Schroer, T. A.** (2004). Dynactin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, 759-779.
- Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G., and Schliwa, M.** (1997a). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J.*, **16**, 3025-3034.
- Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G., and Schliwa, M.** (1997b). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J.*, **16**, 3025-3034.
- Seiler, S., Plamann, M., and Schliwa, M.** (1999). Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Curr. Biol.*, **9**, 779-785.
- Shen, Y., Peng, H., Pan, S., Feng, M., Wen, Y., Deng, J., Luo, X., and Wu, C.** (2010). Interaction of DNA/nuclear protein/polycation and the terplexes for gene delivery. *Nanotechnology*, **21**, 045102.
- Spetzler, D., York, J., Dobbin, C., Martin, J., Ishmukhametov, R., Day, L., Yu, J., Kang, H., Porter, K., Hornung, T., et al.** (2007). Recent developments of bio-molecular motors as on-chip devices using single molecule techniques. *Lab Chip*, **7**, 1633-1643.
- Steinberg** (1998). Organelle transport and molecular motors in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, **24**, 161-177.
- Steinberg, G. and Schliwa, M.** (1995). The *Neurospora* organelle motor: a distant relative of conventional kinesin with unconventional properties. *Mol. Biol. Cell*, **6**, 1605-1618.
- Steinberg, G.** (2007). Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytol.*, **174**, 721-733.
- Straube, A., Brill, M., Oakley, B. R., Horio, T., and Steinberg, G.** (2003). Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 642-657.
- Stroschio, J. A. and Eigler, D. M.** (1991). Atomic and molecular manipulation with the scanning tunneling microscope. *Science*, **254**, 1319-1326.
- Sudbery, P. E. and Gladfelter, A. S.** (2008). Pathocycles. *Fungal Genet. Biol.*, **45**, 1-5.
- Suelmann, R., Sievers, N., and Fischer, R.** (1997). Nuclear traffic in fungal hyphae: in

- vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol*, **25**, 757-769.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Osmani, S. A., and Oakley, B. R.** (2008). The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 1439-1449.
- Taira, S., Du, Y., Hiratsuka, Y., Konishi, K., Kubo, T., Uyeda, T. Q. P., Yumoto, N., and Kodaka, M.** (2006). Selective detection and transport of fully matched DNA by DNA-loaded microtubule and kinesin motor protein. *Biotechnol. Bioeng*, **95**, 533-538.
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S., and Fischer, R.** (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 339-351.
- Takeshita, N., Vienken, K., Rolbetzki, A., and Fischer, R.** (2007). The *Aspergillus nidulans* putative kinase, KfsA (kinase for septation), plays a role in septation and is required for efficient asexual spore formation. *Fungal Genet. Biol*, **44**, 1205-1214.
- Tarhan, M. C., Yokokawa, R., Bottier, C., Collard, D., and Fujita, H.** (2010). A nano-needle/microtubule composite gliding on a kinesin-coated surface for target molecule transport. *Lab Chip*, **10**, 86-91.
- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D., and Novick, P.** (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **15**, 6483-6494.
- TerBush, D. R. and Novick, P.** (1995). Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol*, **130**, 299-312.
- That, T. C., Rossier, C., Barja, F., Turian, G., and Roos, U. P.** (1988). Induction of multiple germ tubes in *Neurospora crassa* by antitubulin agents. *Eur. J. Cell Biol*, **46**, 68-79.
- Torralba, S. and Heath, I. B.** (2001). Cytoskeletal and Ca<sup>2+</sup> regulation of hyphal tip growth and initiation. *Curr. Top. Dev. Biol*, **51**, 135-187.
- Vale, R. D. and Milligan, R. A.** (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, **288**, 88-95.
- Vale, R. D., Schnapp, B. J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T. S., and Sheetz, M. P.** (1985). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell*, **43**, 623-632.
- Vale, R. D.** (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, **112**, 467-480.



- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V. P., and Fischer, R.** (2005). Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell. Sci.*, **118**, 3705-3716.
- Verhey, K. J. and Hammond, J. W.** (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 765-777.
- Virag, A. and Harris, S. D.** (2006). Functional characterization of *Aspergillus nidulans* homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spa2 and Bud6. *Eukaryotic Cell*, **5**, 881-895.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M. W., and Steinberg, G.** (2002). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.*, **21**, 2946-2957.
- Wendland, J. and Philippsen, P.** (2001). Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics*, **157**, 601-610.
- Whitesides, G. M. and Grzybowski, B.** (2002). Self-assembly at all scales. *Science*, **295**, 2418-2421.
- Williams, R. C. and Lee, J. C.** (1982). Preparation of tubulin from brain. *Meth. Enzymol.*, **85 Pt B**, 376-385.
- Xiang, X., Beckwith, S. M., and Morris, N. R.** (1994). Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 2100-2104.
- Xiang, X., Osmani, A. H., Osmani, S. A., Xin, M., and Morris, N. R.** (1995). NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol. Biol. Cell*, **6**, 297-310.
- Xue, X., Jaulin, F., Espenel, C., and Kreitzer, G.** (2010). PH-domain-dependent selective transport of p75 by kinesin-3 family motors in non-polarized MDCK cells. *J. Cell. Sci.*, **123**, 1732-1741.
- Yan, J., Skoko, D., and Marko, J. F.** (2004). Near-field-magnetic-tweezer manipulation of single DNA molecules. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.*, **70**, 011905.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E., and Timberlake, W. E.** (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1470-1474.
- Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R. D., and Selvin, P. R.** (2004). Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, **303**, 676-678.
- Yokokawa, R., Takeuchi, S., and Fujita, H.** (2004). Ultra-smooth glass channels for bioassay with motor proteins. *Analyst*, **129**, 850-854.

