

Charakterisierung der Hydrophobine
in *Aspergillus nidulans* und deren Anwendung
zur Oberflächenbeschichtung und -funktionalisierung

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
Tanja Throm
aus Bretten

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Rolf Geisen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Wachstum und Entwicklung von <i>Aspergillus nidulans</i>	3
2.2	Die Zellwandbestandteile der filamentösen Pilze	6
2.3	Hydrophobine – ganz besondere Proteine aus Pilzen.....	7
2.3.1	Hydrophobine bilden <i>rodlets</i>	11
2.3.2	Strukturelle Analysen der Hydrophobine	12
2.3.3	Biotechnologische Anwendungen der Hydrophobine	14
2.3.4	Oberflächenbeschichtung mit funktionalisierten Hydrophobinen zur Verbesserung der Zelladhäsion.....	16
2.4	Hydrophobine in <i>Aspergillus nidulans</i>	17
2.5	Die Peptide RGD und LG3 (aus Laminin-5) und ihre Rolle in der Zelladhäsion.....	19
2.6	Der Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in Proteinen	21
2.6.1	Zwei Hydrophobine in <i>A. nidulans</i> besitzen einen mutmaßlichen GPI-Anker.	22
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Untersuchung der Funktion von zwei neuen Hydrophobinen durch Deletion.....	24
3.1.1	Darstellung der Hydrophobin <i>rodlets</i> auf den Sporen von <i>Aspergillus nidulans</i> mittels <i>atomic force microscopy</i>	24
3.1.2	Gendeletion von <i>dewB</i> und <i>dewC</i>	28
3.1.2.1	Deletion von <i>dewB</i>	29
3.1.2.2	Deletion von <i>dewC</i>	32
3.1.3	Kreuzung von $\Delta rodA/\Delta dewA$ mit $\Delta dewC$	36
3.2	Expression der Hydrophobine in <i>A. nidulans</i>	38
3.3	Lokalisierung der Hydrophobine in <i>A. nidulans</i>	40
3.4	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zur Untersuchung der Interaktion der Hydrophobine	43
3.5	Lokalisierung der Hydrophobine mittels RFP	44
3.5.1	Lokalisierung von RodA mit bzw. ohne GPI-Anker mittels RFP	45
3.5.2	Lokalisierung von DewB und DewC mit natürlichem Promotor mittels RFP...49	

3.6	Expression der Hydrophobine in <i>Escherichia coli</i>	52
3.6.1	Expression von DewA in <i>E. coli</i>	52
3.6.2	Expression von DewC in <i>E. coli</i>	54
3.6.3	Expression von eines Sequenz optimierten DewA in <i>E. coli</i>	55
3.6.4	Expression von funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	58
3.6.4.1	Lokalisation der Bindemotive LG3 und RGD in Bezug auf das Fusionsprotein	59
3.6.4.2	Überprüfung des Expressionsbeginns via <i>Dot Blot</i> -Analyse.....	60
3.6.4.3	Expression und Aufreinigung der RGD-Hydrophobin-Fusionsproteine ..	61
3.6.4.4	Expression und Aufreinigung der LG3-Hydrophobin-Fusionsproteine....	63
3.6.5	Adhäsion und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen auf Hydrophobin beschichteten Oberflächen.....	64
4	Diskussion	66
4.1	Die vier Hydrophobine in <i>A. nidulans</i>	66
4.1.1	RodA ist verantwortlich für die <i>rodlet</i> -Bildung - welche Rolle spielt dabei eine mutmaßliche Glykosylierung?	66
4.1.2	Die Deletion der Hydrophobine hat Auswirkungen auf die Hydrophobizität des Myzels.....	71
4.1.3	Rekomplementation des <i>rodlet</i> -Phänotyps in der <i>rodA</i> -Deletionsmutante	73
4.1.4	Regulation der Hydrophobin-Expression durch <i>brlA</i> und <i>abaA</i>	74
4.1.5	Vergleich zwischen Expression und Lokalisation der Hydrophobine.....	78
4.1.6	Interaktion der Hydrophobine!?	79
4.2	Expression der Hydrophobine in <i>E. coli</i>	80
4.2.1	Expression von funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> und deren Anwendung für die Zelladhäsion von mesenchymalen Stammzellen	82
4.3	Neue Fragen für die Hydrophobin-Forschung und Ausblick.....	85
5	Material und Methode.....	88
5.1	Geräte.....	89
5.2	Verwendete Organismen	90
5.3	Kultivierung der Organismen	92
5.3.1	Kultivierung der von <i>A. nidulans</i>	92
5.3.2	Kreuzungen und Genotypbestimmungen	93
5.3.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	93

5.4	Molekularbiologische Methoden	94
5.4.1	Klonierung von PCR-Fragmenten und <i>E. coli</i> -Transformation.....	94
5.4.2	Klonierung über GATEWAY-LR-Rekombinationsreaktion	97
5.4.3	Plasmid-DNA-Präparationen aus <i>E. coli</i>	97
5.4.4	Hergestellte und verwendete Plasmide	98
5.4.5	Herstellung von Protoplasten und Transformation	100
5.4.6	Präparation von genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i>	101
5.4.7	<i>Southern Blot</i>	102
5.4.8	RNA-Isolierung aus <i>A. nidulans</i>	104
5.4.9	<i>Northern Blot</i>	105
5.4.10	cDNA-Synthese	107
5.4.11	Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementations Ansatz (BiFC).....	108
5.4.12	Insertion eines Peptides via Primerligation	108
5.4.13	Insertion eines Peptides via Vektormutation (<i>Site-directed mutagenesis</i>)....	108
5.5	Biochemische Methoden	109
5.5.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	109
5.5.2	<i>Western Blot</i>	110
5.5.3	<i>Dot Blot</i>	112
5.5.4	Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss.....	112
5.5.5	Schnelltest auf Proteinexpression in <i>E. coli</i>	113
5.5.6	Heterologe Expression und Aufreinigung von DewA-Fusionsproteinen mittels Ni-Affinitätschromatographie	113
5.5.7	Heterologe Expression und Aufreinigung von DewA-Fusionsproteinen mittels Separation der Einschlusskörperchen (<i>Inclusion bodies</i> = IB)	115
5.5.8	Beschichtung von Oberflächen.....	115
5.6	Mikroskopie	116
5.6.1	Konfokales <i>Laser-Scanning</i> Mikroskop	116
6	Literatur	117
7	Anhang	134
7.1	<i>Curriculum vitae</i>	134
7.2	Danksagung	136

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
alcA	Alkohol Dehydrogenase
ARE	TEA/ATTS-Domäne von <i>abaA</i> (engl. <i>abacus response element</i>)
As	Aminosäuren
BFM	Biofeuchtmasse
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (engl. <i>bimolecular fluorescence complementation</i>)
BRE	DNA-bindungsmotiv von <i>brlA</i> (engl. <i>bristle response element</i>)
DIC	Differentieller Interferenzkontrast (engl. <i>differential interference contrast</i>)
DIG	Digoxigenin
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. <i>extra cellular matrix</i>)
fl	komplett, ungekürzt (engl. <i>full length</i>)
FT	Durchfluss (engl. <i>flow through</i>)
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IB	Einschlusskörperchen (engl. <i>inclusion bodies</i>)
LG3	globuläre Domäne 3 aus der α 3 Seitenkette des humanen Laminin-5
MSC	mesenchymale Stammzellen, (engl. <i>mesenchymal stem cells</i>)
mRFP	monomeres rotfluoreszierendes Protein
nP	natürlicher Promotor
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
Paba	P-Aminobenzoessäure
PSI	Pfund pro Quadratzoll (engl. <i>pound-force per square inch</i>)
RGD	Bindungsmotiv von Fibronectin, abgekürzt für den 3 Aminosäure-Code Arg-Gly-Asp
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
sh	verkürzt (engl. <i>short</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

1 Zusammenfassung

Hydrophobine wurden 1991 von J. Wessels und Kollegen entdeckt. Sie haben ein charakteristisches Muster von acht Cysteinresten, die vier intramolekulare Disulfidbrücken bilden und werden in zwei Klassen unterteilt. Klasse I Hydrophobine bilden unlösliche Polymere auf künstlichen Oberflächen und deutlich ausgeprägte *rodlets* auf den Konidiosporen. Schon damals wurde erkannt, dass sie ein großes Potenzial besitzen. Um die Hydrophobine für industrielle Anwendungen nutzen zu können, gelang es der Firma *BASF* vor einiger Zeit, ein Hydrophobin in großen Mengen in *Escherichia coli* zu exprimieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Hydrophobine aus *Aspergillus nidulans* charakterisiert und für eine Anwendung zur Oberflächenbeschichtung und -funktionalisierung in *E. coli* exprimiert. Neben den beschriebenen Hydrophobinen, *rodA* und *dewA*, wurden zwei bisher unbekannte Hydrophobine im Genom von *A. nidulans* gefunden, welche *dewB* und *dewC* genannt wurden. Um die vier Hydrophobine zu untersuchen, wurden zuerst Einzeldelensionsmutanten von den neuen Hydrophobinen erzeugt und diese zusammen mit Deletionsmutanten von *rodA* und *dewA* unter dem AFM (*atomic force microscope*) betrachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass RodA als „Haupt-Hydrophobin“ für die Bildung der *rodlets* auf der Sporenoberfläche verantwortlich ist und die anderen Hydrophobine nur eine untergeordnete Rolle zur Erhaltung der Hydrophobizität der asexuellen Koniden spielen. Bei der Analyse der Expression der vier Hydrophobine via *Northern Blot* wurde gezeigt, dass sie 12 bis 24 Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung detektierbar sind, was mit der Entwicklung der Phialiden und Konidiosporen korreliert. Auf diesen Strukturen konnten alle vier Hydrophobine mittels GFP- und teilweise mittels RFP-Fluoreszenz lokalisiert werden. Für die Hydrophobine RodA und DewB wurde ein mutmaßlicher GPI-Anker in der Proteinsequenz gefunden. Nachdem RodA um diesen Bereich verkürzt wurde, zeigte sich, dass die Lokalisierung, die über RFP detektiert wurde, nicht beeinflusst wird. Durch Transformation des ungekürzten bzw. gekürzten RodA in die *rodA*-Deletionsmutante konnte via AFM-Analyse nachgewiesen werden, dass wieder *rodlets* auf der Sporenoberfläche auftreten. In der verkürzten Version sind diese aber nicht normal ausgebildet.

DewA kann von der Firma *BASF* in *E. coli* exprimiert werden. In dieser Arbeit gelang es auch, DewC und eine sequenzoptimierte Version von DewA in *E. coli* zu exprimieren, um die Hydrophobine weiter zu charakterisieren und sie für die Oberflächenbeschichtung nutzbar zu machen. Außerdem wurden zwei funktionelle Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteine hergestellt und in *E. coli* exprimiert, welche die Adhäsion von mesenchymalen Stammzellen auf künstlichen Oberflächen verbessern sollen, was auch mittels osteogener Differenzierung nachgewiesen werden konnte.

Summary

Hydrophobins were discovered in 1991 by J. Wessels and colleagues. They show a characteristic pattern of eight cysteine residues forming four intramolecular disulfide bridges and are divided in two classes. Class I hydrophobins form insoluble polymers on artificial surfaces and clearly distinct rodlets on conidiospores. It was recognized early that they have a great potential. To use the hydrophobins for industrial applications, the *BASF* Company succeeded in large scale production of a hydrophobin via *Escherichia coli* expression some time ago.

In this work, the hydrophobins of *Aspergillus nidulans* have been characterized and expressed in *E. coli* for an application to surface coating and functionalization. In addition to the previously described hydrophobins, *rodA* and *dewA*, two so far unknown hydrophobins were found in the genome of *A. nidulans* and were named *dewB* and *dewC*.

First single deletion mutants of the new hydrophobins were generated and analyzed under the atomic force microscope (AFM) together with deletion mutants of *rodA* and *dewA*. It was found that RodA is the "main hydrophobin" responsible for the formation of *rodlets* on the spore surface while the other hydrophobins play only a minor role in maintaining the hydrophobicity of the asexual conidia. By analyzing the expression of the four hydrophobins via *northern blot*, it was shown that they were detectable 12 to 24 hours after the induction of asexual development which correlates with the development of phialides and conidiospores. All four hydrophobins could also be localized by using GFP and partial RFP fluorescence. In the protein sequence of the hydrophobins RodA and DewB, a putative GPI anchor was found. After shortening RodA by cutting off the part with the putative GPI anchor and by transformation of the *rodA* deletion mutant with the complete and the shortened RodA, it was found that the localization that was detectable by RFP fluorescence was not affected. After AFM analysis of these strains, it was shown that *rodlets* recur on the spore surface. However these are not formed normally if the shortened version is used.

The *BASF* is able to produce DewA in *E. coli*. In this work, it was also managed to express DewC and sequence-optimized version of DewA in *E. coli*, to further characterize the hydrophobins and make them usable for surface coating. In addition, two functional peptide hydrophobin fusion proteins were expressed in *E. coli*. These are intended to improve the adhesion of mesenchymal stem cells on artificial surfaces, which could also be proven by osteogenic differentiation.

2 Einleitung

„Pilze mit Hüten besitzen einen integrierten Regenmantel“ so schrieb die Frankfurter Allgemeine Zeitung am 10. Oktober 2007 und meinte damit „ein Protein das Wassertropfen einfach abperlen lässt“ (FAZ, 2007). Dieses Protein heißt Hydrophobin und ist im Reich der Pilze weit verbreitet.

Hydrophobine wurden im Jahre 1991 von Wessels *et al.* entdeckt (Wessels *et al.* 1991) und schon damals wurde erkannt, dass sie ein großes Potenzial besitzen. Daher wurde wenig später die Firma *BiOMaDe* (Gröningen, Niederlande) gegründet, die schon früh nach industriellen Einsatzmöglichkeiten suchte. Im Jahre 2004 begann man in der Firma *BASF* in Ludwigshafen dieses Protein zuerst mühselig aus Champignons (*Agaricus bisporus*) zu isolieren. Mittlerweile kann man Hydrophobine in adäquaten Mengen für die industrielle Anwendung herstellen (Wohlleben *et al.* 2010) und daher wäre nun auch schon der Einsatz in der Bauindustrie bis hin zu Reinigungsmitteln möglich. Dies ist nur einer der vielen Gründe, warum es wichtig ist, die Hydrophobine weiter zu untersuchen und mehr über sie zu erfahren. Die Hydrophobine, die in dieser Arbeit untersucht wurden, stammen aus dem Schimmelpilz *Aspergillus nidulans*.

2.1 Wachstum und Entwicklung von *Aspergillus nidulans*

Der Schimmelpilz *A. nidulans* gehört zur Gattung *Aspergillus* (umgangssprachlich: Gießkannenschimmel), welche systematisch den *Ascomyceten* zugeordnet wird. Er wurde in den 50er Jahren von G. Pontecorvo als Modellorganismus etabliert (Pontecorvo *et al.* 1953), lässt sich auf künstlichen Nährmedien im Labor leicht kultivieren und wächst verhältnismäßig schnell. Der Begriff „Schimmelpilz“ fasst Pilzarten zusammen, die ubiquitär vorkommen. Sie sind durch Bildung asexueller Sporen gekennzeichnet und wachsen saprophytisch, d. h. sie können abgestorbene organische Substanzen als Nahrungsquellen verwerten (Kück *et al.* 2009). Seit 2005 ist sein Genom sequenziert. *A. nidulans* weist ein haploides Genom auf, das sich auf nur acht Chromosomen verteilt und insgesamt 30 Mb umfasst mit etwa 9.500 prognostizierten Protein-kodierenden Genen (Brody & Carbon, 1989; Galagan *et al.* 2005). Er besitzt sowohl einen sexuellen als auch einen asexuellen Lebenszyklus (Abb. 2.1).

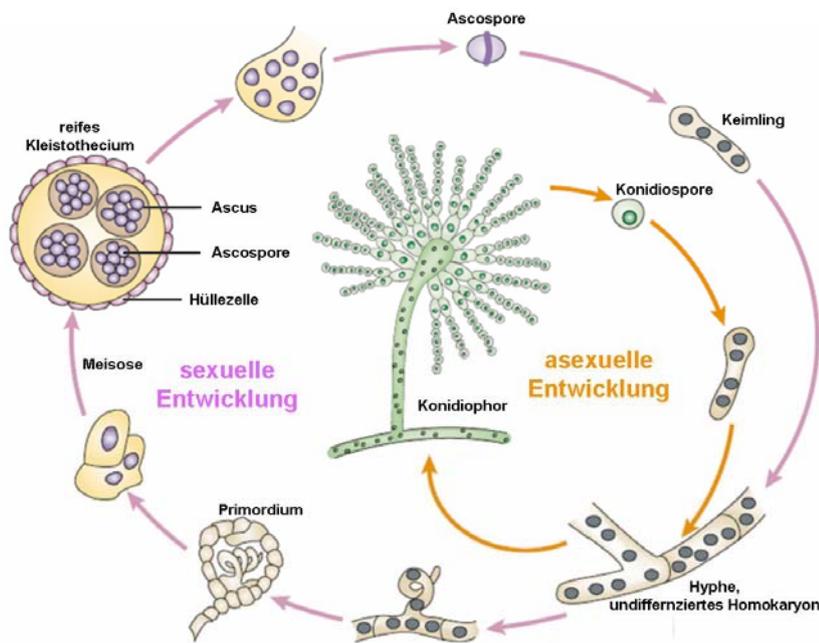


Abb. 2.1: Lebenszyklus von *A. nidulans*

Das Myzel (Homokaryon) besteht aus einem Netz verzweigter Hyphen, die mehrere Kerne enthalten und entwickelt sich aus einer einzigen haploiden Spore. In der asexuellen Entwicklung (orange) differenziert sich dieses Myzel in viele identische asexuelle Konidiosporen. *A. nidulans* kann sich auch sexuell fortpflanzen (lila). Im Fruchtkörper (Kleistothecium) werden mehrere tausend, rötliche Ascosporen gebildet. Vorher findet in einem Ascus die Fusion zweier haploider Kerne statt. Der diploide Nukleus durchlebt eine Meiose, gefolgt von einer Mitose, aus der acht haploide Ascosporen hervorgehen. Diese können jahrelang im Boden überdauern (verändert nach Casselton & Zolan, 2002).

Wie schon erwähnt, wächst das Myzel von *A. nidulans* im Boden, verbreitet sich dort und ernährt sich von organischem Material. Gelangt das Myzel an die Bodenoberfläche, beginnt die Entwicklung von asexuellen Sporen an speziellen morphologischen Strukturen, den Konidiophoren (Abb. 2.2). Unter Laborbedingungen (konstante Temperatur von 37° C) ist diese Entwicklung nach etwa 20 Stunden abgeschlossen.

Zunächst wächst eine spezialisierte Lufthyphe, die als Stielchen bezeichnet wird, senkrecht zum Substrat in die Höhe. Dies wird über Graviperzeption gesteuert. Das Stielchen schwillt terminal an und bildet den Vesikel. Durch hefeähnliches Knospungswachstum entsteht auf der Vesikeloberfläche eine Lage von Zellen, die Metulae (primäre Sterigmata). Ausgehend von den Metulae entstehen, wiederum durch Knospung, die Phialiden (sekundäre Sterigmata). Diese produzieren lange Ketten einzelliger Sporen, die Konidien genannt werden, wobei die älteste Spore jeweils an der Spitze einer Kette zu finden ist (Abb. 2.2; Krüger *et al.* 1997).

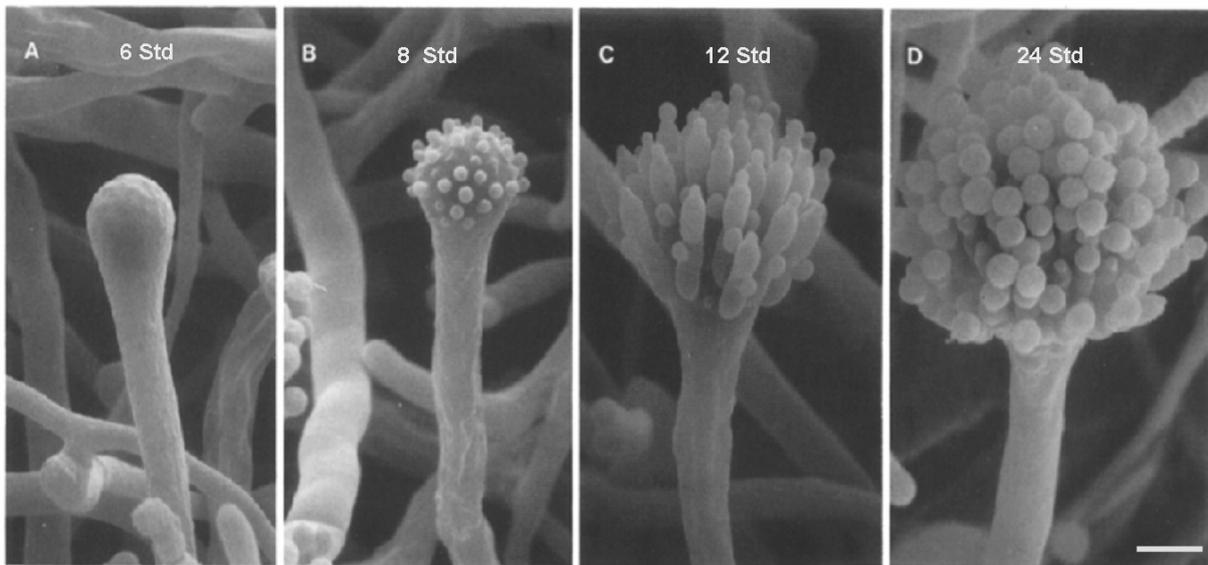


Abb. 2.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Konidiophorentwicklung

(A) Sechs Stunden nach Beginn der asexuellen Entwicklung sind Stielchen und Vesikel des Konidiophors entwickelt. (B) Zwei Stunden später sind die Metulae auf der Vesikeloberfläche vorhanden. (C) Nach 12 Stunden haben sich die Phialiden gebildet. (D) Eine reifer Konidiophore, sichtbar nach 24 Stunden, trägt mehrere tausend Konidien (verändert nach Fischer & Timberlake, 1995). Größenmaßstab entspricht 10 µm.

Die sexuelle Entwicklung von *A. nidulans* erfolgt durch Kreuzung verschiedener Stämme (Hyphenfusion) oder durch Selbstbefruchtung eines Stammes. Es werden spezielle morphologische Strukturen, die Kleistothecien, gebildet, in denen die Zellkerne verschmelzen. Im Anschluss entstehen meiotische Ascosporen. Eingeleitet wird die sexuelle Entwicklung bei Nahrungsknappheit, da die widerstandsfähigen Ascosporen jahrzehntelang im Boden überdauern können (Abb. 2.1, lila; Krüger *et al.* 1997; Munk *et al.* 2008).

A. nidulans bildet Hyphen, die nur an der äußersten Spitze wachsen. Diese Hyphenfäden sind meist durch Querwände, die so genannten Septen, unterteilt. Wie in allen *Ascomyceten* sind diese Septen nicht völlig geschlossen, sondern lassen einen zentralen Porus frei. Dieser stellt nicht nur eine Zytoplasmabrücke dar, in vielen Pilzen können sogar Organellen, wie Zellkerne, durch die Septen wandern. Sie sind also nicht mit echten Zellwänden vergleichbar. Daher werden Bereiche einer Hyphe, die durch Septen begrenzt werden, als Hyphenkompartimente bezeichnet. Damit bei Verletzung (aufgrund des hohen osmotischen intrazellulären Drucks) das Zytoplasma aus der Hyphe nicht ausläuft, verschließt ein, von einer Membran umgebener Proteinkristall, der als Woroninkörper bezeichnet wird, den Porus (Munk *et al.* 2008; Zekert *et al.* 2010).

2.2 Die Zellwandbestandteile der filamentösen Pilze

Viele Pilze besitzen eine feste Zellwand, ähnlich der von Pflanzen. Allerdings ist, neben verschiedenen Glucan-, Mannanpolymere und Proteinen, Chitin eine wesentliche Komponente. Die Zellwand filamentöser Pilze (*Ascomycten* und *Basidomycten*) besteht hauptsächlich aus (1,3)/(1,6) β -Glucan-Chitin-Komplexen, (1,3) α -Glucan und (Glyko-) Proteinen (van Wetter *et al.* 2000b).

Die Konidien des Wildtypes von *A. nidulans* sind durch Melanin grün pigmentiert. Dies verleiht ihm das typische, grüne Aussehen und schützt die Sporen vor dem DNA-schädigenden UV-Licht. (Munk *et al.* 2008).

Die pilzliche Zellwand macht einen erheblichen Prozentsatz (20%) der zellulären Biomasse aus und erhält die Form der Zellen. Sie wirkt dem Turgordruck entgegen und ist für den Schutz der Zellmembran vor mechanischer Schädigung verantwortlich. Auch an der Haftung auf biotischen und abiotischen Oberflächen und an der Biofilmbildung ist sie beteiligt (Yin *et al.* 2008). Die Zellwände von *Ascomyceten* sind oft doppelschichtig, mit einer inneren Schicht, die aus formerhaltenden Polysacchariden besteht und einer äußeren fibrillären Schicht aus Mannanpolymeren (De Groot *et al.* 2009). Analysen der Hyphenwände von *A. nidulans* zeigen, dass Glukose und (N-Acetyl)Glukosamin die wichtigsten Zuckerbestandteile sind. Galaktose und Mannose sind NebenkompONENTEN. In vielen Zellwänden, wie z. B. in den Sporen, ist Melanin eingelagert (Claverie-Martin *et al.* 1986). Die Enzyme, die an der Synthese der drei wichtigsten Zellwandbestandteilen (Polysaccharide, 1,3- α -Glucan/1,3- β -Glucan und Chitin) beteiligt sind, findet man in der Plasmamembran (Latgé, 2007). Die Glykoproteine der pilzliche Zellwand durchlaufen verschiedene post-translationalen Änderungen (De Groot *et al.* 2005). An der Zelloberfläche werden sie in die Zellwand eingebaut. Wie diese Integration in die Zellwand geschieht ist noch weitgehend unbekannt (De Groot *et al.* 2009).

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellwand des *A. nidulans* Wildtyp-Stammes (verändert nach Claverie-Martin *et al.* 1986)

Zellwandkomponenten	% des Trockengewichts
Hydrophobine und andere Proteine	41,7
Melanin	40,2
Kohlenhydrate	17,5
Summe	99,4

Mehrere Gruppen von Zellwandproteinen können unterschieden werden. Die erste Gruppe sind die Glykosylphosphatidylinositol- (GPI)-Zellwandproteine, welche auch in der Plasma-

membran zu finden sind. Ein Teil dieser Proteine löst sich von der Plasmamembran und wird in die Zellwand eingebaut. Diese GPI-Zellwandproteine werden durch eine verkürzte Form ihres ursprünglichen GPI-Ankers mit dem β -Glucan vernetzt (De Groot *et al.* 2005). Zur zweiten Gruppe zählen die Zellwandproteine mit internen *repeats*. Diese sind durch eine Esterbindung zwischen einem desaminierten Glutaminrest in ihren *repeats* und einer Hydroxylgruppe des 1,3- β -Glucan mit der Zellwand verbunden (De Groot *et al.* 2005). Die Disulfid-gebunden Zellwandproteinen, sind Proteine, die keine internen *repeats* zeigen und sich mit Hilfe milder Basen extrahieren lassen. Sie bilden die dritte Gruppe der Zellwandproteine. Die Hydrophobine, die vierte und letzte Gruppe von Zellwandproteinen (De Groot *et al.* 2009) haben besondere Eigenschaften und Aufgaben, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

2.3 Hydrophobine – ganz besondere Proteine aus Pilzen

Hydrophobine zeichnen sich durch ihr charakteristisches Muster an Cystein-Resten (gelbe Balken, Abb.2.3), die vier intramolekulare Disulfidbrücken bilden, und ihre geringe molekulare Masse aus. Ihren Namen „Hydrophobine“ bekamen sie von Wessels und Kollegen, die Gene untersuchten, welche während der Fruchtkörperbildung im Pilz *Schizophyllum commune* (Gemeiner Spaltblätling) exprimiert werden (Dons *et al.* 1984; Wessels *et al.* 1991).

Klasse 1 Hydrophobine

```

SC4  CNSG-PVQ--CCNETTT--VANAQ-KQGLLGG----LLGVVV----GPITGLVGLNCSP----ISVVGV----LTGNSCTA-QTVCCDHVTQNG-----LVN--VGC
SC3  CTTG-SLS--CCNQVQS--ASSSPVTALLG----LLGIV----LDLNVLVGISCSP----LTVIG----VGGSGCSA-QTVCCENTQFNG-----LIN--IGC
ABH1 CDVG-EIH--CCDTQQT-----PDHTSAAASG----LLGVP----INLGAFLGFDCTP----ISVLG----VGGNNCAA-QPVCCGTGNQFTA-----LINA-LDC
EAS  CSID-DYKPYCCQMSG-----PAGSPGL-----LNLIP----VDLSASLG--C-----VVG----VIGSQCGA-SVKCCKDDVTNTGNSFLIINA-ANC
MPG1 CGAEKVVS--CCNSKELK--NSKSGAE-----IPIDV-----LSGECKNIPINILTINQLI--PINNFCSD-TVSCCSGEQIG-----LVN--IQC
RODA CGDQAQLS--CCNKATYAG-DVTDIDEGILAGTLKNLIGGGS----GTEGLGLFNQCSKLDLQIPVIGIPIQALVNQRCKQ-NIACQNSPSDASG--SLIGLGLPC
  
```

Abb.2.3: Aminosäurevergleich von Klasse I Hydrophobinen aus verschiedenen Pilzen

Aufgrund der starken Sequenzunterschiede werden nur Aminosäuren zwischen dem ersten und dem letzten Cystein-Rest gezeigt. Die Cystein-Reste sind in gelb hervorgehoben. Die Klammern unterhalb der Cystein-Reste kennzeichnen die konservierten Disulfidbrücken. Die relativ geringe Sequenzähnlichkeit ist offensichtlich. Die verwendeten Abkürzungen bezeichnen Klasse I Hydrophobine aus folgenden Pilzen: SC3 und SC4 aus *Schizophyllum commune*; ABH1 aus *Agaricus bisporus* (Zuchtchampignon); EAS aus *Neurospora crassa*; MPG1 aus *Magnaporthe grisea* (Reisbrandpilz) und RodA aus *Aspergillus nidulans* (verändert nach Sunde *et al.* 2007).