**Yu, W., Centonze, V. E., Ahmad, F. J., and Baas, P. W.** (1993). Microtubule nucleation and release from the neuronal centrosome. *J. Cell Biol*, **122**, 349-359.

**Zekert, N., Veith, D., and Fischer, R.** (2010). Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryotic Cell*, **9**, 795-805.



## Anhang

### Lebenslauf und Veröffentlichungen

# Lebenslauf

*Dipl.-Biol. Jan Siebenbrock - Gartenstraße 80 - 76135 Karlsruhe*

Geburtsdatum: 08.07.1981  
 Geburtsort: Viersen  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Studium

seit 03/2007 Promotion in der Mikrobiologie am Karlsruher Institut für Technologie, finanziert durch das Center for Functional Nanostructures (CFN)

05/2006 – 02/2007 externe Diplomarbeit in der Angewandten Mikrobiologie an der Universität Karlsruhe

10/2001 – 02/2007 Philipps-Universität Marburg, Studium der Biologie mit dem Schwerpunkt Mikrobiologie  
 Abschluss: Diplom-Biologe  
 Abschlussnote: 1,7

#### Schulbildung

09/1992 – 06/2001 Stiftisches Humanistisches Gymnasium, Mönchengladbach  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
 Abschlussnote: 1,9

09/1988 – 07/1992 Gemeinschafts-Grundschule Windberg, Mönchengladbach

#### Praktika / Berufserfahrung

10/2004 – 06/2006 Studentische Hilfskraft bei der Firma nadicom GmbH, Marburg

06/2004 – 09/2004 Studentische Hilfskraft im Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg

11/2003 – 05/2004 Studentische Hilfskraft im Fachbereich Biologie, Uni Marburg

07/2001 – 09/2001 Brasilieninitiative Avicres e.V., Praktikum im sozialen Bereich in Nova Iguacu, Brasilien

#### Veröffentlichungen

2010 Eggenberger K, Frey N, Zienicke B, Siebenbrock J, Schunck T, Fischer R, Bräse S, Birtalan E, Nann T, Nick P; *Adv. Biomat.*

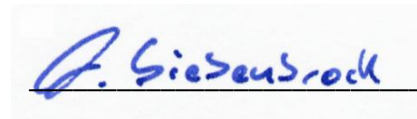
2010 Siebenbrock J, Schunck T, Fischer R; in Vorbereitung

2010 Schunck, T, Siebenbrock, J, Fischer R; in Vorbereitung

*Beiträge zu Konferenzen*

- 2009 Organisation und Poster: CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb (D)
- 2008 prämiertes Poster: International Symposium on Intra- and Intercellular Transport and Communication, Marburg (D)
- 2007 Poster: CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb (D)
- 2007 Poster: Fungi – Toxins – Food Meeting, Karlsruhe (D)
- 2007 prämiertes Poster: VAAM Symposium Molecular Biology of Fungi, Hamburg (D)
- 2007 Vortrag: 2nd meeting on fungi of Marburg and Karlsruhe, Hirschegg (A)

Karlsruhe, 16.12.2010



(Jan Siebenbrock)

## Dank

Am Ende einer Dissertation steht nicht nur die eigentliche Doktorarbeit, sondern immer auch eine ganze Reihe von Menschen, die zum Gelingen dieser einen erheblichen Teil beigetragen haben – bewusst und unbewusst.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Fischer. Reinhard, es war eine sehr lehrreiche Zeit bei dir in Karlsruhe! Ich freue mich noch heute darüber, bei dir gelandet zu sein. Vielen Dank für deine kompetente Betreuung und Unterstützung auch in schwierigen Zeiten!

Diese Dissertation wurde finanziert vom Center for Functional Nanostructures. Es war ein großes Glück, einer solch gut harmonisierenden Gruppe von DoktorandInnen zugehörig zu sein. Die Organisation der Summer School war ein zwar sehr anstrengendes, aber auch sehr lohnenswertes Highlight. Ich hoffe, wir halten unser Netzwerk aufrecht!

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fischer, vor allem bei den Mitarbeitern in der Außenstelle. Oft auf uns allein gestellt, haben wir eine ganze Menge aufgebaut. Vor allem vor Elisabeth, Tobi und Tanja ziehe ich den Hut – ohne euch wäre das Arbeiten in der Außenstelle nicht nur bedeutend schwieriger, sondern auch sehr viel langweiliger geworden. Es war schön, Kollegen wie Euch zu haben. Ich hoffe, wir bleiben auch nach dem Ende dieses Lebensabschnitts in Kontakt!

Ein großer Dank geht auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Requena und Kämper. Es war schön, mit euch zusammenarbeiten zu dürfen.

Seit Anfang meiner Diplomarbeit sind Dr. Bernhard Nüsslein und Matthias Töws eine große Hilfe in meinem wissenschaftlichen und auch privaten Leben für mich. Bei ihnen konnte ich immer sicher sein, ein offenes Ohr oder sämtliche benötigten Geräte und Materialien zu finden – ich hoffe, das wird noch lange so bleiben! Auch auf die anderen Mitarbeiter der Firma Nadicom freue ich mich sehr!

Ganz besonders wichtig für das Gelingen einer Doktorarbeit ist der Rückhalt – nicht nur wissenschaftlich, sondern auch privat. Ich habe das große Glück, eine tolle Familie im Rücken zu haben. Das ist nicht selbstverständlich und ich freue mich jeden Tag, dass es Euch gibt!

Mit Steffi werden auch die grauesten Momente bunt. Für keinen anderen Menschen dieser Welt bin ich so dankbar wie für Dich!