Hydrophobine (wie z. B. SC3 aus *S. commune*) haben die Eigenschaft an einer Gas-Wasser-Grenzschicht in SDS- (Natriumdodecylsulfat, engl. *sodium dodecyl sulfate*) unlösliche,

amphipathische Filme zu assemblieren. Sie sind Amphiphile, d.h. sie haben einen ausgeprägt hydrophilen und einen hydrophoben Teil. Diese Amphiphilie ist die treibende Kraft für die Selbstassemblierung der Hydrophobine (Linder *et al.* 2005). Die Oberfläche des amphipathischen Filmes ist in Richtung des Gases (meist Luft) hydrophob und auf der Wasser zugewandten Seite hydrophil (Wösten *et al.* 1993; Wösten, 2001). Mittels Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass diese Filme aus geordneten Mikrofibrillen bestehen. Diese geordneten Formen ähneln den Strukturen, die man auf der Sporenoberfläche vieler Schimmelpilze findet und die als *rodlets* bezeichnet werden (Kapitel 2.3.1; Sassen *et al.* 1967; Dempsey & Beaver, 1979; Stringer *et al.* 1991).

Hydrophobine werden in zwei Klassen unterteilt (Wessels, 1994):

- Klasse I Hydrophobine bestehen aus etwa 100 - 150 Aminosäuren (Wessels, 1997) und können glykosiliert werden (Wösten & de Vocht, 2000; Hektor & Scholtmeijer, 2005).
- Klasse II Hydrophobine sind kürzer und bestehen aus ca. 50 - 100 Aminosäuren (Wösten, 2001).

Außerdem bilden Klasse I Hydrophobine höchst unlösliche Polymere (Filme), welche deutlich ausgeprägte *rodlets* auf den Sporen und zum Teil auch auf künstlichen Oberflächen erzeugen. Um die Schichten von Klasse I Hydrophobinen aufzulösen, benötigt man starke organische Säuren, wie Trifluoressigsäure oder konzentrierte Ameisensäure (Wessels *et al.* 1991; Linder *et al.* 2005). Klasse II Hydrophobine bilden Protein-Polymere, die sich in manchen organischen Lösungsmitteln lösen und meist keine *rodlets* zeigen (Wösten & de Vocht, 2000; Paananen *et al.* 2003). Zusätzlich zeigen Klasse II Hydrophobine eine größere Konservierung im Abstand der Aminosäuren zwischen den Cystein-Resten als Klasse I Hydrophobine. Klasse II Hydrophobine wurden bisher nur in *Ascomyceten* gefunden, Klasse I Hydrophobine werden auch von *Basidiomyceten* gebildet (Linder *et al.* 2005). Daher wird angenommen, dass sich die beiden Klassen der Hydrophobine unabhängig voneinander entwickelt haben (Whiteford & Spanu, 2002).

Die Hydrophobine sind einzigartig im Reich der Pilze. Man findet funktionelle Homologe in der Bakteriengruppe der *Streptomyceten*, zu denen z. B. *Streptomyces griseus* gehört, die *Chapline* (Claessen *et al.* 2003) und in der dimorphen Hefe *Ustilago maydis* (Maisbrand), die so genannten *Repellents* (Teertstra *et al.* 2006).

Bis heute wurden in anderen Hefen keine Hydrophobin-Gene gefunden (Gebink *et al.* 2005). Hefen wachsen als knospende Einzelzellen in wässrigem Milieu und benötigen dafür keine Hydrophobine. Bei Pilzen der beiden anderen Hauptgruppen (*Ascomyceten* und *Basidiomyceten*), die auf oder in organischem Substrat wachsen, ist die Zellwandoberfläche

von Lufthyphen und durch Luft übertragene Sporen durch die Hydrophobinschicht hydrophob. Im Gegensatz dazu ist die Hyphenwand des im feuchten Milieu wachsenden Myzels hydrophil, da hier keine Hydrophobine zu finden sind. Diese grundlegende Veränderung der Oberflächeneigenschaften der Zellwand wird also durch die Sekretion der Hydrophobine erreicht (Wessels, 1996; Wösten, 2001)

In den meisten Fällen ist mehr als ein Hydrophobin in einer Art vorhanden. Die Hydrophobine existieren in kleinen Genfamilien von zwei bis acht Mitgliedern pro Spezies. Zum Beispiel wurden acht mutmaßliche Hydrophobine im Genom von *Phanerochaete chrysosporium* (Weißfäulepilz) gefunden (Casselton & Zolan, 2002). Der Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* (verantwortlich für die Samt- und Braunfleckenkrankheit) besitzt mindestens sechs Hydrophobine. HCf-1, HCf-2, HCf-3 und HCf-4 sind typische Klasse I Hydrophobine und HCf-5 und HCf-6 gehören zu den Klasse II Hydrophobinen (Lacroix & Spanu, 2009). Für die Anwesenheit von mehreren Hydrophobingenen in einem Organismus gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder sie werden während unterschiedlicher Entwicklungsstadien bzw. als Reaktion auf veränderte Umgebungsbedingungen exprimiert oder sie sind weitgehend in der Lage sich gegenseitig zu komplementieren (Linder *et al.* 2005). Die Mitglieder der Hydrophobin-Familie werden unterschiedlich exprimiert. Bei SC3 aus *S. commune* konnte bei Wachstum in Flüssigkultur gezeigt werden, dass es ins Wachstumsmedium sekretiert wird (Abb. 2.4; Wösten *et al.* 1994). Dagegen sind SC4 aus *S. commune* und ABH1 aus *A. bisporus* spezialisiert auf die Beschichtung der Luftkanäle des Pilzes (Lugones *et al.* 1999).

Bei pathogenen oder symbiotisch lebenden Pilzen spielen die Hydrophobine eine wichtige Rolle bei der Interaktion. Beispielsweise führt der Verlust des MPG1 (*Magnaporthe grisea*) neben einem leicht benetzbaren Phänotyp zu einer reduzierten Pathogenität durch die Reduktion der Appressorium-Bildung (Talbot *et al.* 1996).

Die eindeutige zeitliche und räumliche Expression der verschiedenen Mitglieder der Hydrophobin-Genfamilien deutet die Möglichkeit der funktionellen Spezialisierung an. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Hydrophobine wichtig für verschiedene morphogenetische Prozesse sind. Einige Hydrophobine können, trotz ihrer Sequenzunterschiede, die Funktion anderer übernehmen (van Wetter *et al.* 2000a). Wurde in der *mpg1*-Deletionsmutante *sc1* aus *S. commune* unter seinem natürlichen Promotor exprimiert, konnte der Phänotyp der *mpg1*-Deletionsmutante teilweise rekompensiert werden. Wurden andere Hydrophobine, wie z. B. *sc1* und *sc4* aus *S. commune*, *rodA* und *dewA* aus *A. nidulans* oder *eas* aus *Neurospora crassa* unter dem *mpg1*-Promotor exprimiert, konnten zumindest eine der diversen Funktionen von MPG1, wie z. B. die

annähernd normale Appessorium-Bildung, die Bildung der *rodlet*-Schicht oder der leicht benetzbare Phänotyp rekompentieren werden (Kershaw *et al.* 1998).

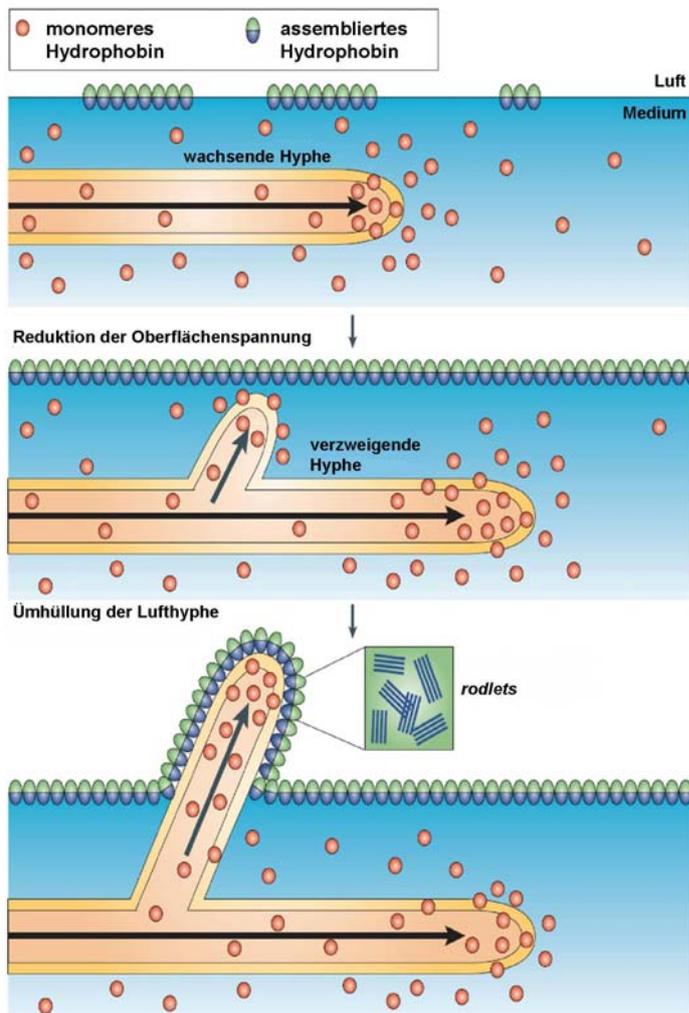


Abb. 2.4: Modell der Selbstassemblierung der Hydrophobine

Die Oberflächenspannung des Wassers wird, an der Medium-Luft-Grenze, durch die Selbstassemblierung der sekretierten Hydrophobine zu einer amphiphatischen Membran reduziert. Betrachtet man die Umhüllung der Lufthyphen mit den sekretierten Hydrophobinen, werden *rodlets* sichtbar (verändert nach Gebbink *et al.* 2005).

Das Luftwachstum wird durch die Hydrophobine, welche durch die Hyphen in das feuchte Substrat (Medium) sekretiert werden, vermittelt. Durch einen Prozess der Selbstassemblierung ordnen sich die Hydrophobine an der Grenzschicht an und reduzieren die Oberflächenspannung der Flüssigkeit. Sie ermöglicht dadurch den Hyphen in die Luft zu wachsen (Abb. 2.4; Wösten *et al.* 1999). Die Lufthyphen sekretieren weiterhin Hydrophobine, welche sich an der Oberfläche der Hyphen anhaften. Die hydrophile Seite ist der Zellwand zugewandt, während die hydrophobe Seite exponiert ist (Wösten *et al.* 1993). Dadurch werden die Lufthyphen wasserabweisend. So reduziert z. B. das Hydrophobin SC3 die Oberflächenspannung des Wachstumsmediums, erlaubt den Durchbruch an der Wasser-Luft-Grenze und die Produktion von Luftstrukturen (Abb. 2.4; Wösten *et al.* 1999).

Die Sporen, die sich an diesen Luftstrukturen entwickeln, sind ebenso mit einer amphipatischen Hydrophobinschicht überzogen. Diese Schicht macht ihre Oberfläche

hydrophob und wasserabweisend und ermöglicht eine effektive Verbreitung über die Luft. Obwohl die Hydrophobinschicht sehr stark hydrophob ist und den Wassereintritt verhindert, ist sie doch hoch permeabel für den Gasaustausch (Wang *et al.* 2004). Sie verhält sich ähnlich einer GORE-TEX™ Membran.

2.3.1 Hydrophobine bilden *rodlets*

An einer hydrophil-hydrophoben Grenzschicht bilden Klasse I Hydrophobine eine amphipathische Membran aus einem Mosaik von Amyloid-Fibrillen, bekannt als *rodlets*. Diese Membran hat viele Funktionen. Sie ermöglicht es Pilzen einer wässrigen Umgebung zu entkommen (Abb. 2.4; Wösten *et al.* 1999) und verleiht der Pilzoberfläche, die der Luft ausgesetzt ist, ihrer Hydrophobizität (Wösten *et al.* 1994a). Außerdem vermittelt sie die Adhäsion der Pilze an hydrophobe, feste Substrate (Wösten *et al.* 1994b).

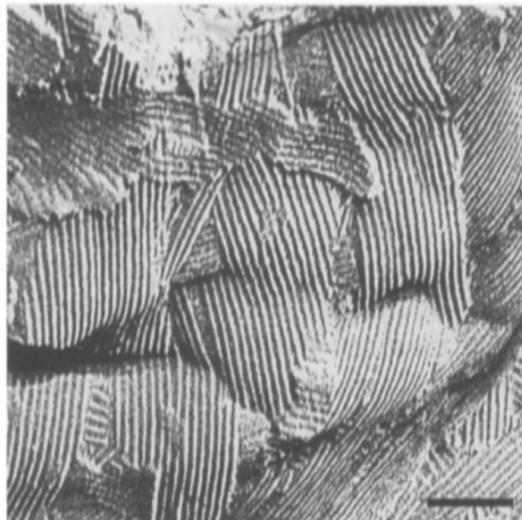


Abb. 2.5: Die hydrophobe *rodlet*-Schicht auf der Oberfläche von Konidien der Pilzes *A. nidulans*.

Die *rodlets* sind das Produkt des Gens *rodA*. Diese wurden mittels TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) nach der Gefriertrocknung der *A. nidulans*-Sporen aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm. (Wessels, 1996)

Die *rodlets* wurden zuerst auf der äußeren Oberfläche von gefriergetrockneten Sporen der Gattungen *Penicillium* (Sassen *et al.* 1967; Hess *et al.* 1968) und *Aspergillus* (Hess & Stocks, 1968) entdeckt. Aber erst 1978/79 konnte ihre Funktion entschlüsselt werden (Beever & Dempsey, 1978; Beever *et al.* 1979; Dempsey & Beever, 1979). Durch Entdeckung einer *eas*-Deletionsmutante in *N. crassa* wurde nachgewiesen, dass die *rodlet*-Schicht die Hydrophobizität der Sporen gewährleistet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auf der Sporenoberfläche der *eas*-Deletionsmutante das Mosaik-Muster, welches beim Wildtyp vorhanden ist, fehlte. Dies war der Beweis, dass die *rodlet*-Schicht auf den Sporen für deren hydrophoben Eigenschaften verantwortlich ist (Beever & Dempsey, 1978). Die

Hydrophobine bilden eine Monolage und sind nicht, wie anfangs von einigen Forschern vermutet, von einer anderen Schicht überzogen (Dempsey & Beever 1979). Die *rodlets* haben einen Durchmesser von ~ 10 nm und eine Länge zwischen 35 und 240 nm (Dempsey & Beever 1979; Wösten *et al.* 1993).

Rodlets, die aus Klasse I Hydrophobinen bestehen, können nicht durch organische Lösungsmittel, heiße Detergentien oder alkalische Behandlung aufgelöst werden (Beever *et al.* 1979). Dies ist nur mit konzentrierter Trifluoressigsäure oder Ameisensäure möglich. Aufgereinigtes Hydrophobin-Protein kann zum Teil wieder in *rodlets* repolymerisiert werden (De Vries *et al.* 1993; Wösten *et al.* 1993). *In vitro* findet man *rodlets* in der Regel, wenn man einen Tropfen verdünnter Protein-Lösung auf einer festen Oberfläche eintrocknen lässt. Dies ist aber nur bei einigen Hydrophobinen, wie z. B. bei SC3, der Fall (Lugones *et al.* 1996; De Vocht *et al.* 2000; Mackay *et al.* 2001).

2.3.2 Strukturelle Analysen der Hydrophobine

Es wurde vielfach auf die strukturellen und morphologischen Ähnlichkeiten zwischen den *rodlets* der Klasse I Hydrophobine und Amyloid-Fibrillen hingewiesen (Wösten & de Vocht, 2000) Zusätzlich können SC3- und EAS-*rodlets* Amyloid-spezifische Farbstoffe, wie z. B. Kongo Rot, binden (Mackay *et al.* 2001; Wang *et al.* 2005). Die SC3-Monolage auf einer künstlichen Oberfläche wurde mittels Rasterkraftmikroskopie gemessen. Sie ist ~ 7 - 8 nm dick und hat einen Durchmesser von ~ 9 - 15 nm (Wösten *et al.* 1994; De Vocht *et al.* 1998).

SC3 scheint zunächst eine hauptsächlich α -helikale Struktur an der Luft-Wasser-Grenzfläche zu haben, welche sich in die stabile β -Struktur-reichen *rodlets* umwandelt. Die α -helikale Struktur kann auch durch erhitzte Detergens (100° C 2% SDS) in die stabile β -Struktur überführt werden (Wösten & de Vocht, 2000). Die Anwesenheit von intakten nativen Disulfidbrücken scheint nicht essentiell für die Bildung von *rodlets* zu sein (De Vocht *et al.* 2000). Die Sekundärstruktur des Klasse I Hydrophobins SC3 wurde umfangreich untersucht, z. B. mittels ATR-Infrarotspektroskopie (abgeschwächte Totalreflexion-Infrarotspektroskopie = *attenuated total reflection-infrared spectroscopy*; De Vocht *et al.* 1998). Diese Methode liefert Aufnahmen der Sekundärstruktur eines Proteins in niedriger Auflösung. Das Spektrum von löslich SC3 (aufgenommen in Phosphatpuffer) ist charakteristisch für ein Protein mit β -Faltblatt-Strukturen mit einigen *random-coil* Regionen. Doch bei der Zugabe von 25% Trifluorethanol (TFE), einem Lösungsmittel welches die Bildung von Sekundärstrukturen fördert, verlagerte sich das Spektrum, so dass typische Merkmale einer α -Helix-Struktur

auftauchen. Diese α -Helix-Struktur wird als α -helikale Zwischenstufe in der SC3 Assemblierung bezeichnet (De Vocht *et al.* 1998, 2002). Weitere Analysen des löslichen SC3 zeigen, dass es zu 23% aus α -Helices, 41% β -Faltblatt, 16% β -Schleifen (*loops*) und 20% aus *random-coil* Regionen besteht (Wang *et al.* 2004; Sunde *et al.* 2007).

Bei Untersuchung anderer Hydrophobine im löslichen Zustand, darunter EAS, SC4 und ABH3, konnte gezeigt werden, dass sie alle in unterschiedlichem Umfang β -Faltblatt-Strukturen und *random-coil* Regionen enthalten. In allen Fällen ist eine deutliche Steigerung der β -Faltblatt-Strukturen bei der *rodlet*-Bildung, also der Assemblierung detektierbar (Wösten & de Vocht, 2000; Mackay *et al.* 2001). Untersuchungen mittels ATR-Infrarotspektroskopie von EAS zeigen, dass ein erheblicher Anteil der einzelnen Proteine im löslichen Zustand wenig oder keine Sekundärstruktur hat. Diese Regionen sind besonders interessant, da sie das Potential haben, ihre Konformation zu ändern und im polymerisierten Zustand eine entscheidende Rolle in der Assemblierung der Hydrophobine zu spielen (Sunde *et al.* 2008).

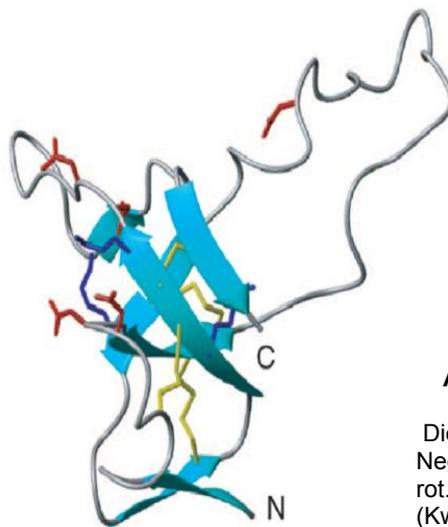


Abb. 2.6: Strukturvorhersage von EAS (*N. crassa*)

Die Cysteinbrücken sind in gelb dargestellt. Negativ geladene Aminosäurereste blau und rot. Die unstrukturierten Bereiche sind grau. (Kwan *et al.* 2006).

Wird lösliches SC3 mit Pepsin verdaut und einer Flüssig-Chromatographie (*liquid chromatography*), gefolgt von einer Massenspektrometrie-Messung (LC-MS), unterzogen, können zwei Peptide nachgewiesen werden. Eines dieser Peptide entspricht dem vorher genannten unstrukturierten *Loop*-Bereich zwischen dem dritten und vierten Cystein (die zweite Schleife, Abb. 2.6). Weitere Experimente ergaben, dass dieser zweite *Loop* stark an Teflon bindet. Diese Ergebnisse beweisen, dass der zweite *Loop* während der Polymerisation der Hydrophobine eine wichtige Rolle spielt (Sunde *et al.* 2008).

Das Klasse I Hydrophobin EAS aus *N. crassa* wurde mit *triple*-Resonanz NMR-Spektroskopie untersucht (Kwan *et al.* 2006). Die Kernstruktur von EAS besteht aus zwei ineinander greifenden β -*hairpin*-Strukturen, welche eine β -Fasstruktur (β -*barrel*)

bilden. (Abb. 2.6). EAS enthält außerdem einen sehr langen ungeordneten *Loop* (~ 24 As) im Bereich zwischen dem dritten und vierten Cystein (Abb. 2.6), wie SC3. Dies ist typisch für Klasse I Hydrophobine, fehlt aber bei den Klasse II Hydrophobinen (Hakanpää *et al.* 2006a; 2006b). Diese unstrukturierte Schleife ist der am wenigsten konservierte Bereich der Klasse I Hydrophobine. Durch die Deletion von sieben bzw. elf Aminosäuren in dieser Region entstanden EAS-Mutanten, die noch dazu in der Lage waren *rodlets* zu bilden (Kwan *et al.* 2006). Die meisten Klasse I Hydrophobine haben einen längeren ungeordneten β -*Loop* als Klasse II Hydrophobine, die mehr hydrophobe Aminosäurereste enthalten (Linder *et al.* 2005).

2.3.3 Biotechnologische Anwendungen der Hydrophobine

Die Forschung fokussiert sich aktuell auf die Nutzung der Hydrophobine und ihrer einzigartigen physikalischen Eigenschaften für biotechnologische und industrielle Anwendungen. Insbesondere Klasse I Hydrophobine waren aber bis vor einigen Jahren schwierig zu gewinnen und aufzureinigen, da man sie mit heißer SDS-Lösung und Trifluoressigsäure extrahieren musste. Die einzigen Hydrophobine, die schon früh in guter Ausbeute hergestellt wurden, sind die Klasse II Hydrophobine HFBI und HFBII aus *Trichoderma reesei* (Askolin *et al.* 2001; Bailey *et al.* 2002).

Eine Anwendung der Hydrophobine ist die Nutzung als Fusionspartner für die Aufreinigung von Proteinen in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen (ATPS = *aqueous two-phase system*; Lahtinen *et al.* 2008; Joensuu *et al.* 2010). Hydrophobine zeigen extremes Separationsverhalten in den wässrigen Zwei-Phasen-Systemen. Wenn zu einer Wasserlösung, die ein Hydrophobin enthält, ein Tensid (z. B. Agrimul®) gemischt wird, separiert sich das Hydrophobin in die nicht-ionische Tensid-Phase. Wässrige Zwei-Phasen-Systeme stellen eine hervorragende Technik zur selektiven Aufreinigung von Hydrophobinen dar. Hydrophobine können auch als Fusionspartner für selektive Reinigung rekombinanter Proteine verwendet werden (Linder *et al.* 2001; Joensuu *et al.* 2010).

Einige Hydrophobine werden zur Protein-Immobilisierung eingesetzt. Beispielsweise durch die Modifikation von hydrophoben Oberflächen, wie Teflon oder von hydrophilen Oberflächen, wie Polydimethylsiloxan (PDMS), um die Haftung von Proteinen, wie etwa Antikörpern, zu ermöglichen (Qin *et al.* 2007). Sie können auch zur Verringerung bzw. Verhinderung nicht-spezifischer Bindung von Proteinen auf Oberflächen beitragen (Hektor & Scholtmeijer, 2005). Das bakterielle Wachstum kann durch Erhöhung der Hydrophobizität

der Oberfläche oder mit Hilfe von Hydrophobin-Beschichtungen in Kombination mit antibakteriellen Substanzen verhindert werden (Hektor & Scholtmeijer, 2005).

Ein weiterer Anwendungsbereich ist es, die Hydrophobine an Elektroden anzuheften, um z. B. mit Enzymen die Effektivität von Biosensoren zu erhöhen (Corvis *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2009). Die Hydrophobine können sowohl hydrophobes Elektronenmaterial wie Glaskohlenstoff, als auch hydrophile Gold-Elektroden beschichten. Die funktionalisierten Hydrophobin-Schichten sind unter den verschiedensten Bedingungen stabil. Sie halten große Schwankungen des pH-Wertes aus und blockieren effektiv die Oxidation des Elektrodensubstrates und den Zugang von hydrophilen elektroaktiven Stoffen an der Elektrodenoberfläche (Bilewicz *et al.* 2001).

Ferner können Hydrophobine auch für die Stabilisierung von Emulsionen eingesetzt werden (Wohlleben *et al.* 2010). Folglich haben sie eine große Bandbreite an Applikationen, wie der Einsatz als Tensid und Emulgator in behandelten Nahrungs- und Reinigungsmitteln (Linder *et al.* 2005). Sie könnten beispielsweise ein guter Zusatz zu Haarpflegeprodukten werden, da sie mehrere Shampoowäschen überstehen. Diese Entdeckung ist bereits zum Patent angemeldet. Leider ist nicht bekannt, ob Hydrophobine derzeit in der Kosmetikindustrie eingesetzt werden (Hektor & Scholtmeijer, 2005). Alternativ könnten Hydrophobine verwendet werden, um Emulsionen in Cremes und Salben zu stabilisieren (Wösten *et al.* 1994).

Hydrophobine führen aufgrund ihrer Oberflächenaktivität zur Schaumbildung in Schüttelkulturen oder Fermentern. Daher ist die Zugabe von Antischaummittel in belüftete Bioreaktoren, in denen filamentöse Pilze wachsen, besonders wichtig, um das Schäumen zu vermeiden. Dies kann durch den Einsatz von Hydrophobin-Deletionsmutanten verringert oder gar vermieden werden, was eine nicht unerhebliche Kostenreduktion für die Industrie bedeuten würde (Bailey *et al.* 2002).

Es sind viele industrielle Anwendungen der Hydrophobine denkbar. Ein großer Bereich wäre die *Antifouling*-Applikation oder Anwendungen für schmutzabweisende Oberflächen. Hydrophobine sind weniger schädlich für die Umwelt als einige der aktuell eingesetzten Lösungen. Fensterscheiben und Autos leiden z. B. an der Verschmutzung und dem dadurch auftretenden Wachstum unerwünschter Organismen. Auch in der Schifffahrt stellt *fouling* ein erhebliches Problem dar und die bisher eingesetzten Mittel, wie *Antifouling*-Lacke, schädigen die Meeresumwelt (Hektor & Scholtmeijer, 2005).

2.3.4 Oberflächenbeschichtung mit funktionalisierten Hydrophobinen zur Verbesserung der Zelladhäsion

Neben technischen sind auch medizinische Einsatzgebiete denkbar. Die Verwendung von natürlichen oder veränderten Hydrophobinen hat gezeigt, dass eine Hydrophobin-Beschichtung das Wachstum und die Morphologie von Fibroblasten auf Teflon verbessern kann (Janssen *et al.* 2002; 2004).

Künstliche Materialien für Implantatoberflächen können als Ersatz oder Unterstützung einer Vielzahl von Körperteilen, einschließlich Knochen, Wirbelsäule und Herzgewebe eingesetzt werden. Die verwendeten Materialien führen häufig zu einer schlechten Aufnahme in das menschliche Gewebe. Aus diesem Grund ist es notwendig die Implantat-Unverträglichkeit zu verbessern. Durch die Modifizierung der physiologischen und physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften des Materials kann die Interaktion mit den Zellen verbessert werden. Beispielsweise Mausfibroblasten adhären besser auf mäßig hydrophilen Oberflächen als auf hydrophoben (Webb *et al.* 1998). Ebenso binden humane Endothelzellen besser auf mäßig benetzbaren Polymeren (van Wachem *et al.* 1985).

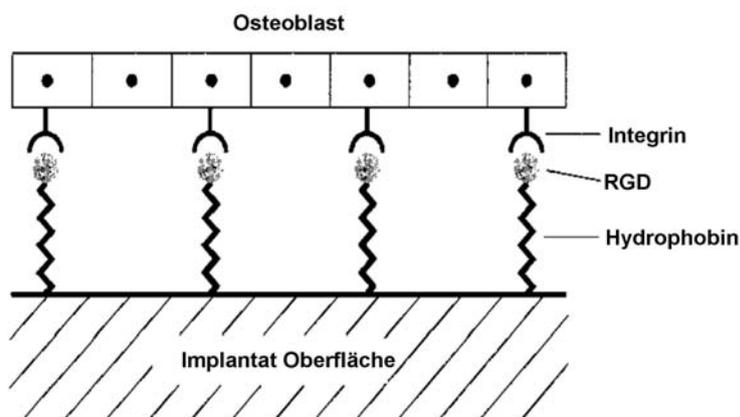


Abb. 2.7: Schema der Adhäsion von Osteoblasten auf einer Implantatoberflächen vermittelt durch Integrin. (verändert nach Kantlehner *et al.* 1999)

Ein Ansatz, die Kompatibilität zu verbessern, ist die Oberfläche des Implantatmaterials mit Biomolekülen zu beschichten, welche an der Rezeptor vermittelten, zellulären Adhäsion beteiligt sind, wie z. B. Fibronectin (Kapitel 2.5). Die RGD-Sequenz (abgekürzt für den Aminosäure-Code Arg-Gly-Asp) des Fibronectin bindet an Integrine, welche sich in der Plasmamembran von Zellen befinden (Abb. 2.7; Kantlehner *et al.* 1999; Schaffner *et al.* 1999; Kantlehner *et al.* 2000).

Die Immobilisierung dieses Tri-Peptides mittels des Hydrophobins SC3 auf einer Oberfläche fördert Zellanheftung (Olbrich *et al.* 1996; Cannizzaro *et al.* 1998; Kantlehner *et al.* 2000; Janssen *et al.* 2002). Janssen *et al.* konnten den Effekt der verbesserten Adhäsion von Fibroblasten auf Oberflächen, die mit dem Hydrophobin SC3 an das RGD-Peptid fusioniert,

schon 2002 nachweisen (Abb. 2.8). Nach 96 Stunden Wachstum von Fibroblasten war die Zellzahl auf SC3-beschichtetem Teflon niedriger als auf blankem Teflon. In beiden Fällen konnten abgerundete Zellen mit schlechter Adhäsion beobachtet werden. Wurde das Teflon mit dem modifizierten Hydrophobin (SC3 fusioniert an RGD) beschichtet, konnten die Zellen an der Oberfläche haften (Abb. 2.8; Janssen *et al.* 2002).

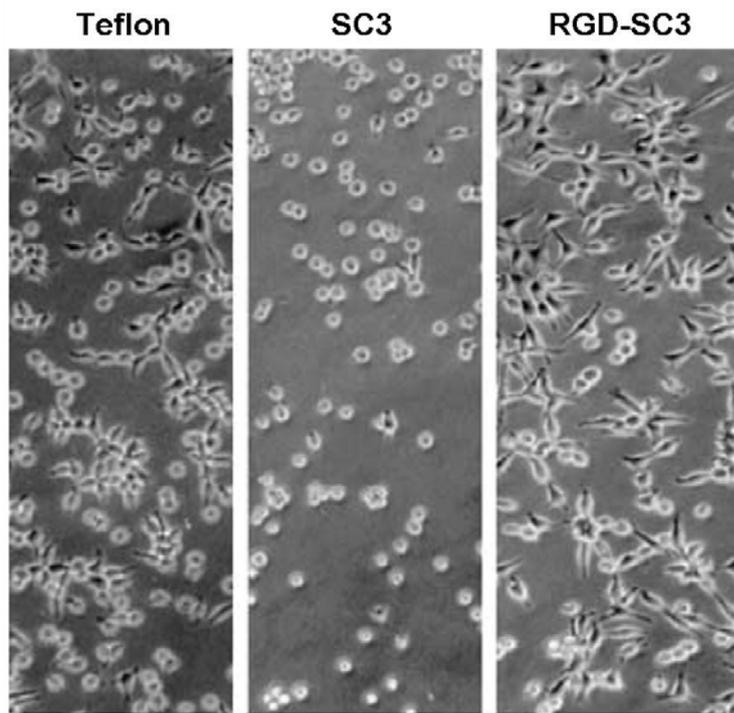


Abb. 2.8: Fibroblasten-Kulturen - 96 Stunden gewachsen auf Teflon, Teflon beschichtet mit SC3, Teflon beschichtet mit RGD fusioniert an SC3.

Auf unbeschichtetem Teflon adhären nur wenige Fibroblasten. Wird das Teflon mit SC3 beschichtet, finden die Fibroblasten keinen Halt auf der nun hydrophilen Oberfläche und runden sich ab. Fusioniert man an das SC3 das RGD-Peptid (Fibronectin-Bindungsmotiv), und beschichtet damit die Teflon-Oberfläche ist deutlich eine erhöhte Adhäsion erkennbar. Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (verändert nach Janssen *et al.* 2002)

2.4 Hydrophobine in *Aspergillus nidulans*

Im Jahre 1991 wurde von Stringer *et al.* die *Rodletless* Mutante beschrieben. Die Deletion der Gensequenz (damals benannt CAN41) hatte einen Verlust der externen Zellwandschicht der Konidiophore und der Konidiosporen zur Folge. Dadurch wurden diese Strukturen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm weniger hydrophob und dies führte zu einer ineffektiven Sporenverbreitung. Diese fehlende Zellwandschicht wurde als *rodlet*-Schicht bezeichnet und das verantwortliche Gen *rodA* benannt. Die damaligen Studien zeigten, dass *rodA* aus 586 Nukleotiden (inklusive 2 Introns) bzw. 157 Aminosäuren besteht (Tabelle 2.2). RodA ist moderat hydrophobes Protein mit 44% hydrophoben Aminosäureresten. Es weist ein potenzielle N-Glykosilierungsstelle auf (Stringer *et al.* 1991).

Vier Jahre später wurde in derselben Arbeitsgruppe ein weiteres Gen (CAN4) identifiziert, welches nach Deletion der Gensequenz eine schnelle Feuchtigkeitsaufnahme von sporulierenden Kolonien mit detergenschaltigen Lösungen zeigt. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde das Gen *dewA* (*detergent wettable phenotype*) benannt. Das *dewA*-Gen besteht aus 552 Nukleotiden (inklusive 2 Introns) bzw. 135 Aminosäuren (Tabelle 2.2). Auch DewA ist ein moderat hydrophobes Protein mit 52% hydrophoben Aminosäureresten (Stringer & Timberlake, 1995).

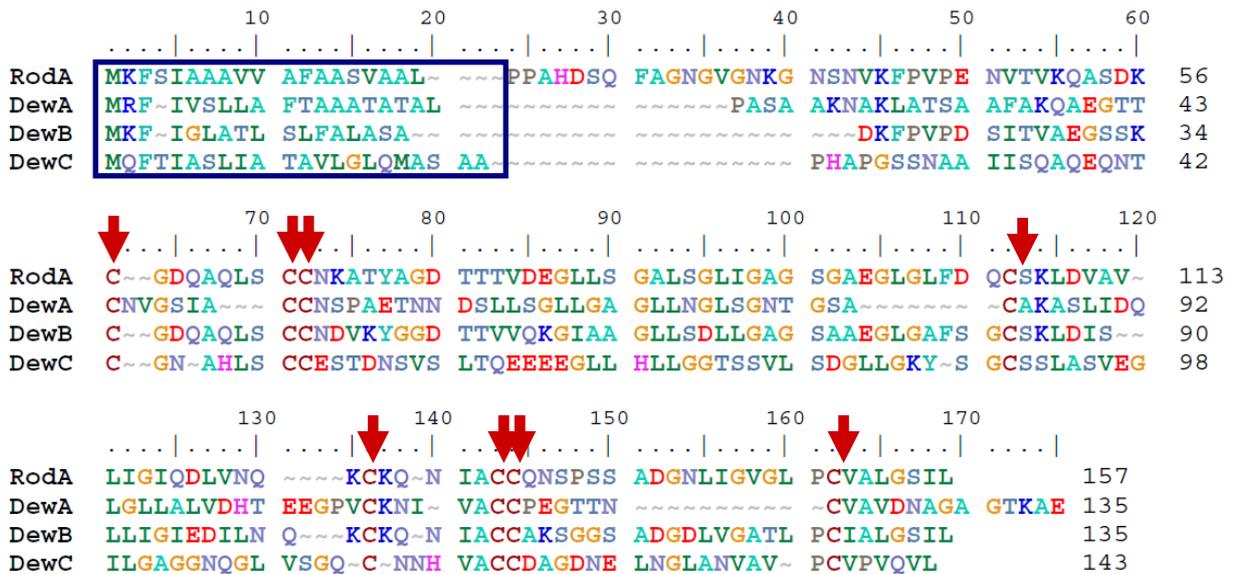


Abb. 2.9: Alignment der vier Hydrophobine in *A. nidulans*

Die Sequenzähnlichkeit der Hydrophobine untereinander ist gering. Alle zeigen ein Signalpeptid am N-Terminus (blauer Rahmen). Mit den roten Pfeilen sind die acht Cysteine markiert, die charakteristisch für alle Hydrophobine sind. Verglichen wurden die Sequenzähnlichkeiten der vier Hydrophobine untereinander.

In unserem Institut wurden zwei weitere Hydrophobine im Genom von *A. nidulans* gefunden (Abb. 2.9), welche *dewB* und *dewC* benannt wurden. Die Existenz der neuen Hydrophobine wurde 2009 durch De Groot *et al.* nach umfassender Genomanalyse von Zellwandgenen in *A. nidulans* bestätigt (De Groot *et al.* 2009). Alle vier Hydrophobine zeigen die für Hydrophobine typischen acht Cysteine, welche für die intramolekularen Disulfidbrücken verantwortlich sind.

Die neuen Hydrophobingene sind 548 (*dewB*) bzw. 543 Nukleotide (*dewC*) lang und enthalten jeweils zwei Introns. Die Länge der Proteinsequenz liegt bei 135 Aminosäuren für DewB und bei 143 Aminosäuren für DewC (Tabelle 2.2). Durch das Programm „SignalP 3.0“ konnte gezeigt werden, dass alle vier ein Signalpeptid (SP) am N-Terminus aufweisen, welches zwischen der Aminosäure 18 bis 22 abgespalten wird (Abb. 2.9, blauer Kasten und Tabelle 2.2).

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden bekannten und die beiden neuen Hydrophobine in *A. nidulans* weiter charakterisiert. Zusätzlich wollte man sich Ihre besonderen Eigenschaften der Oberflächenbeschichtung zunutze machen.

Tabelle 2.2: Charakteristika der Hydrophobine in *A. nidulans*

Auflistung der Annotationsnummern der vier Hydrophobine, der Anzahl der Nukleotide in der codierenden Sequenz (inklusive Introns) und die Anzahl der Aminosäuren, sowie die Länge des Signalpeptides (SP)

Hydrophobine	Annotation	Codierende Sequenz	Anzahl der Aminosäuren	Signalpeptid (SP)
<i>rodA</i>	AN 8803	474 nt	157 As	1 - 19 As
<i>dewA</i>	AN 8006	408 nt	135 As	1 - 19 As
<i>dewB</i>	AN 1837	408 nt	135 As	1 - 18 As
<i>dewC</i>	AN 6401	432 nt	143 As	1 - 22 As

2.5 Die Peptide RGD und LG3 (aus Laminin-5) und ihre Rolle in der Zelladhäsion

Die Beschichtung von Oberflächen mit Zell-Adhäsionsmolekülen wird schon seit vielen Jahren untersucht. Ziel ist es einen starken mechanischen Kontakt zwischen den Zellen und künstlichen Oberflächen zu bilden. Die Zelladhäsion wird durch Integrine vermittelt, welche eine Klasse von heterodimeren Transmembran-Zellrezeptoren darstellen, die selektiv an verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) binden.

Es ist bekannt, dass die Zelltypen verschiedener Gewebe ein zellspezifisches Integrin-Muster exprimieren und dass einige Zelltypen ihr Integrin-Muster im Laufe ihres Lebens verändern (Kantlehner *et al.* 2000). Anfänglich wurden Oberflächen mit Proteinen, wie Fibronectin, Kollagen oder Laminin beschichtet. Später ging man dazu über, den Zellen nur kleine immobilisierte Peptide als Erkennungsmotive zu präsentieren. Der Vorteil dieser Peptide ist, dass sie eine höhere Stabilität gegenüber Sterilisationsbedingungen, Wärmebehandlung und pH-Schwankungen haben. Darüber hinaus enthalten ECM-Proteine normalerweise viele verschiedene Zellerkennungsmotive, während kleine Peptide nur ein einziges Motiv darstellen. Deshalb können sie selektiv eine bestimmte Art von Zelladhäsionsrezeptoren ansprechen (Hersel *et al.* 2003).

Fibronektin ist ein Glykoprotein der ECM, welches in viele physiologische Prozesse integriert ist. Unter anderem spielt es in der Zellmigration und -adhäsion eine wichtige Rolle. Es ist ein Heterodimer aus zwei stabförmigen Polypeptidketten, welche nahe des C-terminalen Ende durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden (Hersel *et al.* 2003; Alberts *et al.* 2005). Das Tri-Peptid „RGD“ wurde vor 24 Jahren durch Pierschbacher und Ruoslahti als minimal essentielle Zelladhäsion-Peptidsequenz in Fibronektin identifiziert (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984). Einerseits hemmen RGD-Peptide die Zelladhäsion an Fibronektin, andererseits fördern sie diese, wenn sie auf Oberflächen fixiert sind. Seitdem wurden zahlreiche zelladhäsive RGD-Motive in vielen anderen ECM-Proteinen, einschließlich Vitronektin, Kollagen und Laminin identifiziert. Für etwa die Hälfte der 24 Integrine konnte eine RGD-abhängigen Bindung nachgewiesen werden (Hersel *et al.* 2003). Die RGD-Sequenz ist bei weitem die effektivste und am häufigsten verwendete Peptidsequenz für stimulierte Zelladhäsion auf künstlichen Oberflächen. Dies beruht auf ihrer weiten Verbreitung und Nutzung im gesamten Organismus, der Fähigkeit, mehr als einen Zelladhäsionsrezeptor anzusprechen und ihrer biologische Wirkung auf die Zellverankerung, das Zellverhalten und das Zellüberleben (Hersel *et al.* 2003).

Die Laminine sind kollagenähnliche Glykoproteine, ein Bestandteil der ECM und man findet sie in der Basallamina. Sie weisen Bindungsstellen für bestimmte Zelloberflächenrezeptoren (Integrine) auf. Das Lamininmolekül besteht aus einer α -, einer β - und einer γ -Proteinkette, die sich in heterotrimerer Form zum jeweiligen Lamininmolekül zusammensetzen. Bisher konnten fünf verschiedene α -Ketten, drei verschiedene β -Ketten und drei verschiedene γ -Ketten nachgewiesen werden. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Proteinketten, sind bis heute 16 Laminin-Isoformen bekannt. Laminin-1 ($\alpha1\beta1\gamma1$) ist die erste Variante und wird während der Embryogenese exprimiert (Aumailley *et al.* 2003; 2005). Da in der folgenden Arbeit nur mit einem Peptid des Laminin-5 (Laminin- $\alpha3\beta3\gamma2$) gearbeitet wurde, wird nicht genauer auf die anderen Isoformen eingegangen.

Laminin-5 besteht, aus den Lamininseitenketten $\alpha3$, $\beta3$, $\gamma2$ und hat eine einzigartige Struktur sowie biologische Aktivität. Es wurde ursprünglich als Keratinozyten-Matrixprotein identifiziert (Carter *et al.* 1991). Laminin-5 regelt die stabile Haftung des Epithels an das Bindegewebe (Niessen *et al.* 1994) und beeinflusst das Verhalten der Zelle durch die Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wie den Integrinen $\alpha3\beta1$ und $\alpha6\beta4$ (Carter *et al.* 1991; Niessen *et al.* 1994). Die Laminin-5 $\alpha3$ -Seitenkette enthält eine C-terminale globuläre Domäne (LG), die aus fünf Modulen besteht LG1 bis LG5, welche eine Länge von jeweils ~ 200 Aminosäuren haben (Talts *et al.* 1998; Timpl *et al.* 2000). Die C-terminale Domäne LG3 in der $\alpha3$ -Seitenkette ist für die essentielle Aktivität von Laminin-5 verantwortlich (Hirosaki *et al.* 2000).

Das Peptid-Motiv „PPFLMLLKGSTR“ innerhalb der LG3-Domäne der $\alpha 3$ -Seitenkette des menschlichen Laminin-5 wurde als aktives Zentrum für die Integrin $\alpha 3\beta 1$ -Bindung identifiziert und ist somit wesentlich für die Zelladhäsion (Kim *et al.* 2005).

Zellen sind in der Lage an die ECM mittels der oben genannten Proteine zu adhären - dazu binden sie wie bereits erwähnt an Zellrezeptoren, die Integrine. Integrine bestehen aus zwei nicht-kovalent verbundenen Transmembran-Untereinheiten, genannt α und β . Bisher sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, so dass 24 verschiedene Heterodimere gebildet werden (van der Flier & Sonnenberg, 2001). Die Kombination der besonderen α - und β -Untereinheiten bestimmt die Spezifität der Liganden-Integrin-Bindung. Integrine sind eine Familie von glykosylierten, heterodimeren Transmembran-Adhäsionsrezeptoren (van der Flier & Sonnenberg, 2001). Die meisten Integrine binden an ECM-Komponenten, während andere an Rezeptoren auf anderen Zellen binden. Integrine sind hoch konserviert (Hynes & Zhao, 2000).

2.6 Der Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in Proteinen

Eine Reihe von Proteinen besitzt einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-)Anker. Die GPI-Verankerung ist eine post-translationale Modifikation, welche ebenfalls hoch konserviert ist (Ferguson, 1999; Ikezawa, 2002). Die Existenz von GPI-Anker und deren Modifikation von Proteinen wurde in den 80er Jahren in *Trypanosoma brucei* (parasitärer Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit) entdeckt (Ferguson *et al.* 1988). Im Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher mehr als 60 Gene für prognostizierte GPI-verankerte Proteine gefunden (Kapteyn *et al.* 1999). Einige GPI-verankerte Proteine sind an der Plasmamembran lokalisiert, während andere dort weiter verarbeitet werden und kovalent über den GPI-Anker an die $\beta(1,6)$ -Glucan-Komponenten der Zellwand gebunden sind (Fujita & Jigami, 2008).

Die Biosynthese von GPI ist essentiell, z. B. für das Wachstum von Hefen und die Embryonalentwicklung bei Säugetieren (Leidich *et al.* 1994; Nozaki *et al.* 1999). Die GPI-Proteine durchlaufen bei der Biosynthese und Befestigung eine Reihe von aufeinander folgenden Reaktionen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die meisten Gene, die an der Biosynthese des GPI-Ankers beteiligt sind, hat man in Säugerzellen und der Hefe charakterisiert (Orlean & Menon, 2007).

GPI-verankerte Proteine haben einzigartige Eigenschaften, die sie von den löslichen Proteinen oder Membranproteinen unterscheiden. Eines der auffälligsten Merkmale der GPI-verankerten Proteine ist ihre Verbindung mit einer spezialisierten Lipid-Domäne (*lipid rafts*) (Mayor & Riezman, 2004). Obwohl GPI-Zellwandproteine in Pilzen identifiziert wurden, ist ihre genaue Anbindung an die Glycane nicht im Detail untersucht (De Groot *et al.* 2005). Im Genom von *A. nidulans* wurden bisher 82 mögliche GPI-Proteine gefunden (De Groot *et al.* 2009).

2.6.1 Zwei Hydrophobine in *A. nidulans* besitzen einen mutmaßlichen GPI-Anker

Im Jahre 2009 wurde von De Groot *et al.* veröffentlicht, dass RodA (AN 8803) und DewB (AN 1837) durch einen GPI-Anker kovalent in der Zellwand verankert sein könnten (De Groot *et al.* 2009). Durch eine Proteinanalyse-Datenbank, welche auf mehreren Publikationen beruht (Eisenhaber *et al.* 2001; 2004), konnte diese Vorhersage zusätzlich bestätigt werden.

Ausgabe des GPI-Vorhersageservers:

RodA Sequenz (Länge: 157 As)

MKFSIAAAVV AFAASVAALP PAHDSQFAGN GVGNGKNSNV KFPVPEENVTV KQASDKCGDQ
AQLSCCNKAT YAGDTTVD E GLLSGALSGL IGAGSGA E GL GLFDQCSKLD VAVLIGIQDL
VNQKCKQNIACCQNSPSSAD GNLIGVGLPC VALGSIL

Die wahrscheinlichste prognostizierte GPI-Modifikationsstelle ist in rot dargestellt und befindet sich an Sequenz-Position (As) 138 mit einer Trefferquote von 2,23 (p-Wert = $1,142375e^{-3}$). Die alternative GPI-Modifikationsstelle ist in orange gekennzeichnet und liegt an Sequenz-Position (As) 135 mit einer Trefferquote von 0,47 (p-Wert = $1,545144e^{-3}$)

DewB Sequenz (Länge: 135 As)

MKFIGLATLS L FALASADKF PVPDSITVAE GSSKCGDQAQ LSCCNDVKYG GDTTVVQKGI
AAGLLSDLLG AGSAAEGLGA FSGCSKLDIS L LIGIEDILN QKCKQNIACC AKSGGSADGD
LVGATLPCIA LGSIL

Die wahrscheinlichste GPI-Modifikationsstelle ist in rot dargestellt und ist an Sequenz-Position (As) 116 zu finden mit einer Trefferquote von 4,83 (p-Wert = $7,7076443e^{-4}$). Die alternative GPI-Modifikationsstelle ist in orange angezeigt und liegt an Sequenz-Position (As) 117 mit einer Trefferquote von -4,65 (p-Wert = $3,413082e^{-3}$)

Für DewA und DewC wurde keine mutmaßliche GPI-Modifikationsstelle prognostiziert.

Durch die Modifikation, d. h. das Ersetzen des C-Terminus durch den GPI-Anker, würde bei beiden Hydrophobinen ein Cystein (In der Sequenz blau hervorgehoben.) verloren gehen. Dies würde auch den Verlust einer intramolekularen Disulfidbrücke bedeuten, die sehr wichtig für die Funktion der Hydrophobine ist. Daher ist dies eher unwahrscheinlich (De Groot *et al.* 2009), wird aber in der folgenden Arbeit noch eine Rolle spielen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Funktion von zwei neuen Hydrophobinen durch Deletion

3.1.1 Darstellung der Hydrophobin *rodlets* auf den Sporen von *Aspergillus nidulans* mittels *atomic force microscopy*

Wie schon in Kapitel 2.4 erwähnt, zeigt die *rodA*-Deletionsmutante einen Verlust der externen Zellwandschicht auf den Konidiophoren und Konidiosporen. Dies konnte 1991 schon mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gezeigt werden (Stringer *et al.* 1991).

In dieser Arbeit wurde dieser Phänotyp mittels Rasterkraftmikroskop (AFM = engl. *atomic force microscopy*) bestätigt (Abb. 3.2). Das AFM ermöglicht es, Oberflächenanalysen im Nanometerbereich durchzuführen (Binnig *et al.* 1986). Das Prinzip des AFM besteht darin, dass die Wechselwirkungen zwischen einer die Probe zeilenweise abtastenden Sonde und der zu untersuchenden Oberfläche aufgezeichnet werden. Die gewonnenen Daten werden mittels geeigneter Software als Bildkontrast dargestellt. Mit diesen Rastersondenmikroskopen ist es möglich eine atomare Auflösung zu erzielen und somit einzelne Atome abzubilden (Wintterlin *et al.* 1989). Für die Untersuchung der Oberflächen wurde in dieser Arbeit der *tapping mode* verwendet, bei der die Sonde, auch *cantilever* genannt, in Schwingung versetzt wird und dabei nur kurzzeitig die Oberfläche berührt (Zhong *et al.* 1993).

Das Höhenbild (*height*) zeigt die Änderungen in der Höhe (Länge der z-Achse) der Probe. Diese Höhenänderungen sind als topographische Karte gezeigt (Abb. 3.1 (A)). Der Materialkontrast (*phase*) zeigt die Veränderungen im Phasenwinkel des Ansteuerungssignals unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung des oszillierenden *cantilevers*. Das Ansteuerungssignal wird mit dem Antwortsignal des *cantilevers* verglichen. Wenn Regionen mit verschiedener Elastizität auf der Probenoberfläche aufeinander treffen, wird dies im Materialkontrast sichtbar (Abb. 3.1 (B)). Im Amplitudenbild (*amplitude data*) wird der Ausschlag der Spitze durch den Detektor angezeichnet, d. h. die Oberfläche abgebildet. Zur

Vereinfachung wird nachfolgend meist nur das Amplitudenbild, welches die Oberfläche abbildet, gezeigt.

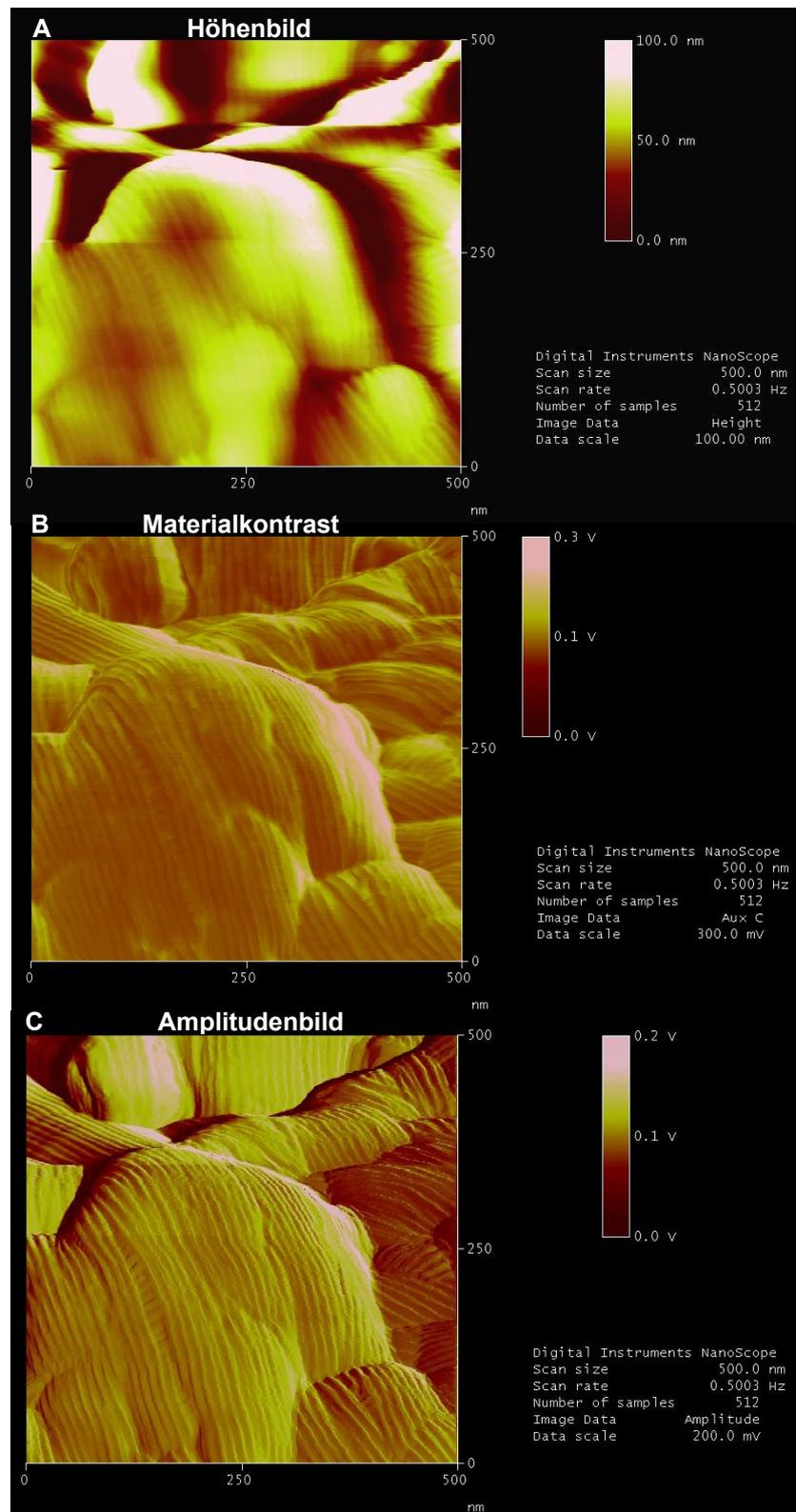


Abb. 3.1: Aufnahmen der Sporenoberfläche des *A. nidulans* Wildtypstammes FGSC44 mittels AFM
Geerntete Sporen des Wildtypstammes FGSC44 aufgenommen mit dem AFM (A) Im Höhenbild sind die Höhenunterschiede der Probe detektiert. (B) Im Materialkontrast ist die unterschiedliche Elastizität auf der Probenoberfläche gezeigt. (C) Im Amplitudenbild wird die Oberfläche der Probe abgebildet. Hier sind auch deutlich die *rodlets* auf der Sporenoberfläche zu sehen.

In den AFM-Aufnahmen des Wildtyp-Stamms FGSCA4, vor allem im Amplitudenbild (Abb. 3.1 (C)), ist deutlich ein geordnetes Mosaik- oder Streifenmuster auf der Sporenoberfläche erkennbar, welches als *rodlet pattern* bezeichnet wird. Diese *rodlets* haben einen Abstand von ~ 10 nm (Wösten *et al.* 1993), dies konnte auch mittels Vermessung der *rodlets* auf den AFM-Aufnahmen in dieser Arbeit bestätigt werden.

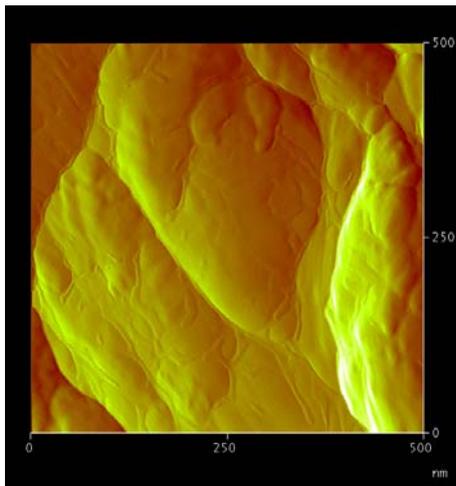


Abb. 3.2: Aufnahme (Amplitudenbild) von der Sporenoberfläche des $\Delta rodA$ -Stamms (RMS019)
Die Oberfläche einer Konidiospore des Stammes RMS019, in dem das *rodA*-Gen deletiert wurde. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.2 (C)) ist deutlich erkennbar, dass das *rodlet*-Muster fehlt.

Der Stamm RMS019 hat eine Deletion im *rodA*-Gen. Er zeigt keine *rodlet*-Strukturen auf der Sporenoberfläche im Amplitudenbild des AFM (Abb. 3.2). Dies entspricht der Beobachtung die Stringer *et al.* schon 1991 via TEM machten. Zusätzlich zeigt das Myzel eine geringere Hydrophobizität und wirkt dadurch dunkler (Stringer *et al.* 1991).

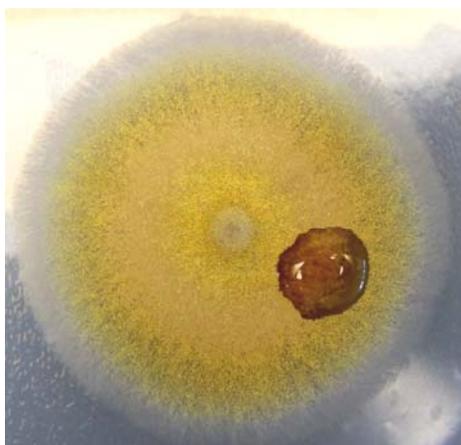


Abb. 3.3: Hydrophobizitätstest von $\Delta rodA$
Eine Kolonie des $\Delta rodA$ -Stamms mit einem Tropfen 0,2% SDS/50mM EDTA-Lösung auf der Oberfläche. Es ist offensichtlich, dass der Tropfen in die Kolonie einsickert und sich ausbreitet.

Augenscheinlicher wird der Effekt unter Verwendung eines Tropfens einer detergenshaltigen Lösung (0,2% SDS/50 mM EDTA (= Ethylendiamintetraacetat)) auf der Oberfläche einer Kolonie (Abb. 3.3, Stringer & Timberlake 1995).

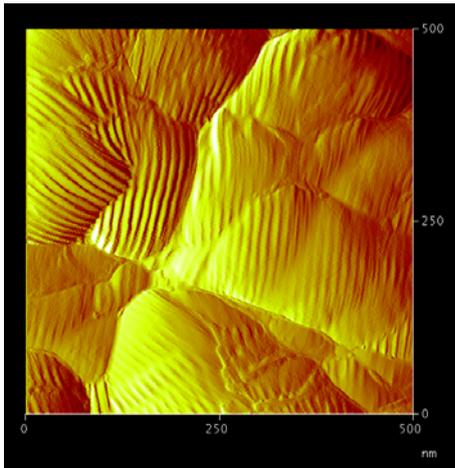


Abb. 3.4: Sporenoberfläche des $\Delta dewA$ -Stammes (TMS027) aufgenommen mittels AFM

Die Oberfläche einer Konidiospore des Stammes TMS027 zeigt das typische *rodlet*-Muster, obwohl hier eine Deletion des *dewA*-Gen vorliegt.

Dem Stamm TMS027 (Abb. 3.4) fehlt das *dewA*-Gen, da es durch das Markergen *argB* (Arginin) ersetzt wurde. Es ist auffällig, dass im AFM-Bild *rodlets* auf der Oberfläche der Konidiosporen sichtbar sind. Die Sporenoberfläche dieses Stammes unterscheidet sich nicht von der des Wildtyps (vergl. Abb. 3.1 (C)).



Abb. 3.5: Hydrophobizitätstest von $\Delta dewA$

Auf die Kolonie des $\Delta dewA$ -Stammes wurde ein Tropfen 0,2% SDS/50mM EDTA-Lösung pipettiert. Es ist klar ersichtlich, dass der Tropfen sich auf der Kolonie ausbreitet und leicht einsickert, was durch die dunklere Farbe erkennbar ist.

Mittels des Hydrophobizitätstest kann eine leichte Reduktion in der Hydrophobizität festgestellt werden (Abb. 3.5). Dies konnte schon 1995 von Stringer und Timberlake bei der Erstpublikation gezeigt werden (Stringer & Timberlake, 1995).

Betrachtet man die Sporenoberfläche des Stammes RMS049 (Abb. 3.6) und vergleicht sie mit dem Stamm RMS019 (Abb. 3.2) ist auffällig, dass bei beiden Stämmen die *rodlet*-Strukturen fehlen. Dem Stamm RMS049 fehlt sowohl das *rodA*-Gen als auch das *dewA*-Gen. Auch der Hydrophobizitätstest zeigt, dass diese sehr stark verringert ist und ein Tropfen detergenschaltiger Lösung, der auf das Myzel gegeben wird, schnell einsickert (Abb. 3.7; Stringer & Timberlake, 1995). Das Myzel der Doppeldeletionsmutante wird auch unter normalen Umständen schnell feucht und verfärbt sich durch die Feuchtigkeit, welche sich zwischen den Hyphen der Kolonien sammelt, bräunlich (Abb. 3.7).

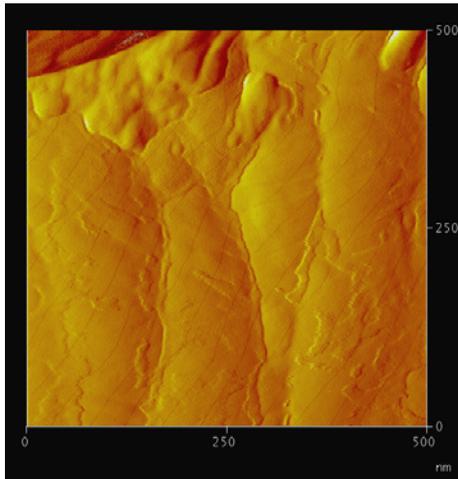


Abb. 3.6: Oberfläche einer Konidiospore des Stammes RMS049
Beim Stamm RMS049 handelt es sich um eine Doppeldeletionsmutante, d.h. sowohl das *rodA*-Gen als auch das *dewA*-Gen fehlen diesem Stamm. Die Oberfläche einer Konidiospore zeigt keine *rodlets*.

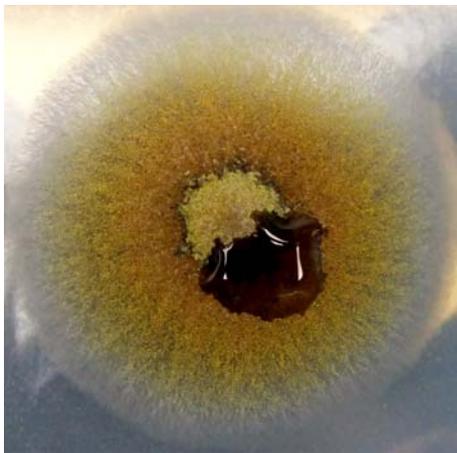


Abb. 3.7: Hydrophobizitätstest von $\Delta rodA \Delta dewA$
Kolonie des $\Delta rodA \Delta dewA$ -Stamms. Für den Hydrophobizitätstest wurden ein Tropfen 0,2% SDS/50mM EDTA-Lösung auf die Oberfläche gegeben. Es ist deutlich sichtbar, dass der Tropfen schnell einsickert und sich sehr stark ausbreitet.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass *rodA* für die Ausbildung von *rodlets* auf der Oberfläche der Konidiosporen verantwortlich ist. Durch die zumindest teilweise Verringerung der Hydrophobizität im Δdew -Stamm, ist es aber nicht auszuschließen, dass die anderen Hydrophobine ebenfalls eine Rolle bei der Erhaltung der Hydrophobizität spielen, aber keine Auswirkung auf die *rodlet*-Bildung haben.

3.1.2 Gendeletion von *dewB* und *dewC*

Um die beiden neuen Hydrophobine *dewB* und *dewC* ebenfalls zu deletieren, mussten zuerst die Konstrukte für die Transformation von *A. nidulans*-Protoplasten konstruiert werden.

3.1.2.1 Deletion von *dewB*

Um *dewB* mit dem Markergen *pyrG* aus *Aspergillus fumigatus* zu ersetzen, wurden ~ 800 bp im Genom *upstream* (Abb. 3.8, LB = left border) und ~ 650 bp *downstream* des *dewB*-Gens (Abb. 3.8, RB = right border) mittels PCR amplifiziert und über flankierende Sequenzen in den Primern am 3'-Ende der *left border* bzw. am 5'-Ende der *right border* und an beiden Enden des *pyrG*_(Af)-Markergens ligiert (Abb. 3.8). Dieses *dewB*-Deletionskonstrukt wurde in die Protoplasten des *A. nidulans*-Stamms TN0 2A3 transformiert. Im Stamm TN0 2A3 ist das *nkuA*-Gen deletiert, daher ist die Frequenz an nicht homologer Integration von transformierten DNA-Fragmenten stark verringert (Nayak *et al.* 2006).

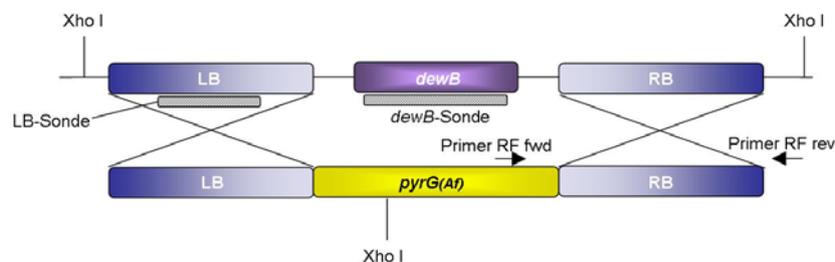


Abb. 3.8: Schema der *dewB*-Gendeletion

In blau sind die Bereiche *upstream* (LB = *left border*) bzw. *downstream* (RB = *right border*) von *dewB* im Genom gekennzeichnet, die mittels PCR amplifiziert wurden. Oben ist das Schema der Situation im Genom mit *dewB*-Gen (lila) gezeigt. Unten ist das Deletionskonstrukt mit dem *pyrG*_(Af)-Markergen (gelb) schematisch dargestellt. Unterhalb der LB und des *dewB* zeigen grauen Balken die Bereiche in dem die Sonden binden an. Mit den Pfeilen ist die Lage der Primer für die PCR auf der rechten Flanke (RF) angezeigt.

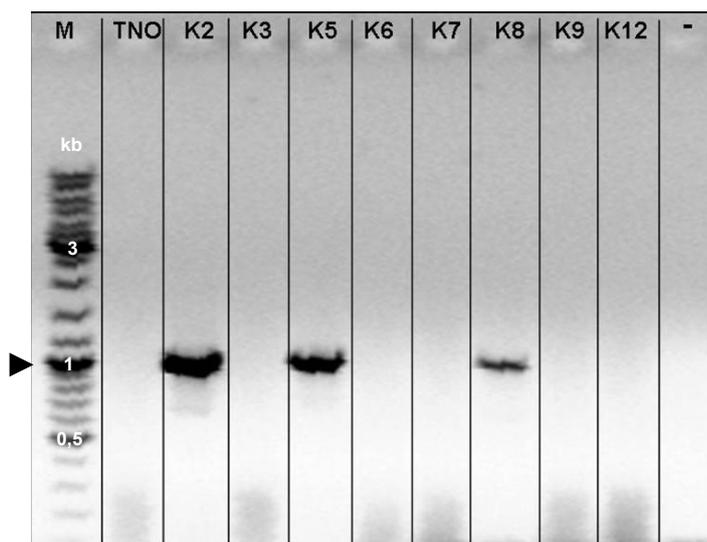


Abb. 3.9: Nachweis der homologen Integration der Δ *dewB*-Deletionskassette mittels PCR mit genomischer DNA (gDNA) als Template

Die gDNA wurde aus den Klonen nach der Transformation des *dewB*-Deletionskonstruktes isoliert und in einer PCR Reaktion eingesetzt. Die Amplifikate wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. Nur die Klone K2, K5 und K8 zeigen eine Bande bei ~ 1000 bp (Pfeil), was auf eine korrekte Integration ins Genom hindeutet.

Die anderen Klone zeigen, genau wie der Wildtyp (TN0 2A3), keine Bande. Daher ist davon auszugehen, dass hier keine oder eine falsche Integration statt gefunden hat. (M = Marker, - = Negativkontrolle)

Von den gewachsenen Transformanten wurde genomische DNA (gDNA) isoliert. Um zu überprüfen, ob das *dewB*-Deletionskonstrukt am richtigen Ort im Genom integriert wurde,

konnte mittels Primer für die rechte Flanke (RF) eine PCR durchgeführt werden. Dabei bindet der *forward*-Primer im *pyrG*_(A β)-Markergen und der *reverse*-Primer außerhalb der *right border* im Genom (Abb. 3.8). Klone, die eine Bande bei ~ 1000 bp zeigen, haben das Konstrukt an der richtigen Stelle ins Genom integriert. Ist keine Bande zu sehen, deutet dies darauf hin, dass das Konstrukt falsch oder nicht integriert wurde (Abb. 3.9).

Im Anschluss wurde die gDNA für die Durchführung von *Southern Blots* verwendet. Dazu wurde sie mit einem Restriktionsenzym, in diesem Fall mit *Xho*I, verdaut. Mittels PCR wurden Digoxigenin (DIG)-markierte Sonden gegen die LB und *dewB*-ORF (*open reading frame* = Offener Leserahmen) amplifiziert. Anschließend wurden die *Southern Blots* mit den jeweiligen Sonden inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz in einem Chemilumineszenzkamerasystem. Dies wird über einen Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Antikörper, der gegen Digoxigenin gerichtet ist (anti-Digoxigenin-AP, Roche) und die Zugabe des Chemilumineszenz-Substrats *CPD-Star*TM (Roche) vermittelt.

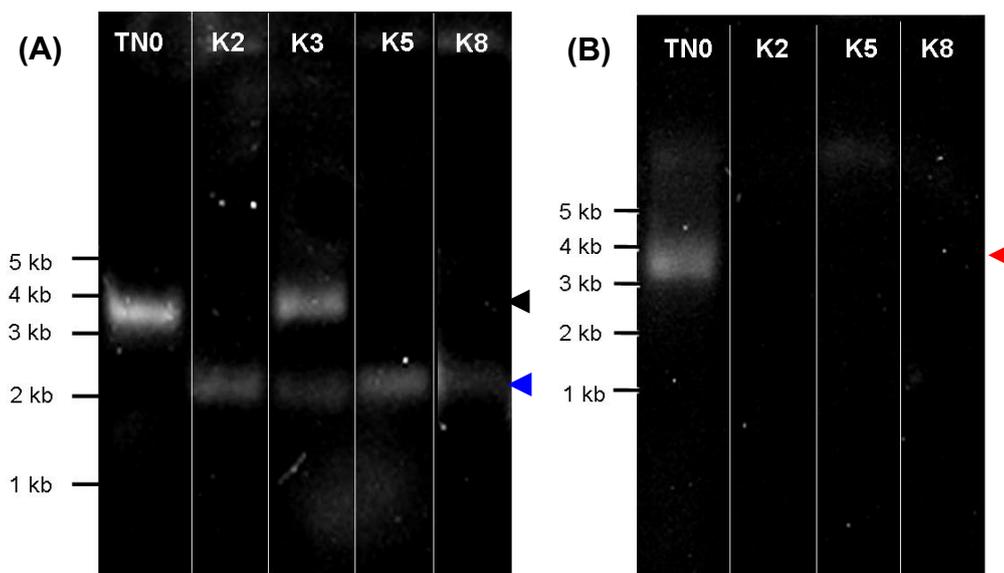


Abb. 3.10: Southern Blot-Analysen mit LB-Sonde und *dewB*-Sonde nach *Xho*I-Verdau der gDNA
 Eingesetzt wurde die gDNA, welche aus den positiven Klonen der PCR-Analyse. Die gDNA wurde für die *Southern Blot*-Analyse mit *Xho*I verdaut. (A) Dieser *Southern Blot* wurde mit einer Sonde gegen die LB hybridisiert. Die erwartete Bande liegt, bei einer korrekten Integration der *dewB*-Deletionskassette, bei ~ 2 kb (blauer Pfeil). Sollte die Deletionskassette nicht oder an der falschen Stelle ins Genom integriert sein, wird eine Bande bei ~ 3,7 kb erwartet (schwarzer Pfeil). Bei den Klonen K2, K5 und K8 ist die Deletionskassette korrekt ins Genom integriert. Bei der Kontrolle mit dem Wildtyp-Stamm TN0 2A3 liegt keine Integration der Deletionskassette vor, daher liegt die detektierte Bande hier bei ~ 3,7 kb. Der Klon 3 zeigt eine mehrfache Integration. (B) Der *Southern Blot* wurde mit einer *dewB*-Sonde inkubiert. Nur im Wildtyp-Stamm TN0 2A3 ist eine Bande (~ 3,7 kb, roter Pfeil) sichtbar, da das *dewB*-Gen in den Deletionsmutanten durch das *pyrG*_(A β)-Gen ersetzt wurde und somit die Sonde nicht mehr binden kann.

Eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle ist jeweils *upstream* und *downstream* des Bereiches, in den die Deletionskassette integriert wird, im Genom lokalisiert. Zusätzlich befindet sich eine weitere *Xho*I-Restriktionsschnittstelle im *pyrG*_(A β)-Markergen (Abb. 3.8). Dadurch ergibt sich ein Größenunterschied der Banden, die durch die Sonden detektiert werden. Bei einer

richtigen Integration der *dewB*-Deletionskassette wird mit der LB-Sonde eine Bande bei 2048 bp sichtbar. Im Wildtyp-Stamm TN0 2A3, der hier als Kontrolle dient, ist eine Bande bei 3692 bp erkennbar. Bei Klon K3 ist sowohl eine Bande bei ~ 2 kb als auch bei ~ 4 kb sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass hier die Deletionskassette mehrfach ins Genom integriert wurde (Abb. 3.10 (A)).

Der *Southern Blot*, der mit der *dewB*-Sonde inkubiert wurde, zeigt nur eine Bande, wenn das *dewB*-Gen noch im Genom vorhanden ist. Da dies nur im Wildtyp-Stamm TN0 2A3 der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Klone K2, K5 und K8 die Deletionskassette enthalten (Abb. 3.10 (B)). Die *dewB*-Sonde kann hier nicht binden, denn das *dewB*-Gen wurde durch das *pyrG*_(Af)-Markergen ersetzt.

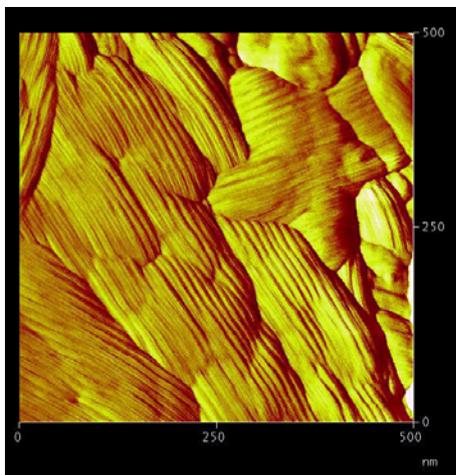


Abb. 3.11: Sporenoberfläche des Δ *dewB*-Stammes

Die Sporen des Δ *dewB*-Stammes (STT01) wurden geerntet und die Sporenoberfläche mittels AFM untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.1 (C)) ist deutlich erkennbar, dass hier ebenso ein *rodlet*-Muster vorliegt.



Abb. 3.12: Hydrophobizitätstest von Δ *dewB* im Vergleich zum Wildtyp

Zwei Kolonien von *A. nidulans* wurden 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Links eine Kolonie des Wildtyp-Stammes (TN0 2A3), rechts eine Kolonie des Δ *dewB*-Stammes (STT01). Für den Hydrophobizitätstest wurde jeweils ein Tropfen 0,2% SDS/50mM EDTA-Lösung auf die Oberfläche gegeben. Es ist eindeutig erkennbar, dass der Tropfen auf der Kolonie des Wildtyp abgerundet ist und nicht einsickert. Bei der Δ *dewB*-Kolonie dringt die Flüssigkeit leicht ein.

Betrachtet man die Sporenoberfläche der *dewB*-Deletionsstämme, so fällt auf, dass wie im Wildtyp (Abb. 3.1(C)) *rodlet*-Strukturen auf der Sporenoberfläche erkennbar sind (Abb. 3.11). Dies bedeutet, dass *dewB* genauso wie *dewA* nicht für die *rodlet*-Bildung benötigt wird.

Der Hydrophobizitätstest mit deterenshaltiger Lösung (Abb. 3.12) zeigt deutlich, dass obwohl noch *rodlets* auf der Oberfläche der Konidiosporen vorhanden sind (Abb. 3.11), die Hydrophobizität im Vergleich zum Wildtyp verringert ist. Diese Beobachtungen decken sich mit denen, die bereits bei $\Delta dewA$ gemacht wurden, dass die Deletion eine Auswirkung auf die Hydrophobizität hat. Dies unterstützt die Hypothese, dass die anderen Hydrophobine eine Rolle der in der Erhaltung der Wasserresistenz der Konidien spielen.

3.1.2.2 Deletion von *dewC*

Bei diesem Deletionskonstrukt sollte das *dewC*-Gen durch das *pyrG_(A7)*-Markergen ersetzt werden. Mittels PCR wurden ~ 1000 bp im Genom *upstream* (Abb. 3.13, LB) und ~ 800 bp im Genom *downstream* von *dewC* (Abb. 3.13, RB) amplifiziert. Im Anschluss wurden beide PCR-Fragmente und das *pyrG_(A7)*-Markergen mit dem Restriktionsenzym *SfiI* verdaut. Nach dem Restriktionsverdau konnten die einzelnen Stücke miteinander ligiert werden. Mit Primern, die weiter innerhalb des 5'- und 3'-Endes des Deletionskonstrukts liegen, so genannten *nested*-Primern, wurde im Anschluss noch einmal eine PCR durchgeführt. Dadurch erhielt man das komplette *dewC*-Deletionskonstrukt (~ 3,8 kb, Abb. 3.13). Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes konnten 10 µg davon für die Transformation in Protoplasten des *A. nidulans*-Stamms TN0 2A3 verwendet werden. Von den daraus resultierenden Transformanten wurde gDNA isoliert.

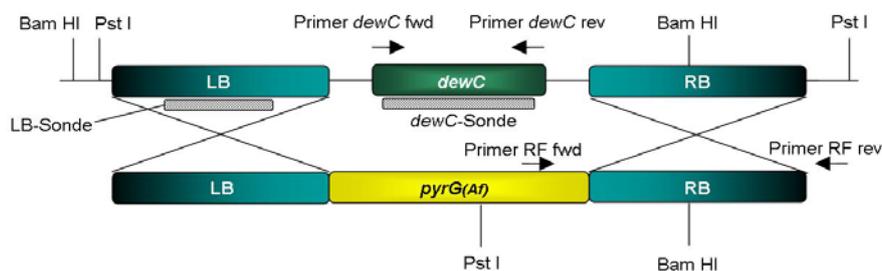


Abb. 3.13: Schema der *dewC*-Gendeletion

Die Bereiche im Genom *upstream* (LB) bzw. *downstream* (RB) von *dewC* sind in türkis gekennzeichnet. Oben ist die Wildtyp-Situation im Genom mit dem *dewC*-Gen (grün) dargestellt. Das Deletionskonstrukt mit dem *pyrG_(A7)*-Markergen (gelb) ist unten schematisiert. Die grauen Balken unterhalb der LB und *dewC* zeigen die Bereiche, in denen die Sonden binden an. Durch die Pfeile ist die Lage der Primer für die Amplifikation der rechten Flanke (RF) und des *dewC*-Gens mittels PCR angezeigt.

Um vorab die richtigen Klone unter allen Transformanten zu finden, wurden PCR-Analysen mit Primern gegen die rechte Flanke (RF) und das *dewC*-Gen auf die gDNA durchgeführt (Abb. 3.14). Mit den RF-Primern sollte bei den positiven Klonen eine Bande bei ~ 900 bp zu

sehen sein. Im Wildtyp-Stamm TN0 2A3 sollte, genau wie bei der Negativkontrolle (\ominus , Abb. 3.14), keine Bande erscheinen. Da das *dewC*-Gen in den korrekt integrierten Deletionsklonen durch den *pyrG*_(A_f)-Marker ersetzt wurde, ist in der PCR mit den Primern gegen *dewC*, nur im Wildtyp eine Bande bei ~ 500 bp amplifizierbar (Abb. 3.14).

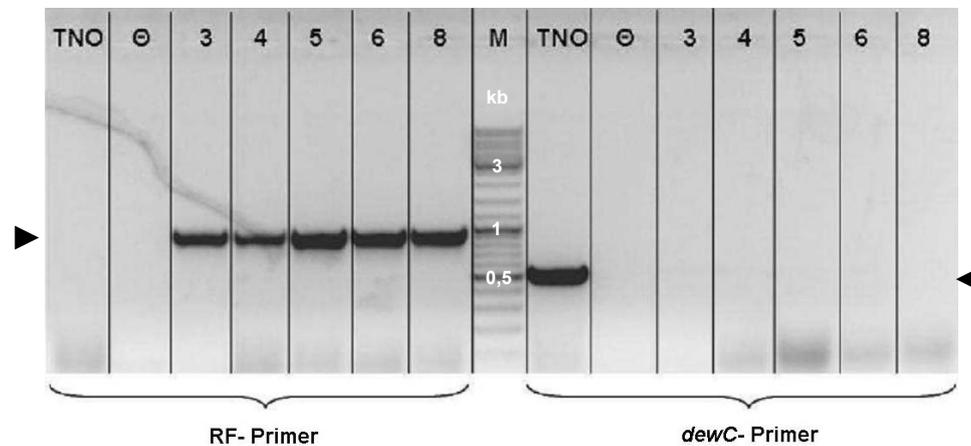


Abb. 3.14: Nachweis der homologen Integration der Δ *dewC*-Deletionskassette mittels PCR mit genomischer DNA (gDNA) als Template

PCR-Analyse der gDNA aus den Transformanten mit *dewC*-Deletionskonstrukt. Die Amplifikate wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. Bei den Klonen K3, K4, K5, K6 und K8 ist eine Bande bei 976 bp sichtbar (Pfeil links). Dies ist ein Hinweis auf eine korrekte Integration des Deletionskonstrukts ins Genom. Der Wildtyp-Stamm (TN0 2A3) enthält den *pyrG*_(A_f)-Marker aus *A. fumigatus* nicht, daher kann der *forward*-Primer nicht binden und es ist keine Amplifikation möglich. Mit den *dewC*-Primern wird nur eine Bande im Wildtyp bei 543 bp sichtbar (Pfeil rechts), da in den Deletionsklonen das *dewC*-Gen mit dem *pyrG*_(A_f)-Markergen ersetzt wurde. (M = Marker)

Die isolierte gDNA, aus den vermeintlich richtigen Deletionsmutanten, wurde mittels Restriktionsenzymen verdaut und die DIG-Sonden gegen die LB und *dewC* mittels PCR amplifiziert. Es wurde ein Restriktionsverdau mit *Pst*I durchgeführt, welches jeweils außerhalb der LB und der RB im Genom schneidet. Zusätzlich befindet sich eine *Pst*I-Schnittstelle im *pyrG*_(A_f)-Marker. Außerdem wurde ein Restriktionsverdau mit *Bam*HI durchgeführt. Die Schnittstellen hier befinden sich außerhalb der LB im Genom und etwa in Mitte der RB (Abb. 3.13). Die verdaute gDNA wurde für die Durchführung von *Southern Blots* verwendet, welche anschließend mit den jeweiligen Sonden inkubiert wurden. Die Detektion erfolgte auch hier mittels eines Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Antikörpers, der gegen das DIG der Sonden gerichtet ist. Durch Zugabe des Substrats *CPD-Star*TM kann die Chemilumineszenz detektiert werden.

Im ersten *Southern Blot* (Abb. 3.15) wurde die *Pst*I-verdaute gDNA eingesetzt. Die Sonde, die für diesen *Blot* verwendet wurde, richtet sich gegen die LB. Bei einer richtigen Integration der *dewC*-Deletionskassette ins Genom wird eine Bande bei 3.350 bp detektiert, dies ist bei dem Klonen K3, K4, K6 und K8 der Fall. Im Wildtyp erscheint zum Vergleich eine Bande bei

4.505 bp. Bei Klon K5 ist eine Bande bei über 5 kb zu sehen, d. h. dass das Deletionskonstrukt falsch ins Genom integriert wurde.

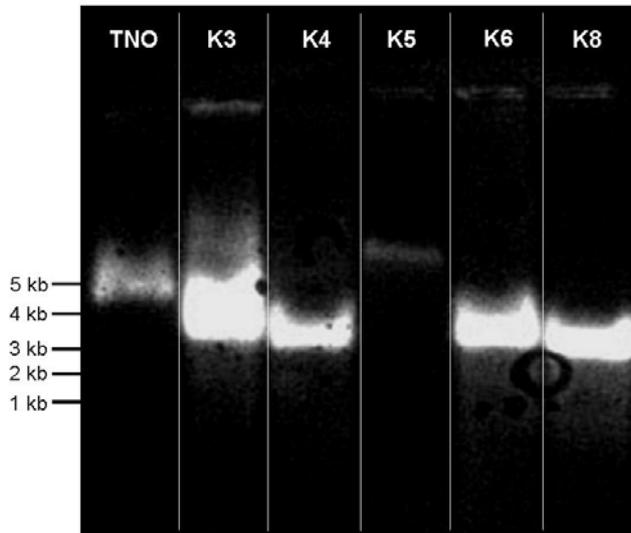


Abb. 3.15: Southern Blot mit LB-Sonde nach *Pst*I-Verdau der gDNA

Eingesetzt wurde gDNA, welche aus den Klonen isoliert wurde, die in der PCR-Analyse positiv waren. Die gDNA wurde für die *Southern Blot*-Analyse mit *Pst*I verdaut. Der *Southern Blot* wurde mit der Sonde gegen die LB inkubiert. Bei einer korrekten Integration der *dewC*-Deletionskassette liegt die erwartete Bande bei ~ 3,4 kb (blauer Pfeil), wie bei den Klonen K3, K4, K6 und K8. Sollte die Deletionskassette nicht ins Genom integriert sein, zeigt sich eine Bande bei ~ 4,7 kb (schwarzer Pfeil). Dies ist beim Wildtyp TN0 2A3 der Fall. Der Klon 5 zeigt eine Bande die über 5 kb liegt, daher ist davon auszugehen, dass hier eine fehlerhafte Integration stattgefunden hat.

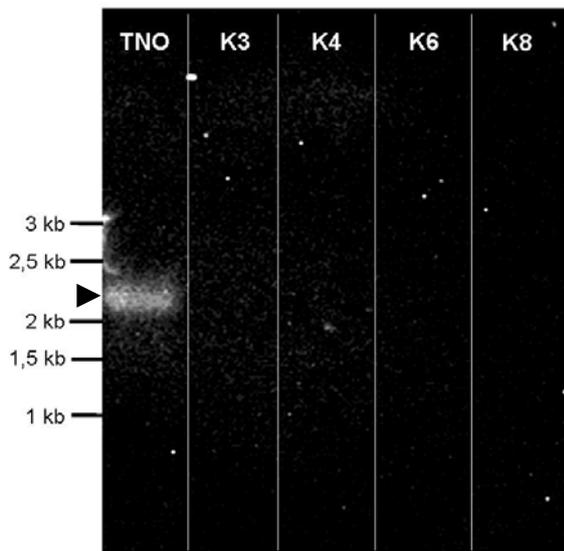


Abb. 3.16: Southern Blot mit *dewC*-Sonde nach *Bam*HI-Verdau der gDNA

Eingesetzt wurde gDNA, welche aus den Klonen isoliert wurde, die in der PCR-Analyse und im ersten *Southern Blot* positiv waren. Die gDNA wurde für die *Southern Blot*-Analyse mit *Bam*HI verdaut. In diesem Fall wurde für die Detektion eine Sonde gegen das *dewC*-Gen verwendet, d.h. das bei einem Austausch des *dewC*-Gens gegen den *pyrG*_(Afl)-Marker, keine Bande erscheint. Im Wildtyp-Stamm TN0 2A3 (ohne Deletionskassette) kann die Sonde an das *dewC*-Gen binden und somit wird eine Bande bei ~ 2,2 kb sichtbar (Pfeil).

Für den zweiten *Southern Blot* (Abb. 3.16) wurde die gDNA mit *Bam*HI verdaut und mit einer Sonde gegen das *dewC*-Gen inkubiert. In den Klonen mit der richtigen Integration ist keine Bande detektierbar, da das *dewC*-Gen durch den *pyrG*_(Afl)-Marker ersetzt wurde. Nur im Wildtyp-Stamm ist eine Bande bei 2,206 bp sichtbar.

Bei der Untersuchung der Konidiosporenoberfläche der *dewC*-Deletionsmutanten sind eindeutig *rodlet*-Strukturen (Abb. 3.17), ähnlich wie im Wildtyp (Abb. 3.1 (C)) erkennbar. Das heißt, dass das Fehlen des *dewC*-Gens keine Auswirkungen auf die Bildung der *rodlets* auf der Sporenoberfläche hat. Dies konnte schon bei der *dewA*- und *dewB*-Deletion beobachtet werden.

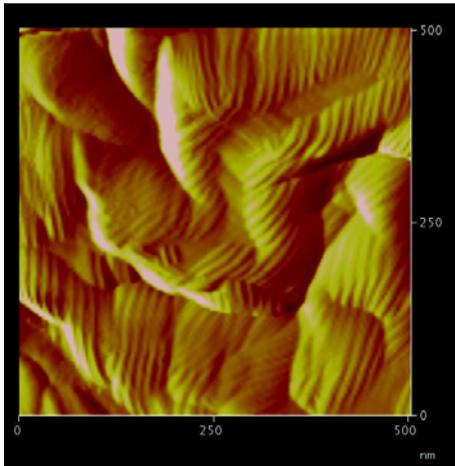


Abb. 3.17: AFM-Aufnahme der Sporenoberfläche des Δ dewC-Stammes

Sporen des Δ dewC-Stammes (STT02) wurden geerntet und die Sporenoberfläche mittels AFM untersucht. Die Sporenoberfläche des Δ dewC-Stammes weist offensichtlich *rodlet*-Strukturen auf.

Der Hydrophobizitätstest mit deterenshaltiger Lösung (Abb. 3.18) zeigt deutlich, dass auch hier im Vergleich zum Wildtyp die Hydrophobizität verringert ist. Diese Beobachtungen decken sich mit denen bei Δ dewA und Δ dewB. Daher ist davon auszugehen, dass diese drei Hydrophobine zwar nicht für die Ausbildung der *rodlets* verantwortlich sind, aber trotzdem zur Hydrophobizität des Myzels beitragen.

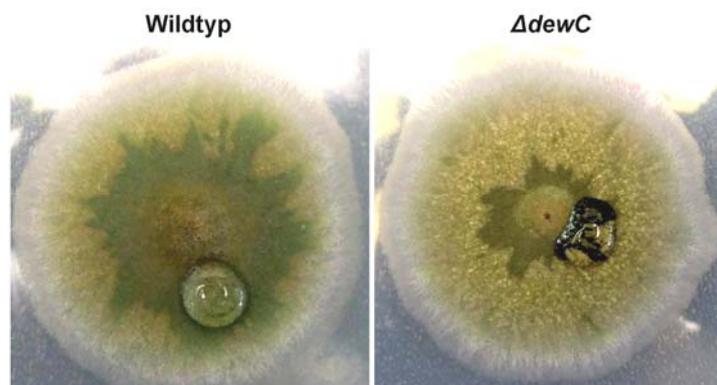


Abb. 3.18: Hydrophobizitätstest von Δ dewC im Vergleich zum Wildtyp

Zwei Kolonien von *A. nidulans* wurden 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Links eine Kolonie des Wildtyp-Stammes (TN0 2A3), rechts eine Kolonie des Δ dewC-Stammes (STT02). Für den Hydrophobizitätstest wurde jeweils ein Tropfen 0,2% SDS/50mM EDTA-Lösung auf die Oberfläche gegeben. Der Tropfen auf der Kolonie des Wildtyps ist abgerundet und nicht einsickert. Bei der Δ dewC-Kolonie sickert die Flüssigkeit leicht ein. Schon nach wenigen Sekunden ist eine dunkle Färbung sichtbar.

3.1.3 Kreuzung von $\Delta rodA/\Delta dewA$ mit $\Delta dewC$

Um *triple*-Deletionen zu erhalten wurde der Doppeldeletionsstamm $\Delta rodA/\Delta dewA$ mit dem $\Delta dewC$ -Einzeldelentionsstamm gekreuzt. Zur Einleitung einer Kreuzung zweier Stämme müssen deren Hyphenzellen fusionieren. In einigen Hyphenzellen kommt es dann zur Kernverschmelzung (Karyogamie) und zur Bildung diploider Zellkerne. Aus den diploiden Zellen entwickeln sich die Asci, in denen durch meiotische und eine anschließende mitotische Teilung haploide Ascosporen gebildet werden. Diese Ascosporen können durch Neukombination und Rekombination einen veränderten haploiden Chromosomensatz besitzen (Sievers *et al.* 1997).

Um die Klone zu finden, die alle Mutationen tragen, müssen die Ascosporen geerntet werden. Dazu werden die Kleistothozien, in denen sich die Asci befinden, von ihren Hüllezellen befreit und in Wasser zum Platzen gebracht. Dadurch treten die reifen, roten Ascosporen aus, welche dann auf Agarplatten mit Komplettmedium (CM) ausplattiert werden. Die gewachsenen Kolonien können auf Medien mit verschiedenen Markern überimpft werden (Abb. 3.19).

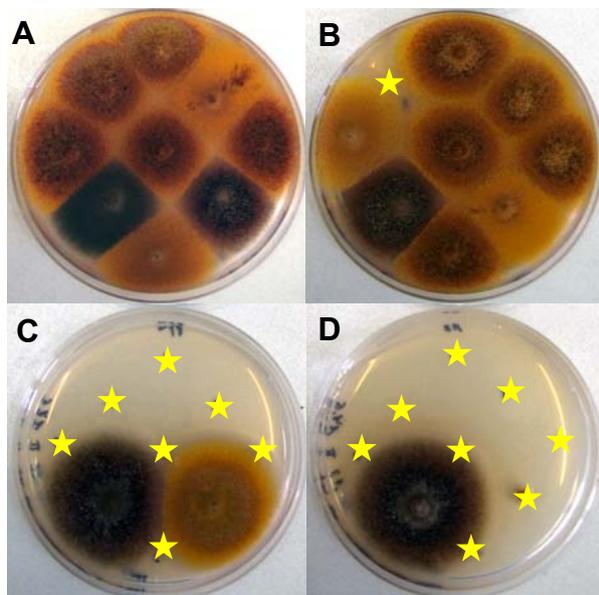


Abb. 3.19: Kolonien, die aus der Kreuzung von $\Delta dewC$ mit $\Delta rodA/\Delta dewA$ hervorgegangen sind wurden auf Medien mit verschiedenen Markern überimpft.

(A) Die Agarplatte enthält Medium mit Paba- und Pyro-Marker. Es können beide Kreuzungspartner wachsen. (B) Diese Platte enthält nur Paba im Medium, daher können zusätzlich zu den Klonen, die die *triple*-Deletion tragen, auch die Doppeldeletionsklone wachsen. (C) Die Agarplatte enthält Medium mit dem Pyro-Marker, d. h. hier können sowohl Klone mit der *triple*-Deletion als auch die $\Delta dewC$ -Klone wachsen. (D) Das Medium in dieser Agarplatte enthält keine Marker, daher wachsen hier nur die *triple*-Deletionsklone. Die gelben Sterne zeigen die nicht anwachsenden Klone.

Der $\Delta dewC$ -Stamm benötigt Pyro (Pyridoxin-HCl) im Medium. Die Doppelmutante kann nur auf Platten, die Paba (P-Aminobenzoesäure) enthalten, wachsen. Klone, die aus der Kreuzung hervorgegangen sind, wurden auf Agarplatten mit und ohne diese Auxotrophiemarker in verschiedenen Kombinationen überimpft. Sind beide Marker im Medium enthalten (Abb. 3.19 (A)) können beide Kreuzungspartner ebenso wachsen wie die *triple*-Deletionsklone. Ist nur Paba im Medium vorhanden (Abb. 3.19 (B)) können außer den Klonen, welche die korrekte *triple*-Deletion enthalten, auch die Klone, die nur die

Doppelmutation $\Delta rodA/\Delta dewA$ tragen, wachsen. Ist nur Pyro vorhanden (Abb. 3.19 (C)) können die *triple*-Deletionsklone und die Klone der $\Delta dewC$ -Einzeldelation wachsen. Von der Agarplatte, die keine der beiden Marker enthält (3.19 (D)), können nur Klone wachsen, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die $\Delta rodA/\Delta dewA/\Delta dewC$ -Deletion tragen. Der Genotyp wurde anschließend mittels PCR gegen die einzelnen Hydrophobingene bestätigt.

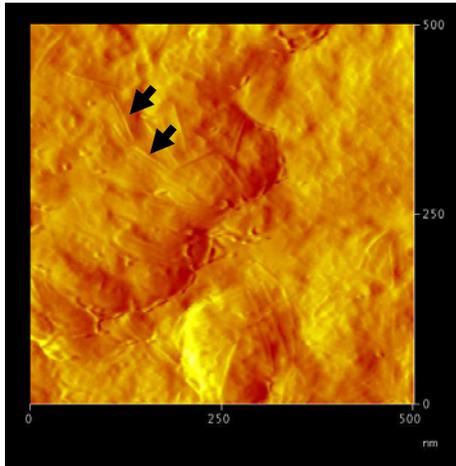


Abb. 3.20: AFM-Aufnahme der Sporenoberfläche eines *triple*-Deletionsstammes $\Delta rodA/\Delta dewA/\Delta dewC$

Sporen des $\Delta rodA/\Delta dewA/\Delta dewC$ -Stammes (STT12) wurden geerntet und die Sporenoberfläche mittels AFM untersucht. Die Sporenoberfläche des *triple*-Deletionsstammes weist keine *rodlet*-Strukturen auf. Die einzelnen feinen Furchen (Pfeile) entstehen durch Ablenkungen des *cantilevers* während der Aufnahme.

AFM-Aufnahmen eines dieser *triple*-Deletionsklone zeigen, dass auch hier keine *rodlet*-Strukturen sichtbar sind (Abb. 3.20). Der durchgeführte Hydrophobizitätstest mit Wasser und deterenshaltiger Lösung (Abb. 3.21) zeigt deutlich, dass die Hydrophobizität ebenfalls sehr stark verringert ist. Daraus lässt sich schließen, dass sich der Effekt der Hydrophobizitätsveringerung durch die Deletion der drei Hydrophobine verstärkt, was beweist, dass alle Hydrophobine für die Wasserresistenz der Konidien verantwortlich sind.

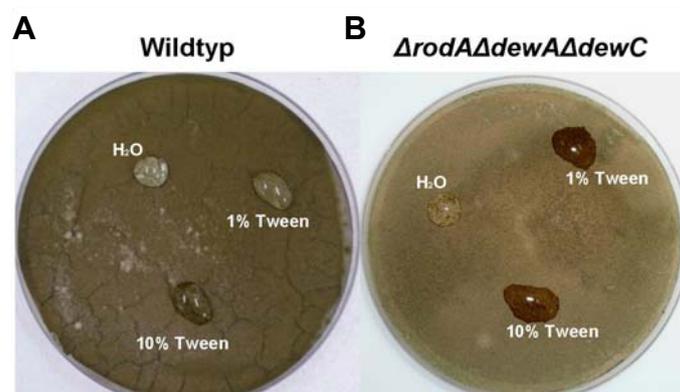


Abb. 3.21: Hydrophobizitätstest von $\Delta rodA\Delta dewA\Delta dewC$

Bewachsene Agarplatten mit *A. nidulans*-Stämmen (A) Wildtyp TN0 2A3 (B) $\Delta rodA\Delta dewA\Delta dewC$ -Stamm. Für den Hydrophobizitätstest wurden drei Tropfen mit jeweils 200 μ l Flüssigkeit auf die Oberfläche gegeben. Es ist eindeutig erkennbar, dass der Wassertropfen bei beiden Stämmen auf dem Myzel verbleibt. Die deterenshaltigen Flüssigkeiten sickern allerdings beim $\Delta rodA\Delta dewA\Delta dewC$ -Stamm direkt in das Myzel ein. Daher ist hier auch schon nach wenigen Sekunden eine dunkle Färbung sichtbar. Zusätzlich bleiben diese Tropfen nicht abgerundet auf der Myzeloberfläche, sondern breiten sich schnell aus.

3.2 Expression der Hydrophobine in *A. nidulans*

Um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt des Wachstums die Expression der Hydrophobine nachweisbar ist, wurde nach Induktion der asexuellen Entwicklung die Gesamt-RNA isoliert und *Northern Blot*-Analysen durchgeführt. Zunächst wuchsen die Pilzkulturen des Stammes FGSCA4 in flüssigem Medium. Hier bildet *A. nidulans* keine Sporen, sondern wächst als Hyphengeflecht. Zur Induktion der asexuellen Entwicklung wurde immer die gleiche Menge Myzel, welches vorher durch Spülen mit Magnesiumsulfat-Lösung und leichtes Drücken zwischen zwei Papiertüchern von Medium befreit wurde, auf Cellophan-beschichtete Agarplatten gegeben und gleichmäßig verteilt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Myzel von Cellophan-beschichteten Agarplatten geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Es wurden jene Zeitpunkte gewählt, die mit der Bildung verschiedener Stadien während der asexuellen Entwicklung korrelieren (Abb. 3.22).

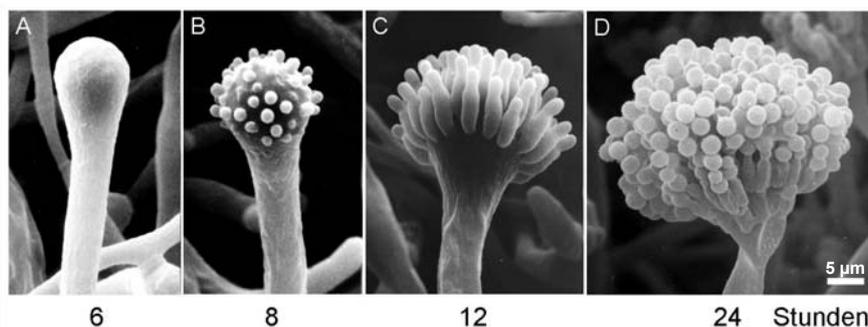


Abb. 3.22: Stadien der asexuellen Entwicklung

(A) Sechs Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung hat sich der Vesikel der Konidiophore entwickelt. (B) Nach weiteren zwei Stunden haben sich die Metulae gebildet. (C) Etwa nach 12 Stunden sind die Phialiden ausgebildet. (D) Reife Konidiosporen sind nach ~ 24 Stunden auf der Konidiophore sichtbar (verändert nach Munk *et al.* 2008).

Um die Expression der Hydrophobine mit der RNA nachzuweisen, wurden DNA-Sonden gegen die einzelnen Hydrophobine mittels PCR synthetisiert. In diese Sonden wurden, wie bei den *Southern Blots* in Kapitel 3.1, DIG-Nukleotide eingebaut, die später durch Bindung AP-gekoppelter Antikörper und Chemilumineszenz-Signal nachgewiesen werden konnten.

Die *Northern Blots* (Abb. 3.23) zum Nachweis der Genexpression der einzelnen Hydrophobine zeigen, dass alle mehr oder weniger stark 12 bis 24 Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung exprimiert werden. Dies korreliert mit der Entwicklung der Phialiden und Konidiosporen. Bei *rodA* (Abb. 3.23(A)) und *dewB* (Abb. 3.23(C)) ist schon nach acht Stunden, also bei der Metulae-Bildung, eine Genexpression nachweisbar. Unterhalb der Blots ist die 28S-/18S-RNA Bande gezeigt, die als Ladekontrolle dient und einen Hinweis auf die Menge der aufgetragenen RNA gibt.

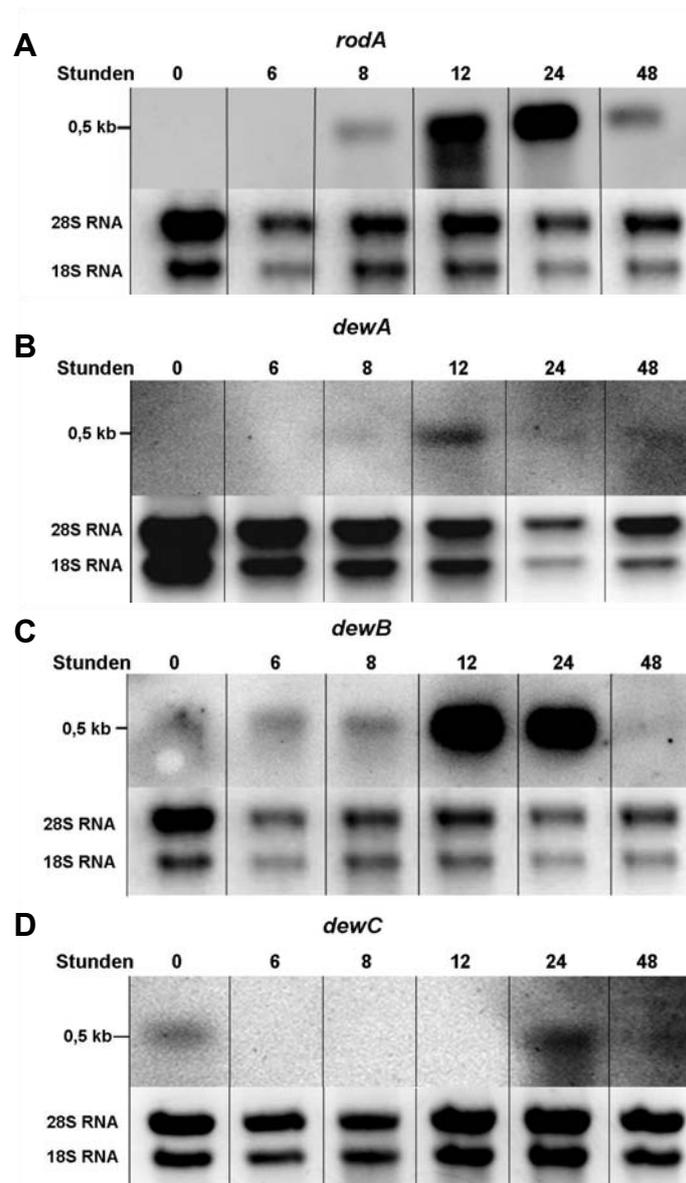


Abb. 3.23: Northern Blot-Analysen zum Nachweis der Expression der vier Hydrophobingene während der asexuellen Entwicklung von *A. nidulans*

Zu verschiedenen Zeitpunkten, die mit Stadien der asexuellen Entwicklung korrelieren, wurde RNA aus dem *A. nidulans* Wildtyp-Stamm (FGSCA4) isoliert und für die Northern Blot-Analyse eingesetzt (A) Der Northern Blot, der mit einer *rodA*-Sonde inkubiert wurde, zeigt eine schwache Bande acht Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung. Deutlicher wird das Signal 12 Stunden nach Beginn der asexuellen Entwicklung und nimmt bei der 48 Stunden-Probe wieder ab. (B) Wurde der Northern Blot mit der *dewA*-Sonde hybridisiert, zeigt sich ein deutliches Signal 12 Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung. Ein schwacher Nachweis der Expression ist schon nach acht Stunden, sowie bei 24 und 48 Stunden erkennbar. (C) Nach Hybridisierung des Northern Blots mit der *dewB*-Sonde lassen sich starke Signale bei 12 und 24 Stunden nach asexuellem Entwicklungsbeginn detektieren. Zusätzlich zeigen sich schwache Signale schon nach sechs bzw. acht Stunden. (D) Ein eindeutiges Signal ist nach der Hybridisierung des Northern Blots mit der *dewC*-Sonde 24 Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung zu sehen. Eine geringe Expression von *dewC* wird auch in der 48 Stunden-Probe sichtbar. Bei allen Northern Blots wurde die 28S- und 18S-RNA als Ladekontrolle verwendet.

3.3 Lokalisierung der Hydrophobine in *A. nidulans*

Da die Genexpressionsanalyse via *Northern Blot* (Kapitel 3.2) zeigte, dass die Hydrophobine während der Entwicklung von Metulae, Phialiden und Konidiosporen exprimiert werden, sollte dies auch mittels Fluoreszenz überprüft werden. Dazu wurden Vektoren konstruiert, die zusätzlich zu den einzelnen Hydrophobinen unter einem induzierbaren Promotor auch ein sGFP (= synthetisches grünfluoreszierendes Protein) am C-Terminus tragen. Das GFP wurde an das C-terminale Ende der Hydrophobine gesetzt, da sich am N-Terminus ein Signalpeptid (SP) befindet, das für die Lokalisierung wichtig ist und beim Export abgetrennt wird. Die Vektoren wurden über das GATEWAY-System konstruiert, welches in unserem Institut etabliert wurde (Abb. 3.24; Toews *et al.* 2004). Die Hydrophobine wurden zuerst mit Hilfe einer PCR amplifiziert und in den pENTR™/D-TOPO® (*Invitrogen*) kloniert. Über eine *in vitro*-Rekombination wurde das jeweilige Hydrophobin-Gen aus dem ENTRY-Klon in den Destinationsvektor übertragen. Der induzierbare Promotor stammt von der Alkohol Dehydrogenase (*alcA*) und wird durch Threonin (oder Ethanol) als C-Quelle im Medium induziert und führt zur Überexpression der Hydrophobin-Fluoreszenzkonstrukte (Abb. 3.24).

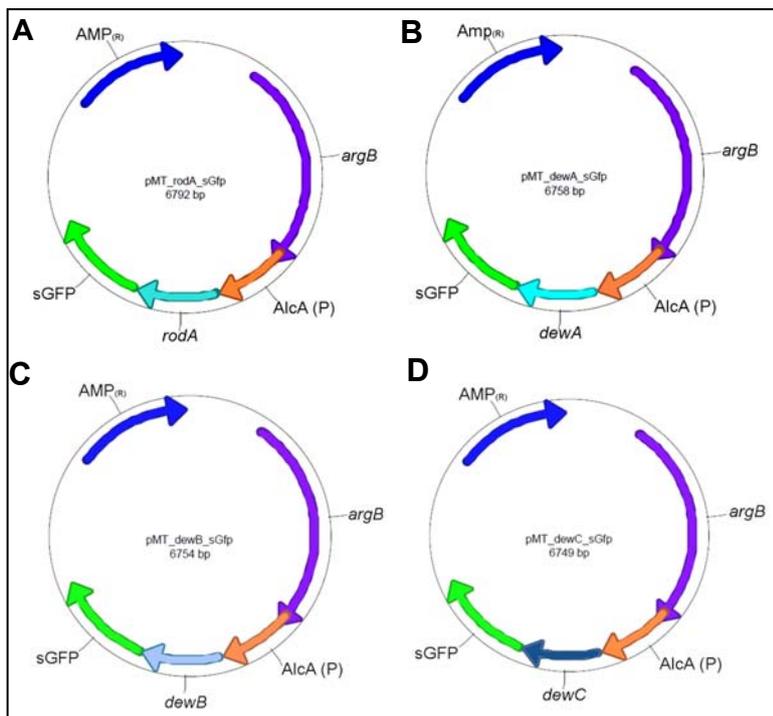


Abb. 3.24: Vektoren zur Lokalisierung der Hydrophobine durch GFP-Fluoreszenz

Vektoren, welche die Hydrophobine unter Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors (orange) und mit C-terminalem sGFP (grün) exprimieren. Die Vektoren enthalten eine Ampicillin-Resistenz (*Amp_R*, blau) und ein Arginin-Markergen (*argB*; lila).

- (A) *alcA*(P)::*rodA*::sGFP;
- (B) *alcA*(P)::*dewA*::sGFP;
- (C) *alcA*(P)::*dewB*::sGFP;
- (D) *alcA*(P)::*dewC*::sGFP;

Die Fluoreszenz-Vektoren mit den einzelnen Hydrophobinen wurden mittels Protoplasten-Transformation in den Stamm RMS011 transformiert. Die Transformanten wurden anschließend zur Induktion des *alcA*-Promotors auf Agarplatten mit Threonin überimpft und nach zweitägigem Wachstum mikroskopiert. *A. nidulans* zeigt bei 510 nm eine leichte

Autofluoreszenz. Um diesem Effekt auszuschließen wurde der Wildtypstamm (RMS011) immer unter den gleichen Bedingungen mikroskopiert und fotografiert (Abb. 3.25 - 3.28).

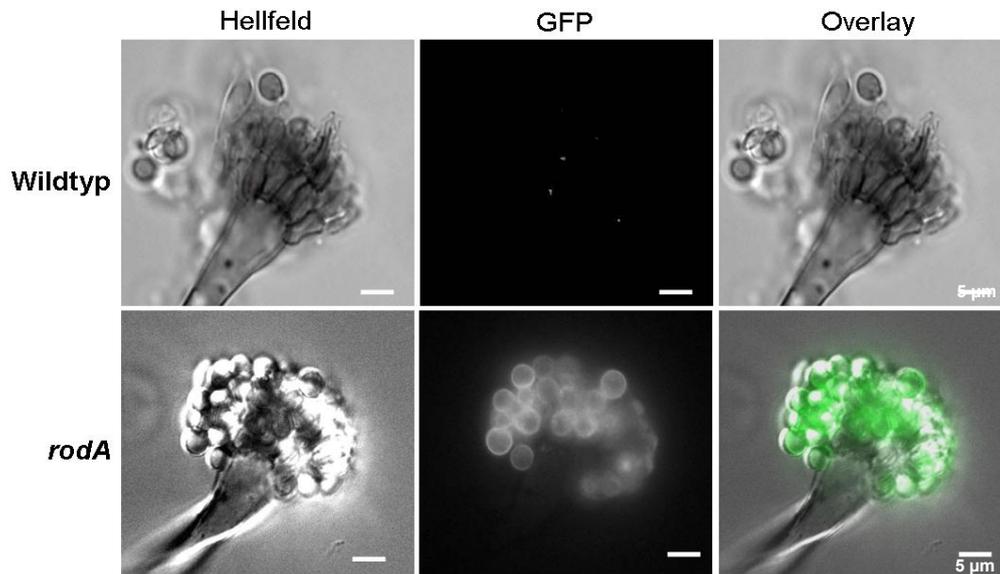


Abb. 3.25: Lokalisierung von RodA via GFP-Fluoreszenz

Im Stamm STT03 ist RodA an sGFP fusioniert. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop ist auf den Konidiosporen eindeutig eine grüne Fluoreszenz erkennbar. Der Wildtyp wurde mit den gleichen Aufnahmebedingungen fotografiert, um Autofluoreszenz-Effekte ausschließen zu können.

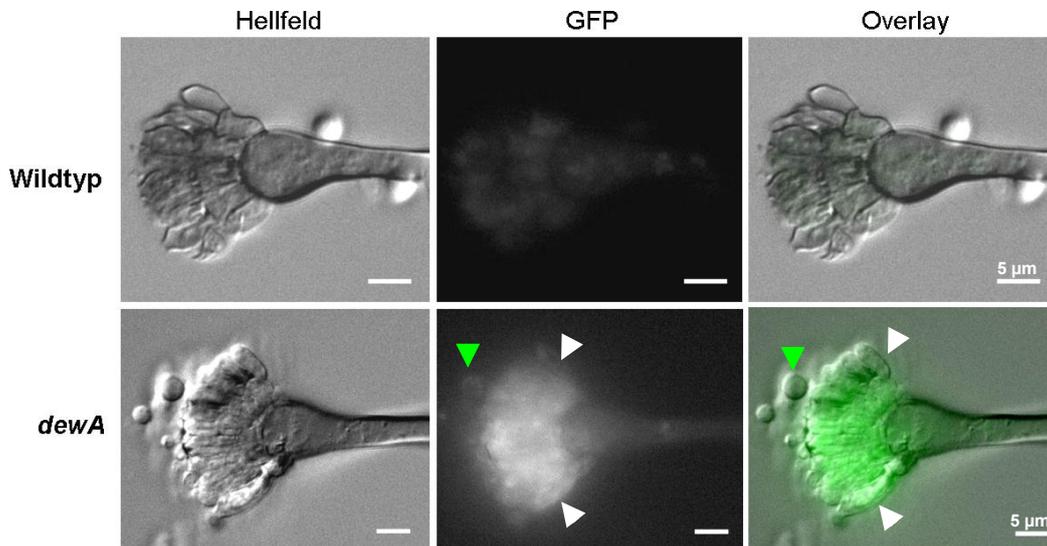


Abb. 3.26: Lokalisierung von DewA mittels sGFP

Im Stamm STT04 wird *dewA* gekoppelt an sGFP exprimiert. Die GFP-Fluoreszenz ist bei mikroskopischer Betrachtung in den Phialiden und Metulae (weiße Pfeile) und den Konidiosporen (grüner Pfeil) sichtbar. Unter den gleichen Aufnahmebedingungen wurde auch der Wildtyp fotografiert. Er zeigt unter diesen Belichtungsbedingungen ein sehr schwaches diffuses Signal.

Betrachtet man die grüne Fluoreszenz im Stamm STT04, in dem *dewA* an GFP fusioniert wurde, ist auch hier ein Signal auf den Phialiden und den Metulae erkennbar (Abb. 3.26). Auch auf den Konidiosporen ist eine grüne Fluoreszenz erkennbar (grüner Pfeil).

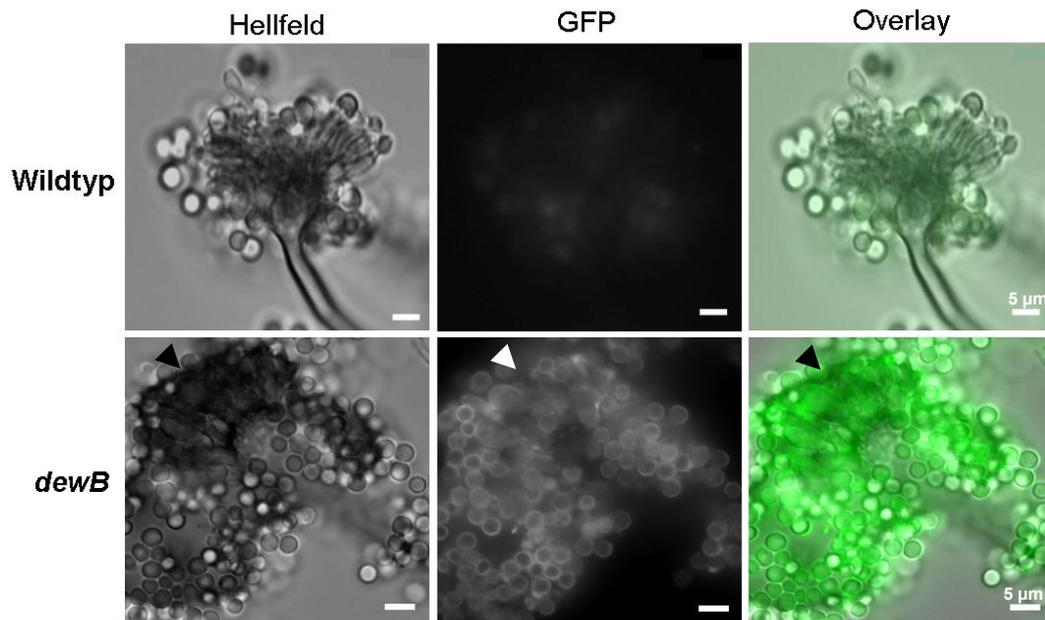


Abb. 3.27: Lokalisierung von DewB über GFP-Fluoreszenz

Im Stamm STT05 wird *dewB* an GFP gekoppelt exprimiert. Bei mikroskopischer Betrachtung ist eine sehr starke grüne Fluoreszenz auf der Sporenoberfläche erkennbar. Auch die Phialiden und Metulae zeigen eine starke Fluoreszenz (Pfeil), wodurch die einzelnen Strukturen kaum zu unterscheiden sind. Der Wildtyp zeigt unter diesen Belichtungsbedingungen kaum erkennbare Fluoreszenz.

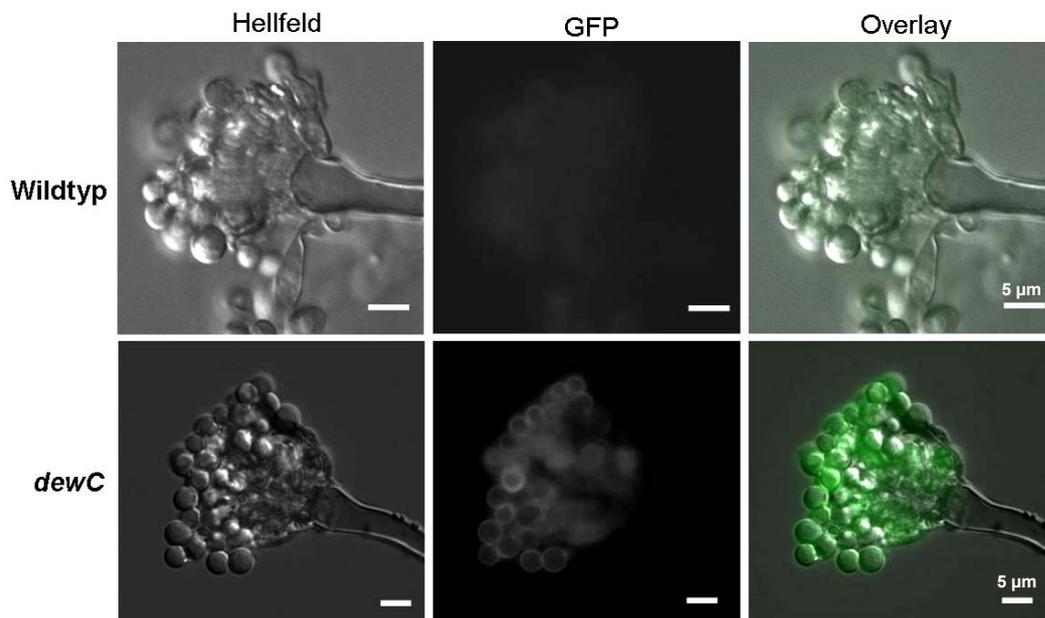


Abb. 3.28: Lokalisierung von DewC mittels sGFP

Die Fluoreszenz des sGFP im Stamm STT06, in dem es an DewC fusioniert wurde, ist unter dem Mikroskop ebenfalls auf den Konidiosporen deutlich erkennbar und zusätzlich auf Phialiden und Metulae. Die Autofluoreszenz des Wildtyps ist unter diesen Belichtungsbedingungen sehr schwach und daher vernachlässigbar.

Wurde DewB an das GFP fusioniert, ist ebenfalls eine starke grüne Fluoreszenz auf der Sporenoberfläche und auf der Oberfläche der Phialiden und Metulae (3.27, Pfeil) sichtbar.

Dadurch sind die Strukturen der Phialiden und Metulae schwer zu unterscheiden. In beiden Fällen zeigt der Wildtyp-Stamm keine detektierbare Fluoreszenz. Nur ein diffuses Signal ist sichtbar. Im Stamm STT06, in dem DewC zusammen mit sGFP exprimiert wird, ist ein starkes Fluoreszenzsignal auf den Konidiosporen (Abb. 3.28), sowie auf den Phialiden und Metulae erkennbar. Der Wildtyp zeigt kein eindeutiges Signal.

3.4 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zur Untersuchung der Interaktion der Hydrophobine

Durch die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC = *bimolecular fluorescence complementation*, auch *Split-YFP* genannt) sollte die Interaktion von RodA und DewA auf der Sporenoberfläche überprüft werden. Dazu wurden Vektoren konstruiert, die entweder den N-terminalen oder C-terminalen Teil des gelbfluoreszierenden Proteins (YFP) besitzen. Wie die meisten fluoreszierenden Proteine ist YFP ein Derivat des GFP, das durch Mutationen verändert wurde. Dennoch bleiben Gesamtstruktur und Funktionsweise erhalten. Kommen die beiden Hälften nach der Proteinexpression durch die Interaktion der Proteine, an die sie fusioniert sind, wieder zusammen, kann man ihre Fluoreszenz detektieren.

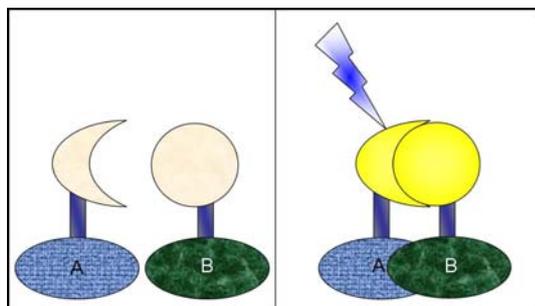


Abb. 3.29: Schematische Darstellung der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Um die Interaktion zweier Proteine (A + B) zu untersuchen, werden sie jeweils mit einer Hälfte des fluoreszierenden Proteins fusioniert. Nur wenn eine stabile Proteininteraktion stattfindet, können beide Hälften des fluoreszierenden Proteins wieder interagieren. Der rekonstruierte Fluorophor kann mittels der geeigneten Wellenlänge angeregt werden und die emittierte Fluoreszenz kann anschließend mikroskopisch detektiert werden (verändert nach Kerppola, 2009)

Jeweils eine Hälfte des YFP wurde an den C-Terminus des jeweiligen Hydrophobins fusioniert. Das jeweilige Hydrophobin wurde zuvor zusammen mit seinem natürlichen Promotor (~ 1000 bp *upstream* des Gens) mittels PCR amplifiziert, dabei wurde Stop-Codon nicht mitamplifiziert. Die Primer zur Amplifikation enthielten dabei Restriktionsschnittstellen mit deren Hilfe die Hydrophobine in die Vektoren kloniert wurden (Abb. 3.30).

Das *rodA* mit natürlichem Promotor hat eine Größe von 1515 bp, *dewA* mit natürlichem Promotor ist 1560 bp groß. Die Teile des YFP haben eine Größe von 463 bp (N-YFP) und 261 bp (C-YFP). Die beiden Vektoren wurden in der gleichen Konzentration in die Protoplasten des *A. nidulans*-Stamms GR5 transformiert. Um zu überprüfen, ob beide

Plasmide aufgenommen wurden, wurde gDNA isoliert und eine PCR auf die Teile des YFPs durchgeführt. Die positiven Transformanten wurden anschließend mikroskopiert.

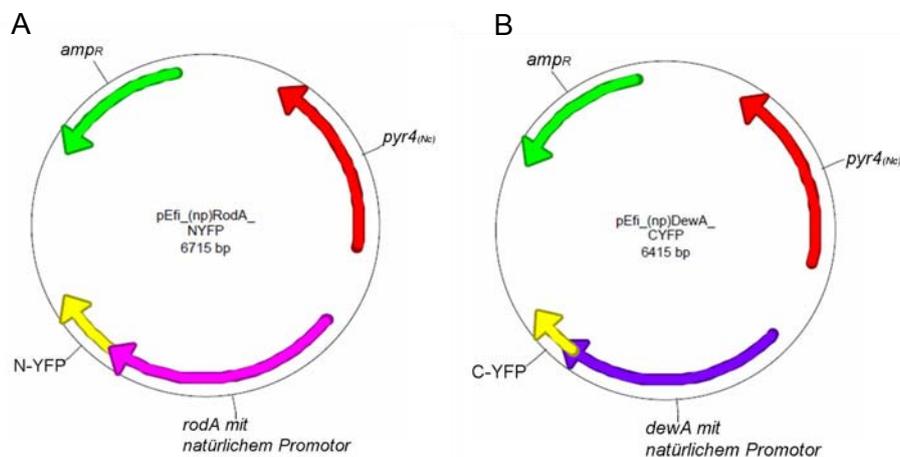


Abb. 3.30: Vektoren für die Untersuchung der Hydrophobin-Interaktion mittels BiFC

Die beiden Vektoren enthalten eine Ampicillin-Resistenz (grüner Pfeil) und ein *pyr4*-Markergen aus *Neurospora crassa* (roter Pfeil) als Auxotrophiemarker. (A) Dieser Vektor enthält *rodA* und seinen natürlichen Promotor (rosa Pfeil, 1515 bp). Am hinteren Ende von *rodA* wurde der N-terminale Teil des *yfp*-Gens (gelber Pfeil, 462 bp) fusioniert. (B) Der hier gezeigte Vektor enthält das *dewA*-Gen und seinen natürlichen Promotor (lila Pfeil, 1560 bp) und an dessen hinterem Ende den C-terminale Teil des *yfp* (gelber Pfeil, 261 bp).

Leider konnte bei keinem der Klone eine eindeutige Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Da beide Hydrophobine auf den gleichen Strukturen des Pilzes exprimiert werden, ist es zwar wahrscheinlich, dass sie interagieren, aber nicht vorauszusetzen.

3.5 Lokalisierung der Hydrophobine mittels RFP

Aus der Literatur ist bekannt, dass RodA und DewB einen GPI-Anker besitzen (De Groot *et al.* 2009). In den Lokalisierungsuntersuchungen im vorangegangenen Kapitel 3.4 wurde GFP an den C-Terminus dieser Hydrophobine fusioniert. In diesen Konstrukten kann es durch den GPI-Anker zu einer Beeinträchtigung der Lokalisation mit GFP durch den GPI-Anker kommen, die das Ergebnis eventuell verfälschen könnte. Um dieses Problem zu umgehen, wurden neue Vektoren konstruiert.

3.5.1 Lokalisierung von RodA mit bzw. ohne GPI-Anker mittels RFP

In diesen Vektoren wurden die Hydrophobine an ein fluoreszentes Protein, in diesem Fall monomeres rotfluoreszierendes Protein (mRFP, Campbell *et al.* 2002), fusioniert. Dazu wurde der natürliche Promotor (nP; ~ 1000 bp upstream des Gens nP) zusammen mit dem Signalpeptid (SP) amplifiziert und N-terminal an das *mrfp* ligiert. Das *rodA*-Gen (ohne SP) wurde ebenso amplifiziert und hinter das *rfp* fusioniert. Zum Einen das komplette *rodA* (Abb. 3.31 (A), mit GPI-Anker) und zum Anderen ein C-terminal verkürztes *rodA* (Abb. 3.31 (B)), dem der gesamte GPI-Anker fehlt. Der Vorteil des mRFP besteht darin, dass kein Autofluoreszenzsignal detektierbar ist.

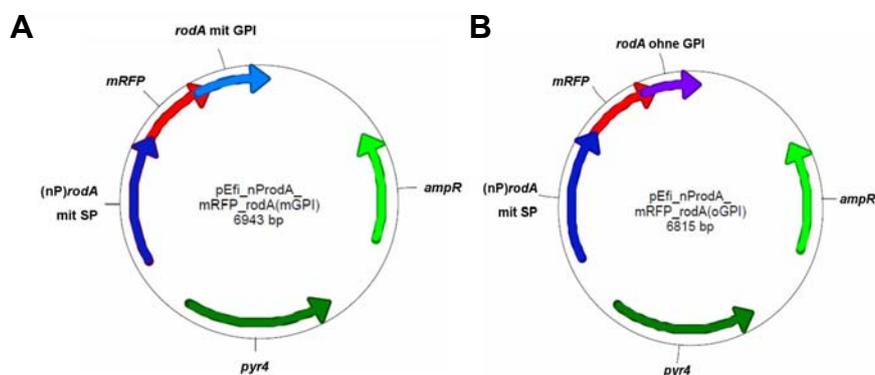


Abb. 3.31: Vektoren mit *rodA* fusioniert an *rfp* für die Lokalisierung

Für die Selektion in *E. coli* besitzen beide Vektoren eine Ampicillin-Resistenz (hellgrüner Pfeil) und ein *pyr4*-Markergen (dunkelgrüner Pfeil) als Auxotrophiemarker. Zusätzlich enthalten beide vor dem *rfp*-Gen (681 bp, roter Pfeil) den natürlichen Promotor von *rodA* mit dem Signalpeptid (1.056 bp, dunkelblauer Pfeil). (A) Bei diesem Vektor wurde hinter das *rfp*-Gen *rodA* mit GPI-Anker fusioniert (528 bp, hellblauer Pfeil). (B) Dem *rodA* in diesem Vektor wurde bei der Modifikation der GPI-Anker entfernt, d. h. es wurde ein verkürztes *rodA* angehängt (399 bp, lila Pfeil).

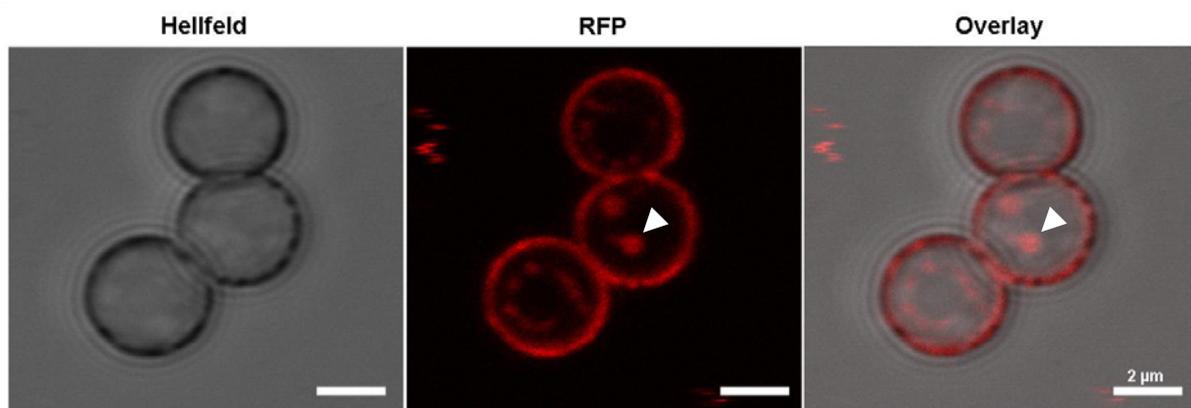


Abb. 3.32: Lokalisierung von RodA mit GPI-Anker in $\Delta rodA$ auf den Konidiosporen

Aufnahmen von Konidiosporen des Stammes STT08 mittels konfokaler Mikroskopie. Exprimiert wird *rodA* mit GPI-Anker fusioniert an *rfp*. Die Fluoreszenz des im Vektor enthaltenen *rfp*-Gens ist sehr deutlich auf der Oberfläche der Sporen erkennbar. Außerdem sind in den Sporen kleinere Akkumulationen sichtbar (Pfeil).

Die Vektoren wurden zur Analyse der Lokalisierung jeweils in den $\Delta rodA$ -Stamm transformiert. Die Transformanten konnten unter dem Mikroskop auf Fluoreszenz untersucht werden. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden aufgrund der besser Auflösung und Qualität mit dem konfokalen Mikroskop angefertigt.

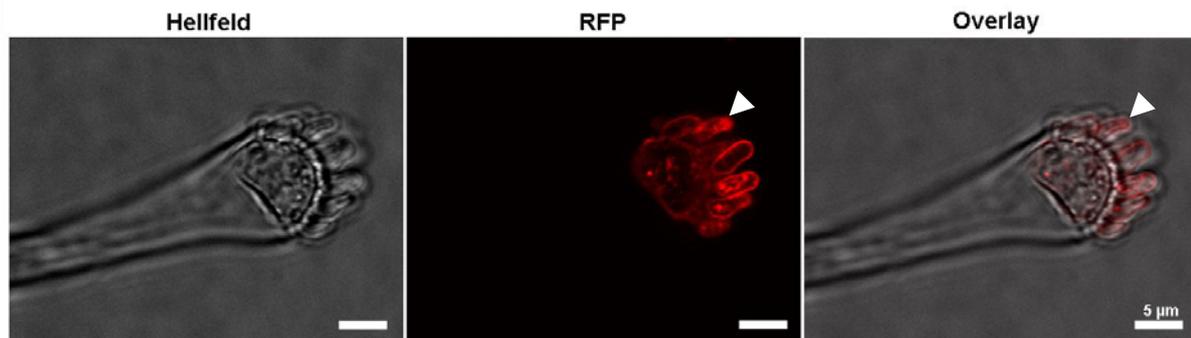


Abb. 3.33: Lokalisierung von RodA mit GPI-Anker in $\Delta rodA$ auf der Konidiophore

Konfokal-mikroskopische Aufnahmen einer Konidiophore des Stammes STT08. Die Expression des *rodA* mit GPI-Anker wird mittels *rfp* detektiert. Eine rote Fluoreszenz ist auf den Metulae und Phialiden sichtbar. Außerdem sind bei genauerer Betrachtung Akkumulationen des RFP in den Phialiden erkennbar (Pfeil).

Die Konidiosporen des Stammes STT08, der das *rodA*-Gen mit GPI-Anker exprimiert (Abb. 3.31 (A)), zeigen eine deutliche rote Fluoreszenz auf der Sporenoberfläche. Teilweise sind auch kleinere Akkumulationen in den Sporen erkennbar (Pfeil, Abb. 3.32). Betrachtet man die Konidiophore desselben Stammes, so sind die Metulae und Phialiden durch das mRFP-Signal deutlich rot gefärbt. Auch hier finden sich bei genauerer Betrachtung Akkumulationen (Pfeil, Abb. 3.33) in den Phialiden. Diese Lokalisierung entspricht den Beobachtungen, die schon mittels GFP-Fluoreszenz gezeigt wurden (Kapitel 3.2).

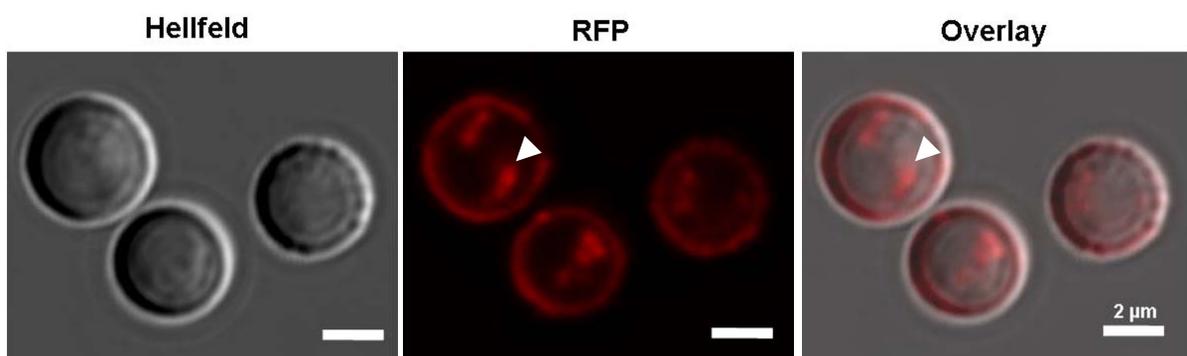


Abb. 3.34: Lokalisierung von RodA ohne GPI-Anker in $\Delta rodA$ auf den Konidiosporen

Aufnahmen von Konidiosporen des Stammes STT09 mittels konfokaler Mikroskopie. Hier wird das C-terminal verkürzte RodA mit RFP im $\Delta rodA$ -Stamm exprimiert. Deutlich ist eine rote Fluoreszenz in der Konidiosporenwand detektierbar. Es sind ebenfalls Akkumulationen in den Sporen erkennbar.

Der Vektor, der das C-terminal verkürzte *rodA* trägt (ohne GPI-Anker), wurde ebenfalls in den $\Delta rodA$ -Stamm transformiert. Durch die Verkürzung des *rodA*-Gens geht auch die Information für das letzte Cystein im RodA-Protein verloren. Daher kann eine intramolekulare

Disulfidbrücke nicht mehr ausgebildet werden, was wiederum zu einer veränderten 3D-Struktur des RodA führen könnte. Zusätzlich könnte das Fehlen des GPI-Ankers zu einer Misslokalisierung führen oder den Verlust des RodA durch die fehlende Verankerung auslösen.

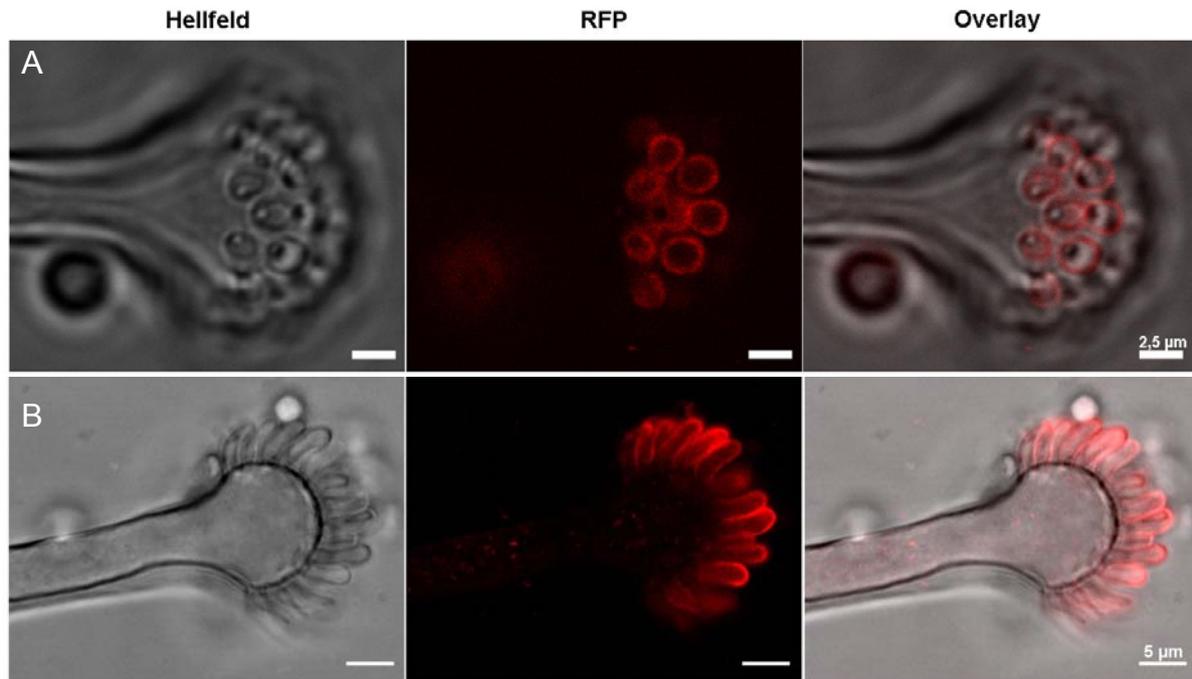


Abb. 3.35: Lokalisierung von RodA ohne GPI-Anker in $\Delta rodA$ auf den Metulae

Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von Konidiophoren des Stammes STT09. Die Expression des verkürzten *rodA* (ohne GPI-Anker), wird mittels *rfp* detektiert. Die rote Fluoreszenz ist auf den Metulae (in (A) von oben und in (B) seitlich) klar ersichtlich.

Das Fehlen des GPI-Ankers und damit der Verlust des letzten Cysteins bzw. der intramolekularen Disulfidbrücke beeinträchtigt die Lokalisierung von RodA nicht (Abb. 3.34). Die Fluoreszenz des fusionierten mRFP ist eindeutig auf der Oberfläche der Konidiosporen erkennbar. Des Weiteren können auch Ansammlungen von roter Fluoreszenz in den Sporen detektiert werden (Pfeil, Abb. 3.34, vergl. Abb. 3.32).

Betrachtet man die Konidiophore des Stammes STT09, der das verkürzten *rodA* fusioniert an *rfp* exprimiert, (Abb. 3.35 (A) und (B)) ist auffällig, dass die eine ähnliche Lokalisierung, wie bei RodA mit GPI-Anker, detektiert werden kann (vergl. Abb. 3.33). Das RFP-Signal ist auf den Metulae lokalisiert, wobei das Signal in der Zellwand der Metulae am stärksten ist. Im Zytoplasma ist ein schwaches, diffuses Signal sichtbar (Abb. 3.35 (B))

Da der $\Delta rodA$ -Stamm, in den die Konstrukte transformiert wurden, keine *rodlets* auf der Sporenoberfläche trägt (Abb. 3.2, Kapitel 3.1), sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob durch die Retransformation der *rodA*-Konstrukte wieder *rodlets* auf der Sporenoberfläche auftreten.

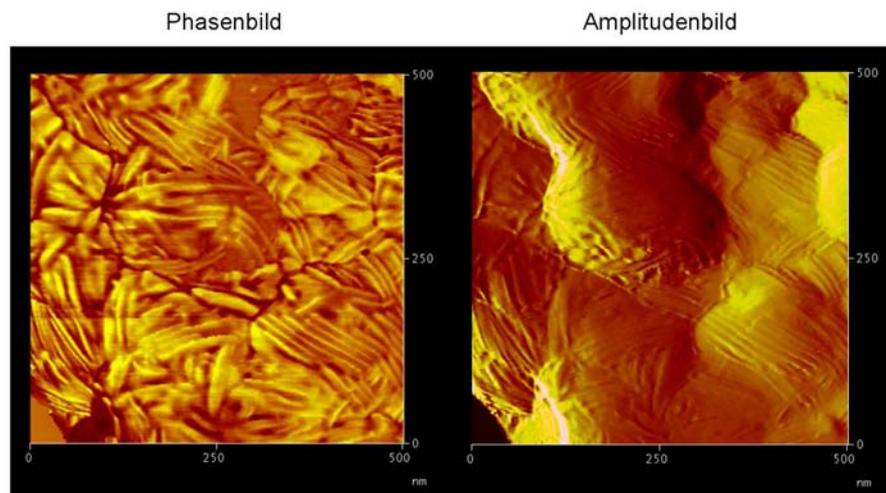


Abb. 3.36: AFM-Aufnahmen (Phase und Amplitude) der Konidiosporenoberfläche des $\Delta rodA$ -Stammes retransformiert mit *rodA* mit GPI-Anker

Sporen des Stammes (STT08) wurden geerntet und die Sporenoberfläche mittels AFM untersucht. Im Amplitudenbild sind die *rodlets* auf der Oberfläche der Konidiosporen zwar erkennbar, aber leider sehr schwach. Betrachtet man im Vergleich das Phasenbild, so sind die *rodlet*-Strukturen sehr auffällig. Da der ursprüngliche Stamm, in den das *rodA* mit GPI-Anker transformiert wurde, keine *rodlets* mehr auf der Oberfläche zeigte, ist dies der Nachweis, dass das an *rpf* fusionierte *rodA* mit GPI-Anker funktionell ist.

Betrachtet man die Oberfläche der Konidiosporen des $\Delta rodA$ -Stammes, in den das *rodA* mit GPI-Anker transformiert wurde, sind im Amplitudenbild (Abb. 3.36 rechts) *rodlet*-Strukturen erkennbar. Diese werden deutlicher, wenn man das Phasenbild (Abb. 3.36 links) betrachtet. Das bedeutet, dass nach der Retransformation des *rpf* fusionierten *rodA* mit GPI-Anker, die *rodlets* wieder detektierbar sind. Also ist das Konstrukt funktionell und kompensiert den Verlust der *rodlets*.

Dieselbe Frage stellt sich auch bei dem $\Delta rodA$ -Stamm, der mit dem verkürzten *rodA* (ohne GPI-Anker) retransformiert wurde. Der Verlust des letzten Cysteins bzw. der intramolekularen Disulfidbrücke hatte keine Auswirkungen auf die Lokalisierung auf der Oberfläche der Konidiosporen (Abb. 3.34). Eventuell hat die Verkürzung des *rodA*-Gens eine Veränderung der *rodlet*-Strukturen zur Folge. Es könnte auch zum Ausbleiben der *rodlets* führen, da die Selbstassemblierung von RodA durch die Verkürzung bzw. die möglicherweise veränderte 3D-Struktur beeinträchtigt ist.

Durch die Verkürzung des *rodA*-Gens ist zwar die Lokalisierung nicht beeinträchtigt, betrachtet man aber die AFM-Aufnahmen des $\Delta rodA$ -Stammes transformiert mit dem *rodA* ohne GPI-Anker, wird deutlich, dass die *rodlets* nicht so geordnet sind wie im Wildtyp (Abb. 3.1) oder bei der Retransformation des *rodA* mit GPI-Anker (Abb. 3.36). Die *rodlets* sind zwar detektierbar, es treten aber Bereiche auf, in den *rodlets* aus verschiedenen Richtungen ungeordnet aufeinander treffen (schwarze Pfeile, Abb. 3.37). Es sind auch Areale zu sehen in denen keine *rodlets* detektiert werden (weiße Pfeile, Abb. 3.37), was man in der Wildtypsituation nicht beobachten kann (Abb. 3.1 (C)). Dies bedeutet, dass durch den

Verlust des Cystein bzw. der intramolekularen Disulfidbrücke ein Defekt in der *rodlet*-Bildung vorliegt. Eventuell ist die Selbstassemblierung von RodA gestört.

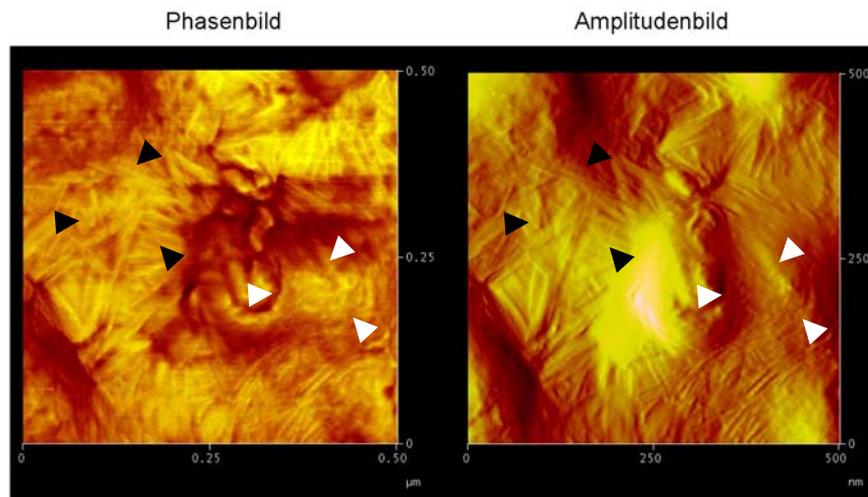


Abb. 3.37: AFM-Aufnahmen (Phase und Amplitude) der Konidiosporenoberfläche des $\Delta rodA$ -Stammes retransformiert mit dem verkürzten *rodA*

Konidiosporen des Stammes (STT09) wurden geerntet und die Sporenoberfläche mittels AFM untersucht. Im Amplitudenbild sind vereinzelt *rodlet*-Strukturen auf der Oberfläche der Konidiosporen des $\Delta rodA$ -Stammes, der mit dem *rodA* ohne GPI-Anker transformiert wurde, erkennbar. Die *rodlets* sind aber nicht so geordnet wie im Wildtyp. Betrachtet man das Phasenbild wird dies noch offensichtlicher. Man findet Bereiche, in denen *rodlets* aus verschiedenen Richtungen aufeinander treffen (schwarze Pfeile), und andere Areale, in denen keine *rodlets* detektierbar sind (weiße Pfeile).

3.5.2 Lokalisierung von DewB und DewC mit natürlichem Promotor mittels RFP

Um die Lokalisierung von DewB und DewC ebenfalls zu überprüfen, wurden auch hier Vektoren konstruiert. Es wurde der gleiche Ursprungsvektor wie in Kapitel 3.5.1 verwendet. Diese Vektoren enthalten, neben dem *ampicillin*-Resistenzgen, dem *pyr4*-Auxotropiemarker und dem *rfp*-Gen, den natürlichen Promotor des *rodA* und dessen Signalpeptid.

dewB (Abb. 3.38 (A)) und *dewC* (Abb. 3.38 (B)) wurden jeweils ohne SP amplifiziert. Die Vektoren wurden auch in den $\Delta rodA$ -Stamm transformiert und die Transformanten auf rote Fluoreszenz überprüft.

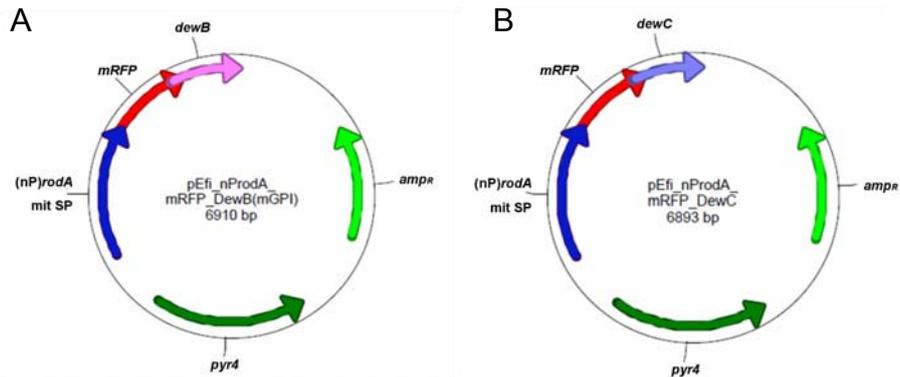


Abb. 3.38: Vektoren mit *dewB* und *dewC* fusioniert an mRFP für die Lokalisierung
 Beide Vektoren besitzen eine *Ampicillin*-Resistenz (hellgrüner Pfeil), ein *pyr4*-Marker gen (dunkelgrüner Pfeil), ein *mRFP*-Gen (681 bp, roter Pfeil) und den natürlichen Promotor von *rodA* mit dem Signalpeptid (1.056 bp, dunkelblauer Pfeil). (A) In diesem Vektor wurde *dewB* ohne SP (495 bp, rosa Pfeil) an den C-Terminus des *mRFP*-Gens fusioniert. (B) Dieser Vektor enthält *dewC* ohne SP (480 bp, hellblau Pfeil) statt *dewB*.

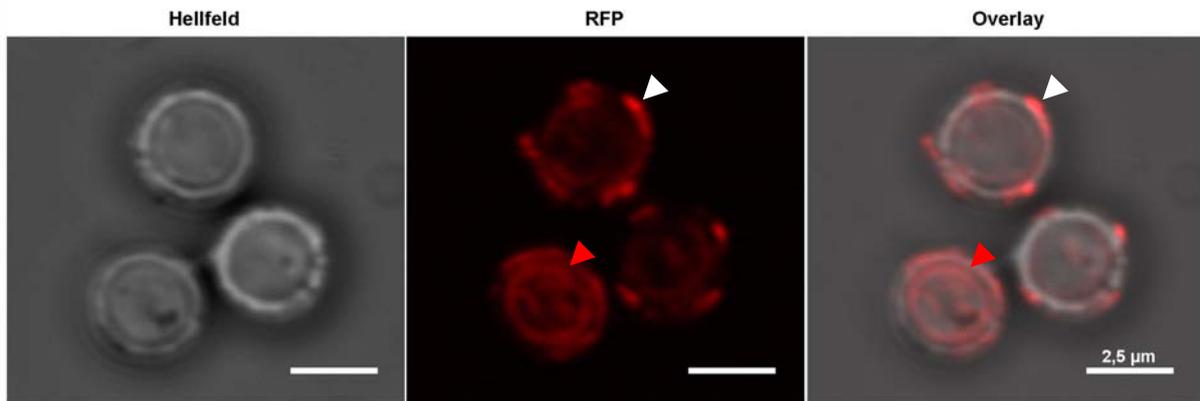


Abb. 3.39: Lokalisierung von DewB im $\Delta rodA$ -Stamm auf der Oberfläche der Konidiosporen
 Aufnahmen von Konidiosporen des Stammes STT10 mittels konfokaler Mikroskopie. Die Lokalisierung von *dewB* fusioniert an *rfp* ist auf der Oberfläche der Konidiosporen detektierbar, wobei sowohl in den Sporen (roter Pfeil), als auch in der Sporenwand (weißer Pfeil) vermehrt Akkumulationen auftreten.

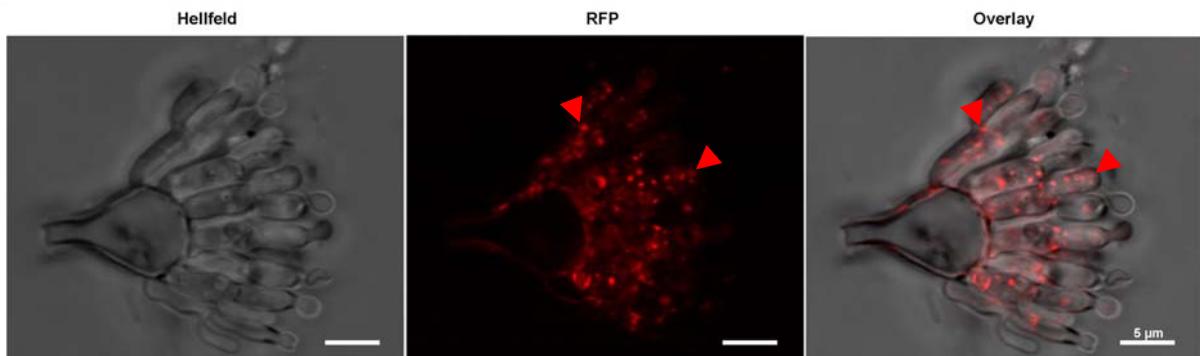


Abb. 3.40: Lokalisierung von DewB auf der Konidiophore
 Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von Konidiophoren des Stammes STT10. Exprimiert wird *dewB* fusioniert an *rfp*. Die Fluoreszenz ist deutlich in den Metulae und Phialiden sichtbar. Die Fluoreszenz scheint ebenfalls in den Wänden und im Zytoplasma punktuell zu akkumulieren (rote Pfeile).

Die Transformanten, die den Vektor mit *dewB* ohne Signalpeptid N-terminal fusioniert an *rfp* enthalten, zeigen deutlich das rote Fluoreszenzsignal auf der Oberfläche der Konidiosporen

(Abb. 3.39). Zusätzlich sind deutlich Akkumulationen sowohl in den Sporen (roter Pfeil) als auch in der Sporenwand (weißer Pfeil) erkennbar. Auch auf der Konidiophore ist deutlich erkennbar, dass durch die RFP-Fluoreszenz die Metulae und Phialiden detektiert werden. Dies entspricht den Beobachtungen, die schon mit GFP gemacht wurden (Abb. 3.27). Im Unterschied zu der GFP-Lokalisation sind hier allerdings Akkumulationen in der Zellwand und im Zytoplasma der Metulae und Phialiden erkennbar. Dies bedeutet, dass eine GPI-Modifikation keinen Einfluss auf die Lokalisierung von DewB hat. Ob der GPI-Anker für die Akkumulationen in der Zellwand verantwortlich ist, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

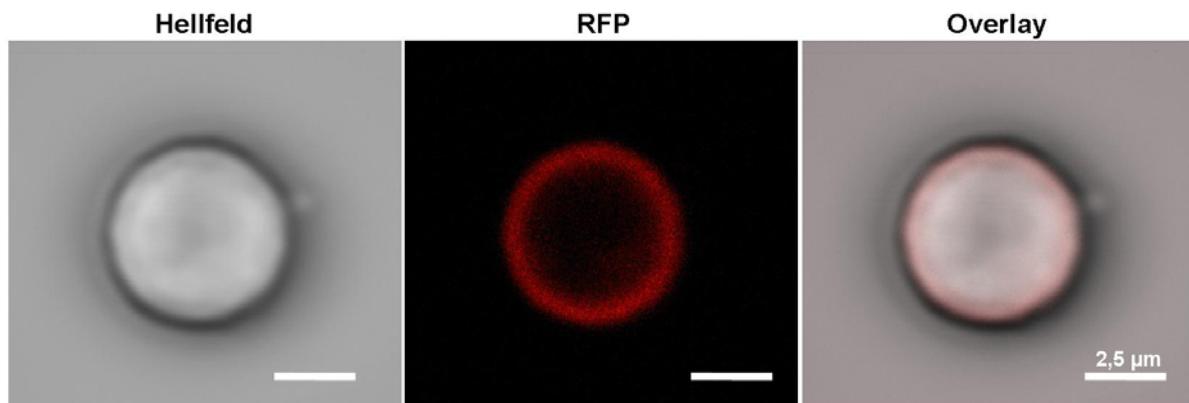


Abb. 3.41: Lokalisierung von DewC fusioniert an RFP

Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie von einer Konidiospore des Stammes STT11. Die Lokalisierung von DewC (ohne SP) ist mittels RFP-Fluoreszenz auf der Sporenoberfläche gezeigt. Es ist deutlich erkennbar, dass DewC in der Zellwand der Spore lokalisiert ist.

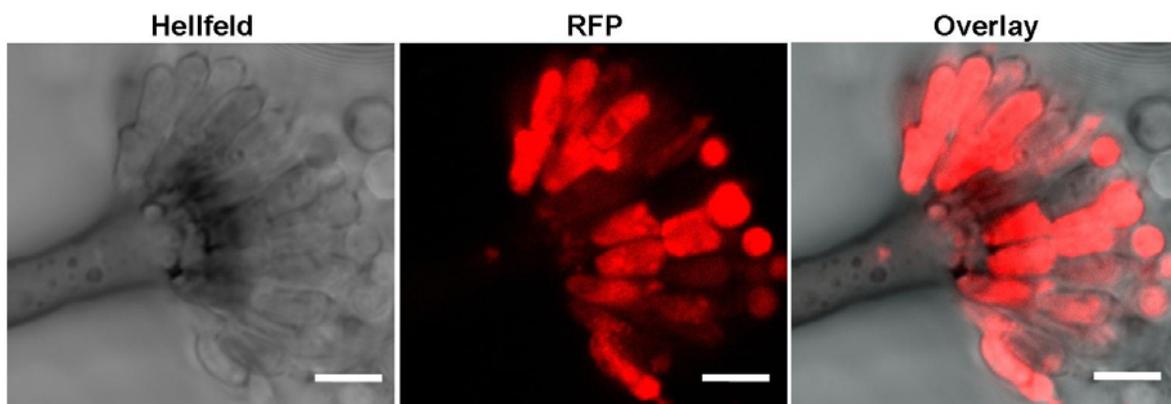


Abb. 3.42: Lokalisierung von DewC auf der Konidiophore

Aufnahme einer Konidiophore des Stammes STT11. Durch die Fusion des *dewC* ohne SP an das *rfp* ist eine eindeutige Fluoreszenz in den Metulae und Phialiden erkennbar. Die Fluoreszenz ist hier aber nicht auf die Zellwand beschränkt, sondern auch im Zytoplasma detektierbar.

Betrachtet man die Lokalisierung des DewC (ohne SP) auf der Sporenoberfläche des $\Delta rodA$ -Stammes, ist das Signal des RFP eindeutig in der Zellwand erkennbar (Abb. 3.41). Dies

konnte ebenfalls schon durch die GFP-Lokalisierung von DewC gezeigt werden (Abb. 3.28). Des Weiteren kann man ein deutliches Signal auf den Metulae und Phialiden erkennen (Abb. 3.42). Hier ist allerdings auch ein Signal im Zytoplasma erkennbar.

3.6 Expression der Hydrophobine in *Escherichia coli*

Um die Eigenschaften der Hydrophobine auch für industrielle Anwendungen nutzen zu können, wurde von der Firma *BASF* (Ludwigshafen) ausführlich an der Expression der Hydrophobine in *E. coli* geforscht. Es war nicht möglich, die Hydrophobine alleine in *E. coli* zu exprimieren, da sie sich wahrscheinlich in die Zellwand einlagern und diese so durchlöchern, was zum Absterben der Bakterien führt (persönliche Kommunikation mit Dr. Bollschweiler; *BASF*, Ludwigshafen). Es wurde dann aber ein geeignetes Fusionsprotein gefunden, welches es ermöglichte, die Hydrophobine in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies* = IB) in *E. coli* zu exprimieren und anschließend aufzureinigen (Wohlleben *et al.* 2010).

3.6.1 Expression von DewA in *E. coli*

Zur Expression von DewA wurden Vektoren von der Firma *BASF* zur Verfügung gestellt (Abb. 3.43; Wohlleben *et al.* 2009). Im ersten Schritt wurden in dieser Arbeit die optimalen Bedingungen für die Expression und Aufreinigung via Affinitätschromatographie untersucht. Für die Expression von DewA mit YaaD als Fusionsprotein wurden zuerst verschiedene Wachstumstemperaturen, von 25° C bis 37° C, getestet. Zusätzlich wurde unterschiedlich lange exprimiert und verschiedene Konzentrationen von IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid) zur Induktion des Expressionspromotors verwendet. Dabei konnte das beste Ergebnis nach Induktion mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG bei 37° C und einer Wachstumszeit von vier bis sechs Stunden erreicht werden.

Nach der Expression wurden die geernteten Zellen mittels *French Press* aufgeschlossen. Die Proteine wurden im Anschluss unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) mittels Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) Säulenmaterial im *batch*-Verfahren aufgereinigt.

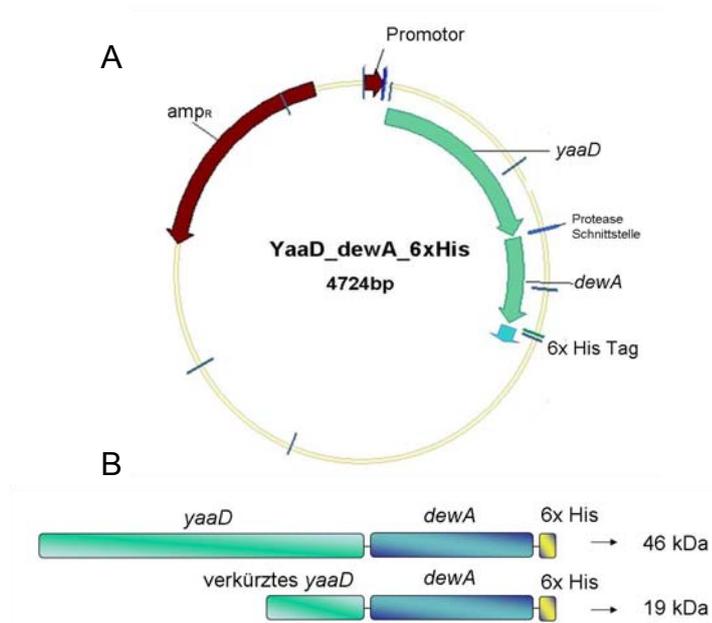


Abb. 3.43: Konstrukte zu Expression von DewA in *E. coli*

(A) Dieser Vektor wurde zur Expression von DewA in *E. coli* verwendet. Er enthält eine *ampicillin*-Resistenz (*amp_R*) und einen induzierbaren Promotor. N-terminal von *dewA* ist das Fusionsprotein *yaaD*, eine Synthase aus *Bacillus subtilis* und C-terminal ein 6x His-Tag fusioniert. Zwischen Fusionsprotein und *dewA* wurde eine Protease-Schnittstelle gesetzt. (B) Schematische Darstellung der beiden Expressionskonstrukte. Zusätzlich zu dem kompletten *yaaD* (fl = *full length*) fusioniert an *dewA*, existiert ein weiteres Konstrukt mit einer auf 40 As verkürzten Version von *yaaD* (sh = *short*). Nach Expression erhält man bei DewA mit dem YaaD fl ein ~ 46 kDa großes Fusionsprotein. Mit dem YaaD sh ist das Fusionsprotein ~ 19 kDa groß.

Die DewA-Expression mit dem auf 40 As verkürzten Fusionsprotein (YaaD sh) und die Aufreinigung nach dem Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) *batch*-Verfahren wurden auf SDS-Gel, welches mit Coomassie gefärbt wurde, und den dazugehörige *Western Blot* aufgetragen (Abb. 3.44). Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über eine ansteigende Konzentration an Imidazol und einen abnehmenden PH-Wert der Elutionspuffer. Auf das SDS-Gel wurden folgende Proben aufgetragen: der Rohextrakt (RE) nach Zellaufschluss durch die *French Press*, der Durchfluss durch die Säule (FT = engl.: *flow through*), der Waschschrift (W) und drei Elutionsschritte (E1, E2 und E3).

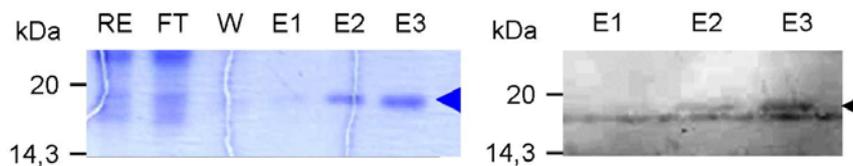


Abb. 3.44: Expression und Aufreinigung von DewA mittels des verkürzten Fusionsproteins in *E. coli* im Ni-NTA *batch*-Verfahren

Das Coomassie gefärbte SDS-Gel der Expression von DewA zusammen mit dem auf 40 As verkürzten YaaD-Fusionsprotein und der dazugehörigen *Western Blot*. DewA wurde nach Induktion der Expression durch 0,5 mM IPTG bei 37° C sechs Stunden exprimiert. Auf das SDS-Gel aufgetragen wurden Proben des Rohextraktes nach dem Aufschluss durch die *French Press* (RE), der Durchfluss nach dem Laden der Säule (FT = *flow through*), die aufgefangene Probe nach dem Waschen (W) und die ersten drei Elutionsschritte (E1 – E3). Im Elutionsschritt E2 und E3 ist die Proteinbande von DewA mit YaaD sh erkennbar (blauer Pfeil), die bei ~ 19 kDa liegt. Auch im *Western Blot* konnte die Proteinexpression via anti-His-Antikörper nachgewiesen werden (schwarzer Pfeil). Hierbei ist in Elutionsschritt E2 nur eine schwache Bande sichtbar. Im Elutionsschritt E3 ist die Detektion jedoch eindeutig.

Die Detektion des Fusionsproteins im *Western Blot* erfolgte über einen Antikörper, der gegen den 6x His-Tag gerichtet ist. In den Elutionsschritten E2 und E3 ist im gefärbten SDS-Gel

deutlich die erwartete Proteinbande bei ~ 19 kDa erkennbar (blauer Pfeil, Abb. 3.45). Im *Western Blot* konnte ebenfalls in den Elutionsschritten E2 und E3 das Protein via anti-His-Antikörper detektiert werden. In E2 ist eine schwache Bande erkennbar. In E3 ist die Deletion des Fusionsproteins allerdings sehr deutlich sichtbar (schwarzer Pfeil, Abb. 3.44). RodA kann ebenfalls in *E. coli* exprimiert werden, da hier aber die Ausbeute wesentlich geringer war als bei DewA, wurde dies nicht weiter verfolgt (persönliche Kommunikation mit Dr. Bollschweiler; *BASF*, Ludwigshafen). DewA kann für die Beschichtung von Oberflächen oder anderen industrielle Applikationen eingesetzt werden. Die *BASF* hat bereits verschiedenste Anwendungsbereiche getestet, z. B. den Einsatz als Emulgator (Wohlleben *et al.* 2010).

3.6.2 Expression von DewC in *E. coli*

Zur Expression eines der neuen Hydrophobine in *E. coli* wurde DewC gewählt. Es hat ähnlich wie DewA keinen prognostizierten GPI-Anker (Kapitel 3.3).

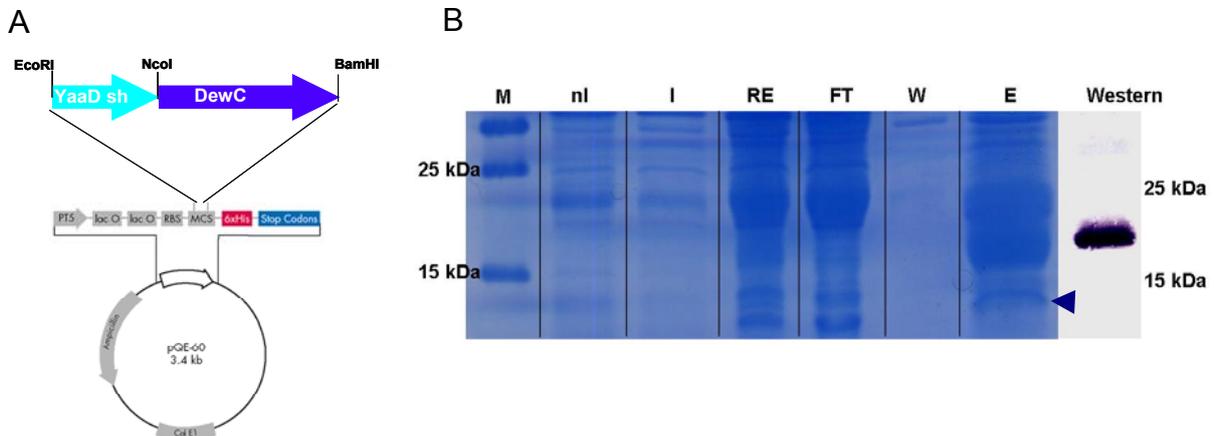


Abb. 3.45: Expression von DewC mittels des verkürzten Fusionsproteins in *E. coli*

(A) Vektor, der für die Expression verwendet wurde. (B) Die Expression und Aufreinigung von DewC mit dem auf 40 Aa verkürzten YaaD-Fusionsprotein durch Solubilisierung der IBs. Auf dem SDS-Gel sind folgende Proben aufgetragen: (nl = nicht induziert) Zellextrakt vor der Induktion, (I = induziert) Zellextrakt nach der Expression, (RE) Rohextraktes nach dem Aufschluss, (FT = *flow through*) Überstand nach dem Pelletieren, (W) ein Waschschritt und (E) die Elution nach Solubilisierung der Proteine aus den Einschlusskörperchen (IBs). Im Elutionsschritt sind außer der Bande für das DewC-Fusionsprotein bei ~ 20 kDa (blauer Pfeil) auch weitere Proteinbanden sichtbar. Dies hängt mit der unspezifischen Aufreinigungsmethode durch Solubilisierung der IBs zusammen. Eine deutliche Proteinbande von DewC mit YaaD sh bei ~ 20 kDa ist im *Western Blot* erkennbar. Die Proteinexpression wurde via anti-His-Antikörper nachgewiesen. Es ist nur die Elution gezeigt.

Sowohl *yaaD sh* als auch *dewC* wurde via PCR amplifiziert, wobei an den 5'-Enden der Primer jeweils Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden. Das verkürzte *yaaD*-Gen wurde über *EcoRI* und *NcoI* kloniert, das *dewC*-Gen über *NcoI* und *BamHI*. Das fertige

Expressionskonstrukt (Abb. 3.45 (A)) wurde dann in *E. coli* exprimiert. Die Expression wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und die Expression anschließend bei 37° C über Nacht durchgeführt.

Auf dem SDS-Gel (Abb. 3.45 (B)) wurden in den ersten beiden Spuren nach dem Marker die Zellextrakte vor und nach der Expression aufgetragen (nl = nicht induziert; I = induziert). Es folgen die Proben Rohextrakt (RE), Durchfluss (FT) und der Waschschrift (W). In der letzten Spur ist der Proteinextrakt nach Solubilisierung der IBs aufgetragen (E). Man kann deutlich die Bande für das DewC-Fusionsprotein bei ~ 20 kDa erkennen. Es sind aber auch weitere Proteinbanden sichtbar, die auf die unspezifische Aufreinigungsmethode zurückzuführen sind. Im *Western Blot*, in dem das DewC-Fusionsprotein mittels anti-His-Antikörper detektiert wurde, kann eindeutig die Bande bei ~ 20 kDa nachgewiesen werden. Das aufgereinigte Protein kann für die Beschichtung von Oberflächen und weiteren industriellen Anwendungen, wie DewA, eingesetzt werden.

3.6.3 Expression von eines Sequenz optimierten DewA in *E. coli*

Um die Eigenschaften der Hydrophobine weiter zu charakterisieren, wurde eine Sequenzoptimierung durchgeführt, die eine veränderte Version von DewA prognostiziert. Die Optimierung wurde durch Timo Strunk, einen der Kooperationspartnern im Rahmen des Forschungsprogramms „Biomaterialien“ der Landesstiftung Baden-Württemberg, durch Sequenzanalyse und Faltungsprognosen ermittelt. Die Sequenz von DewA wurde so verändert, dass sie fast ausschließlich aus hydrophoben Bereichen besteht.

DewA	PASAAKNAKLATSAFAKQAE ¹ GTTCNVGSIA-- ²³ CCNSPAETNND ³ SLLSGL	48
EAS	ATTIGPNTCSID ¹ DYKPY ² CCQS-----MSGP	25
DewA	LGA-GLLN---GLSGNTGSA ⁴ CAKASLIDQLGLLALVDHTEEGPV ⁵ CKNIV	93
EAS	AGSPGLLNLIPVDLSASLG-CV-----VGVI-----GSQCGASV	58
DewA	ACC ⁶⁷ PEGTT----- ⁸ NCVAVDNAGAGTKAE	116
EAS	KCKKDDVTNTGNSFLIINAANCVA	82

Abb. 3.46: Alignment zwischen DewA und EAS

Die rot hervorgehobenen Aminosäuren zeigen die Cysteine. Zwischen Cystein vier und fünf, sowie Cystein sieben und acht sind zwei große Lücken zu finden.

Begründet werden kann diese Mutation durch das vorher von Timo Strunk erstellte Templatmodell des Hydrophobin DewA. Zur Erstellung wurde ein motiverhaltenes *Alignment* zwischen Protein DewA und Protein EAS (Klasse I Hydrophobin aus *N. crassa*, Kwan *et al.* 2006) der Klasse I Hydrophobine erstellt (Abb. 3.46).

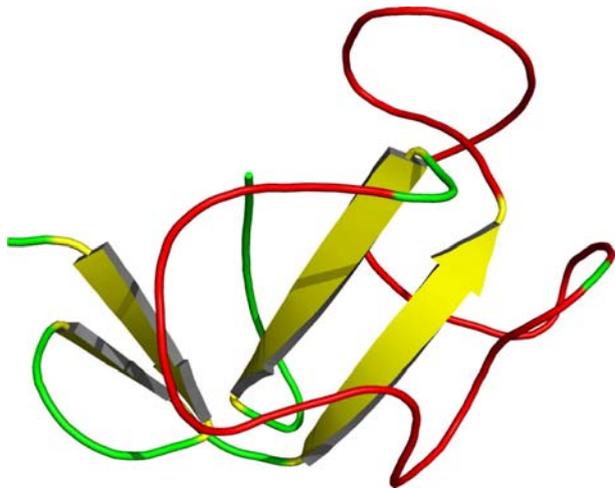


Abb. 3.47: Templatemodell von DewA
 Im Modell erkennt man neben den durch Disulfidbrücken stabilisierten β -barrel (β -Fasstruktur, gelb) auch zwei große, hauptsächlich hydrophobe Schleifen (rot).

Obwohl das Alignment mehrere Lücken enthält, kann durchaus von einem aussagekräftigen Templatemodell ausgegangen werden: Einerseits erkennt man die korrekte Paarung der Cysteine innerhalb des Alignments, andererseits fallen die größeren Lücken in die Bereiche in denen Protein EAS selbst nur unstrukturierte hydrophobe *Loops* besitzt und dementsprechend keine strukturellen Informationen kopiert werden können. Das resultierende Modell zeigt, wie erwartet, ein stabiles β -barrel (β -Fasstruktur) im Zentrum des Proteins, wie auch zwei unstrukturierte, hydrophobe Schleifen (Abb. 3.47)

Experimentelle Untersuchungen am Protein EAS konnten zeigen, dass eine Verkürzung der hydrophoben Schleifen keine strukturelle Änderung nach sich zieht (Kwan *et al.* 2008). Es wurde daher eine neue Sequenz von DewA vorgeschlagen, welche die Hydrophobizität der unstrukturierten *Loops* beibehält ohne die Schleifen so stark zu kürzen, dass ein Ausbilden der Tertiärstruktur unmöglich wird. Hierzu wurden sämtliche Aminosäuren aus den Schleifenregionen außer den Leucinen gelöscht (Abb. 3.48). Bestätigt werden konnte dieses Modell anhand einer weiteren templatebasierten Modellierung ausgehend vom bereits existierenden Modell (persönliche Kommunikation mit Timo Strunk).

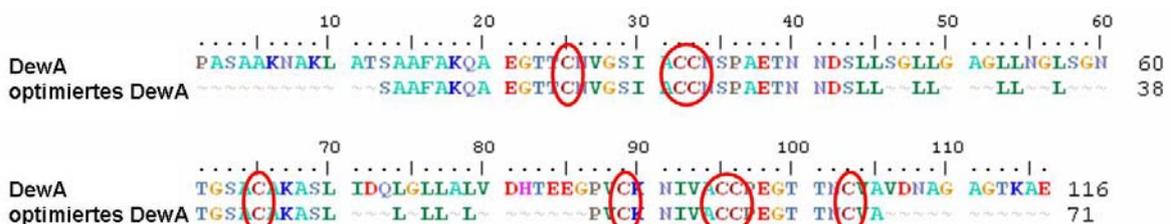


Abb. 3.48: Alignment von DewA mit dem synthetischen (Sequenz optimierten) DewA

In den Bereichen zwischen den Cysteinen drei/vier und vier/fünf wurden im optimierten DewA einige Aminosäuren entfernt, so dass zwei fast ausschließlich hydrophobe Schleifen (*loops*) übrig bleiben. Die Cysteine wurden durch rote Ellipsen hervorgehoben.

Das sequenzoptimierte DewA wurde im Anschluss von der Firma *GenScript* synthetisch hergestellt. Daher wird es in der weiteren Arbeit als synthetisches DewA bezeichnet. Bei der

Synthese wurden Restriktionsschnittstellen angehängt, so dass es in den Vektor, der das auf 40 As verkürzte YaaD-Fusionsprotein enthält, kloniert werden konnte. Das fertige Konstrukt wurde unter den gleichen Bedingungen wie DewC exprimiert und aufgereinigt.

Auf das Coomassie gefärbte SDS-Gel (Abb. 3.49) wurden die Proben nach der Expression und Aufreinigung des synthetischen DewA aufgetragen. In den zwei Spuren nach dem Marker sind die Zellextrakte vor der Induktion (nl = nicht induziert) und nach der Expression aufgetragen (I = induziert). Als nächstes wurden die Proben des Rohextraktes (RE), Durchflusses (FT) und des Waschschrilles aufgetragen. Die letzte Spur zeigt den Proteinextrakt nach Solubilisierung der IBs.

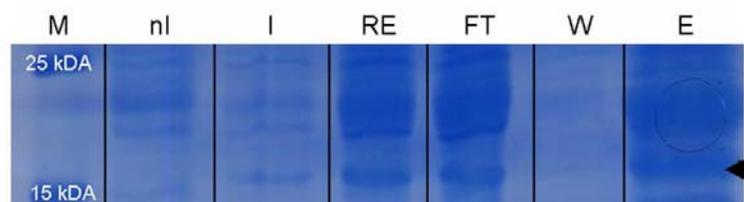


Abb. 3.49: Expression des synthetischen DewA in *E. coli*

Das Coomassie gefärbte SDS-Gel der Expression des synthetischen DewA zusammen mit dem auf 40 As verkürzten YaaD-Fusionsprotein. Auf dem abgebildeten SDS-Gel sind die Proben, die bei der Expression und Aufreinigung des synthetischen DewA entnommen wurden, aufgetragen. Zellextrakt vor der Induktion (nl = nicht induziert), Zellextrakt nach der Expression (I = induziert), Rohextraktes nach dem Aufschluss (RE), Überstand nach dem Pelletieren (FT), ein Waschschritt (W) und die Elution (E) nach Solubilisierung der Proteine aus den IBs. Im Elutionsschritt ist bei ~ 16 kDa die Bande des YaaD sh-Fusionsproteins mit dem synthetischen DewA erkennbar (Pfeil). Die weiteren Proteinbanden sind hier auch auf die unspezifische Aufreinigungsmethode durch die Solubilisierung der IBs zurückzuführen.

Die Proteinbande für das exprimierte YaaD sh-Fusionsprotein mit dem synthetischen DewA ist bei ~ 16 kDa sichtbar (Pfeil). Die weiteren Proteinbanden sind auf die unspezifische Aufreinigungsmethode durch die Solubilisierung der IBs zurückzuführen. Um nun den Einfluss der Sequenzoptimierung auf die Eigenschaften von DewA überprüfen zu können, sollten nun vergleichende Versuche zur Beschichtung von Oberflächen und Kontaktwinkelmessungen durchgeführt werden. Eine weitere industrielle Anwendung, wie bei dem unveränderten DewA, ist im Weiteren nicht auszuschließen.

3.6.4 Expression von funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen in *E. coli*

In Rahmen des Forschungsprogramms „Biomaterialien“ der Landesstiftung Baden-Württemberg, sollten durch die Veränderung der Beschaffenheit von Oberflächen durch Beschichtung die Adhärenz von mesenchymalen Stammzellen auf diesen Oberflächen verbessert werden. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene funktionelle Peptide ausgewählt, die in der Adhäsion von Zellen eine wichtige Rolle spielen.

Zum einen wurde das RGD-Peptid verwendet (Abb. 3.50 (A), (C), (D)). Dieses kommt besonders in Proteinen der Extrazellulären Matrix (ECM) vor, beispielsweise im Fibronectin. Zellen können mit Hilfe von Rezeptoren, den Integrinen daran binden. Das RGD dient also zur mechanischen Verankerung von Zellen (Ruoslahti & Pierschbacher, 1986; Scholtmeijer *et al.* 2002). Zum anderen wurde die globuläre Domäne 3 aus der $\alpha 3$ Seitenkette des humanen Laminins-5 verwendet, abgekürzt LG3 (Abb. 3.50 (B) und (E)). Diese Domäne spielt ebenfalls eine Rolle in der Zelladäsion und der Bindung zum $\alpha 3\beta 1$ Integrin (Kim *et al.* 2005). Die Peptide wurden an den N-Terminus des YaaD-Fusionsproteins (fl oder sh) fusioniert, da es bei der Beschichtung der Oberflächen mit den Hydrophobinen exponiert ist und daher die Peptide so für die Adhäsion der Zellen besser zugänglich sind.

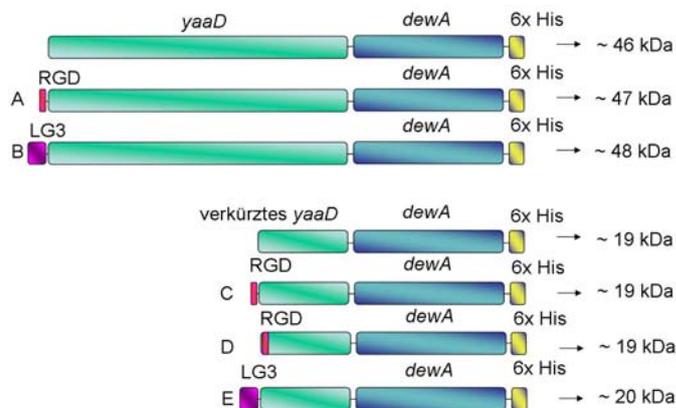


Abb. 3.50: Schema der Expressionskonstrukte mit den funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen

Schematische Darstellung der einzelnen Expressionskonstrukte. Jeweils ganz oben ist das Ausgangskonstrukt mit dem YaaD-Fusionsprotein (komplett oder verkürzt, grün), dem DewA (blau) und dem 6x His-Tag (gelb). (A) Konstrukt mit dem RGD-Peptid (rot) am N-Terminus des YaaD-Fusionsproteins, vor dem ATG. (B) An der Stelle des RDG sitzt das LG3-Peptid (violett). (C) Hier wurde das RGD-Peptid (rot) an den N-Terminus des verkürzten YaaD-Fusionsproteins und zwar vor dessen ATG, ligiert. (D) In diesem Konstrukt wurde mittels Insertion von einzelnen Nukleotiden das RGD-Peptid (rot) hinter das ATG des verkürzten YaaD-Fusionsproteins gesetzt. (E) Hier wurde (wie in C) das LG3-Peptid (violett) an den N-Terminus des verkürzten YaaD-Fusionsproteins vor das ATG fusioniert. Die erwartete Größe der Konstrukte ist hinten angegeben.

3.6.4.1 Lokalisation der Bindemotive LG3 und RGD in Bezug auf das Fusionsprotein

Für das verwendete Fusionsprotein YaaD existiert eine experimentelle Struktur (PDB-Datenbank ID: 2nv2). Innerhalb dieser Proteinstruktur findet sich ebenfalls ein β -barrel, welches in diesem Fall allerdings von α -Helizes umschlossen ist (Abb. 3.51). Außerdem erkennt man in der Sequenz zwei Cysteine, welche allerdings so weit innerhalb der barrel-Struktur integriert sind, dass eine Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Hydrophobin und Fusionsprotein unwahrscheinlich ist. Im Gegenteil zum Hydrophobin weist das Fusionsprotein keine großen erreichbaren hydrophoben Bereiche auf der Oberfläche auf.

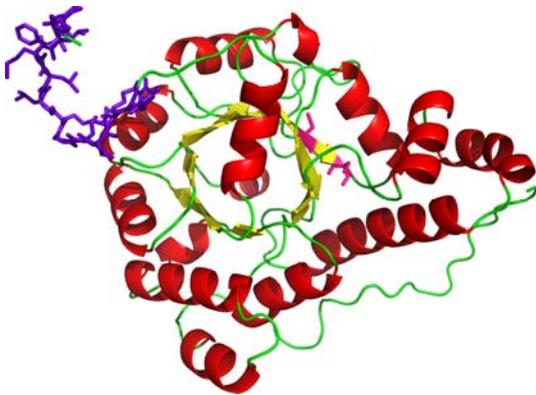


Abb. 3.51: Zusammengesetztes Modell zwischen YaaD-DewA-Fusionsprotein und LG3-Peptid

Im Zentrum des YaaD-Fusionsproteins (rot, gelb, grün) findet sich ein vollständig ausgebautes β -barrel (gelb) umgeben von Helizes (rot). Ungepaarte Cysteine liegen zentral und somit nicht erreichbar für das DewA (magenta). In Simulationen konnte das LG3-Peptid (lila) nicht in die Struktur des Fusionsproteins integriert werden und bleibt somit nach Außen exponiert.

Mittels templatebasierter Modellierung wurden nun Modelle der Komplexe von Fusionsprotein und verschiedenen Bindemotiven erstellt. Exemplarisch für das LG3-Peptid dargestellt (Abb. 3.51). Man erkennt, dass die fusionierten Peptide hauptsächlich vom Fusionskomplex nach außen abstehen (persönliche Kommunikation mit Timo Strunk). Anhand von randomisierten Simulationen wurden nun verschiedene Möglichkeiten der Anordnung des Bindungspeptids auf der Oberfläche des Fusionsproteins erprobt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass keine Anordnung, in welcher das Bindungspeptid in das Fusionsprotein integriert ist, favorisiert wird. Für das vollständige Fusionsprotein (YaaD fl) bleiben die Bindungsmotive dementsprechend exponiert.

Für das kurze Fusionsprotein kann keine derartig eindeutige Aussage getroffen werden. Erneute templatebasierte Modellierungen des isolierten Fusionsproteins, wie auch den zusammengefügteten Fusions-Bindungspeptidkomplexen zeigten für das Fusionspeptid hauptsächlich ein ungefaltetes Zwei-Helix-Motiv. Innerhalb von Simulationen konnte die stabile, native Konformation dieses Komplexes nicht ermittelt werden. Auch ist nicht ersichtlich, ob sich eine stabile Konformation einstellt (Abb. 3.52, persönliche Kommunikation mit Timo Strunk).

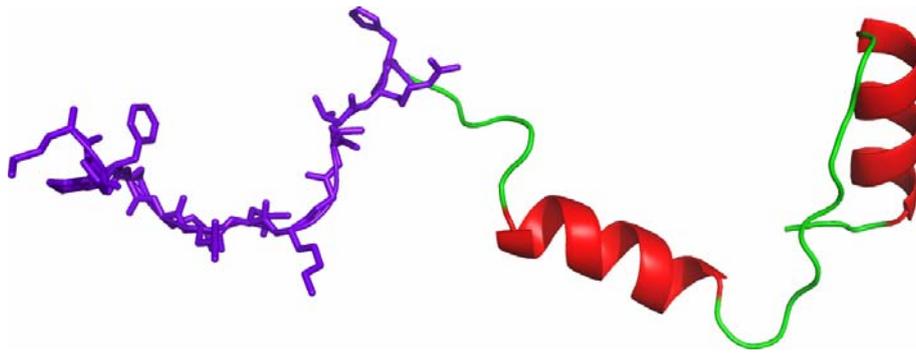


Abb. 3.52: Templatebasierte Modellierung des gekürzten Fusionsproteins samt LG3-Bindungspeptid
In der dargestellten Form ist das Protein nicht stabil; dementsprechend kann nicht eindeutig vorhergesagt werden, ob das Bindungspeptid exponiert ist oder das Protein eine vollständig andere Tertiärstruktur einnimmt. Dargestellt sind das LG3-Peptid (lila) und das verkürzte YaaD (rot, grün).

3.6.4.2 Überprüfung des Expressionsbeginns via *Dot Blot*-Analyse

Um zu testen, ob die Peptide-Hydrophobin-Konstrukte (Abb. 3.50) exprimiert werden, wurde die Expression im kleinen Maßstab durchgeführt und anschließend zur Kontrolle der Expression ein *Dot Blot* durchgeführt. Die Detektion der Peptid-Hydrophobin-Fusionsprotein-Expression wird, ebenso wie bei der DewA, in der unlöslichen Fraktion erwartet. Der Nachweis der Expression des LG3-Hydrophobin-Fusionsproteins (Abb. 3.53) wurde mittels anti-His-Antikörper durchgeführt.

Die oberen „Dots“ zeigen die Expression von LG3 fusioniert an YaaD fl. Unten wurden die Proben der LG3 YaaD sh Expression aufgetragen. In der ersten Reihe sind die Proben vor der Induktion der Expression durch IPTG aufgetragen (nl). Diese Probe wird untersucht, um zu zeigen, dass die Expression von der Induktion abhängt und nicht schon vorher beginnt. Während der Expression wurden nach zwei, vier und sechs Stunden Proben entnommen, diese via Ultraschall aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert. Die Proben wurden in Pellet (unlösliche Proteine) und Überstand (lösliche Proteine) aufgeteilt. Die Expression von LG3 YaaD fl ist im *Dot Blot* (Abb. 3.53) nach vier bzw. sechs Stunden in der unlöslichen Fraktion detektierbar. Die Expression von LG3 YaaD sh zeigt nach zwei Stunden schon ein schwaches Signal. Die Detektion der Expression ist hier aber ebenfalls nach vier bzw. sechs Stunden eindeutig.

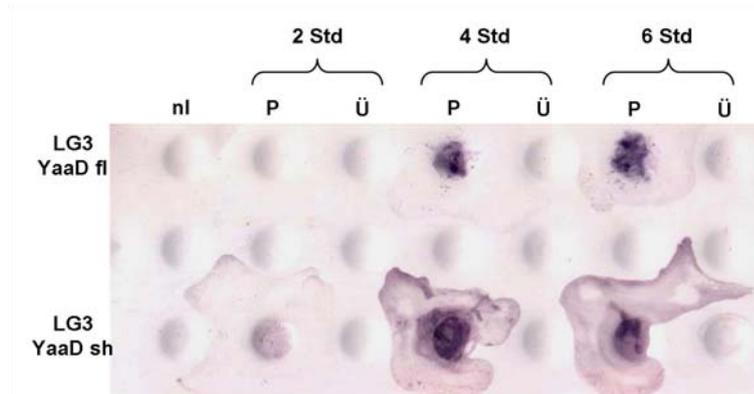


Abb. 3.53: Kontrolle der Expression LG3 mittels Dot Blot-Analyse

Bei der Expression von LG3-YaaDsh-DewA wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen, in den *Dot Blot* eingesetzt und mittels Antikörper gegen das 6x His-Tag detektiert. Die oberen „Dots“ zeigen die Expression von LG3 fusioniert an das komplette YaaD (fl). Die unteren detektieren die Expression von LG3 fusioniert an das verkürzte YaaD (sh). In der ersten Reihe ist der Zellextrakt vor der Induktion (nl = nicht induziert) aufgetragen. Anschließend wurden Proben nach zwei, vier und sechs Stunden Proteinexpression entnommen. Mittels Ultraschall wurden die Proben aufgeschlossen, abzentrifugiert und in Pellet (P) und Überstand (Ü) aufgeteilt. Im Pellet sind die unlöslichen Proteine zu finden, im Überstand befinden sich die löslichen Proteine. Bei LG3 YaaD fl ist ein deutliches Signal nach vier und sechs Stunden Expression in der Pellet-Fraktion detektierbar. Bei den Proben der LG3 YaaD sh-Expression kann man schon nach zwei Stunden eine schwache Expression in der unlöslichen Fraktion detektieren. Das Signal nach vier- bzw. sechsständiger Expression ist wesentlich deutlicher.

3.6.4.3 Expression und Aufreinigung der RGD-Hydrophobin-Fusionsproteine

Nach den Expressionstests wurden die Konstrukte im großen Maßstab exprimiert und anschließend durch Solubilisierung der IBs die Proteine aufgereinigt. Die Expression wurde, wie auch bei der Expression im kleinen Maßstab, mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach sechs Stunden wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet und die Proteine gewonnen.

In den vier Elutionsschritten, die auf dem Coomassie gefärbten SDS-Gel aufgetragen wurden, ist deutlich die erwartete Proteinbande des RGD-YaaD(fl)-Fusionsproteins bei ~ 47 kDa erkennbar (Abb. 3.54). Dabei wird deutlich, dass beim letzten Elutionsschritt das meiste Protein gewonnen wurde. Das Protein wurde im Anschluss gefriergetrocknet und könnte dann für Beschichtungsversuche eingesetzt werden.

Auch bei der Expression und Aufreinigung des RGD-Peptides fusioniert an das verkürzte YaaD (sh) ist deutlich in allen Elutionsschritten, vor allem aber in den Fraktionen drei und vier, die Proteinbande bei der Größe von etwa 19 kDa erkennbar (Abb. 3.55, Pfeil). In den letzten beiden Elutionsschritten konnte also am meisten Protein gewonnen werden. Die Proteinfractionen wurden vereinigt, gefriergetrocknet und für weitere Versuche eingesetzt.

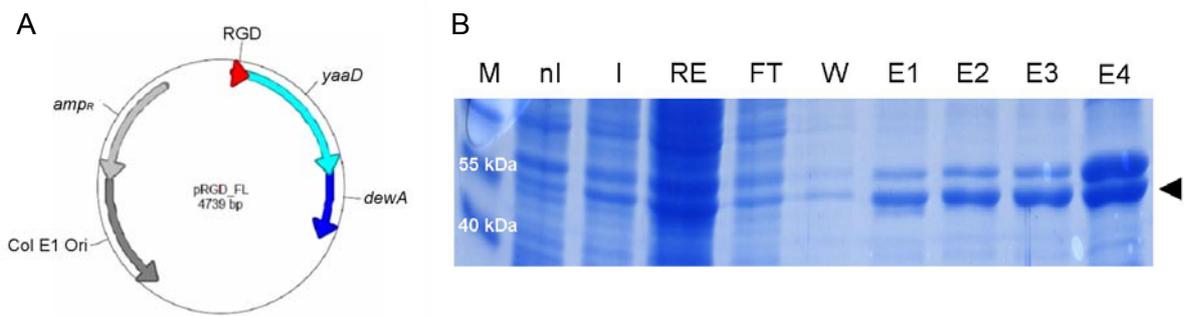


Abb. 3.54: Expression des RGD-Peptids fusioniert an das YaaD fl-Fusionsprotein

(A) Vektor, der für die Expression von RGD-YaaDfl-DewA verwendet wurde. (B) Das Coomassie gefärbte SDS-Gel mit den Proben der Expression und Aufreinigung von RGD-YaaDfl-DewA. Folgende Proben wurden bei der Expression und Aufreinigung entnommen und aufgetragen: Zellextrakt vor der Induktion (nl = nicht induziert), Zellextrakt nach sechsstündiger Expression (I = induziert), Rohextrakt nach dem Aufschluss (RE), Überstand nach dem Pelletieren (FT), ein Waschschritt (W) und die Elutionsschritte (E1 – E4) nach Solubilisierung der Proteine. In den Elutionsschritten ist, wie erwartet, bei ~ 47 kDa die Bande des RGD-YaaD(fl)-Fusionsproteins erkennbar (Pfeil).

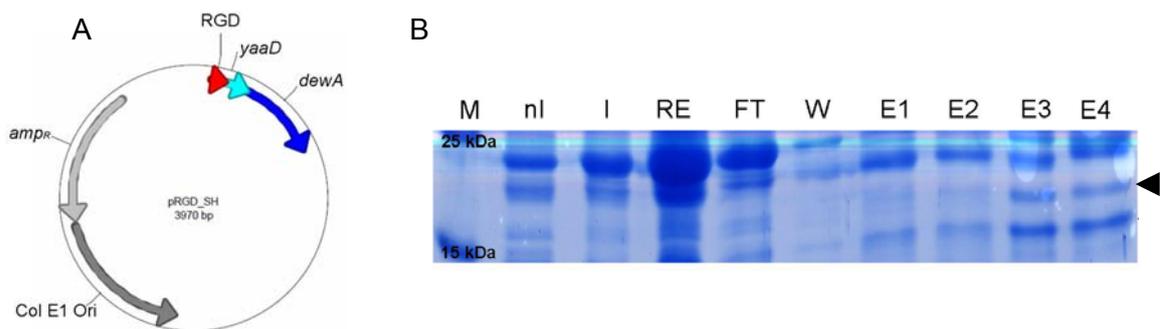


Abb. 3.55: Expression des RGD-Peptids fusioniert an YaaD sh

(A) Verwendeter Vektor für die Expression von RGD-YaaDsh-DewA. (B) Das Coomassie gefärbte SDS-Gel, auf welches folgende Proben nach Expression und Aufreinigung RGD-YaaDsh-DewA aufgetragen wurden: Zellextrakt vor der Induktion (nl = nicht induziert), Zellextrakt nach sechsstündiger Expression (I = induziert), Rohextrakt nach dem Aufschluss (RE), Überstand nach dem Pelletieren (FT), ein Waschschritt (W) und die Elutionsschritte (E1 – E4) nach Solubilisierung der Proteine. In den Elutionsschritten E1 - E4 ist, wie erwartet, eine Bande bei ~ 19 kDa erkennbar (Pfeil), am meisten jedoch in E3 und E4.

Wie auch schon bei den beiden vorangegangenen Konstrukten wurde der Vektor mit dem RGD, welches hinter das Start-Codon des verkürzten YaaD-Fusionsprotein eingefügt wurde (Abb. 3.56), sechs Stunden nach Induktion mit 0,5 mM IPTG exprimiert. Da die Insertion des RGD über die Mutagenese des Vektors statt fand, wird dieses Konstrukt als mutRGD (für mutiertes RGD) bezeichnet. Die Proteinbande des exprimierten und aufgereinigten mutRGD-Fusionsproteins liegt bei ca. 19 kDa und ist insbesondere in der dritten Elution erkennbar. Alle anderen Elutionsfraktionen zeigen aber ebenfalls eine leichte Proteinbande (Abb. 3.56, Pfeil). Die gezeigten Proteinfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet

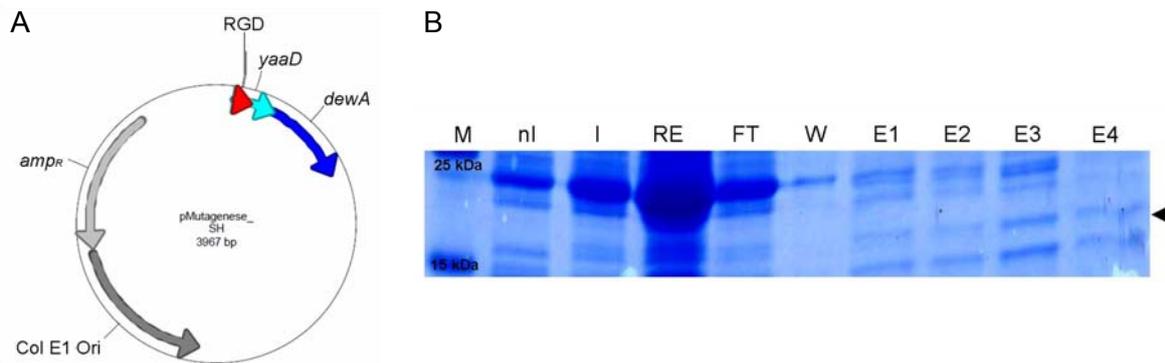


Abb. 3.56: Expression des hinter dem Start-Codon von YaaD sh eingefügte RGD-Peptid-Fusionsproteins (mutRGD)

(A) Vektor für die Expression von mutRGD-YaaDsh-DewA (B) Das Coomassie gefärbte SDS-Gel mit den Proben aus der Expression und Aufreinigung von mutRGD-YaaDsh-DewA. Aufgetragen wurden: Zellextrakt vor der Induktion (nl = nicht induziert), Zellextrakt nach sechsstündiger Expression (I = induziert), Rohextrakt nach dem Aufschluss (RE), Überstand nach dem Pelletieren (FT), ein Waschschritt (W) und die Elutionsschritte (E1 – E4) nach Solubilisierung der Proteine. In den Elutionsfraktionen ist die Bande bei ~ 19 kDa erkennbar (Pfeil).

3.6.4.4 Expression und Aufreinigung der LG3-Hydrophobin-Fusionsproteine

Die Konstrukte, die anstelle des RGD- das LG3-Peptid enthalten, wurden ebenfalls im großen Maßstab unter den gleichen Bedingungen exprimiert und die Proteine mittels Solubilisierung der IBs gewonnen.

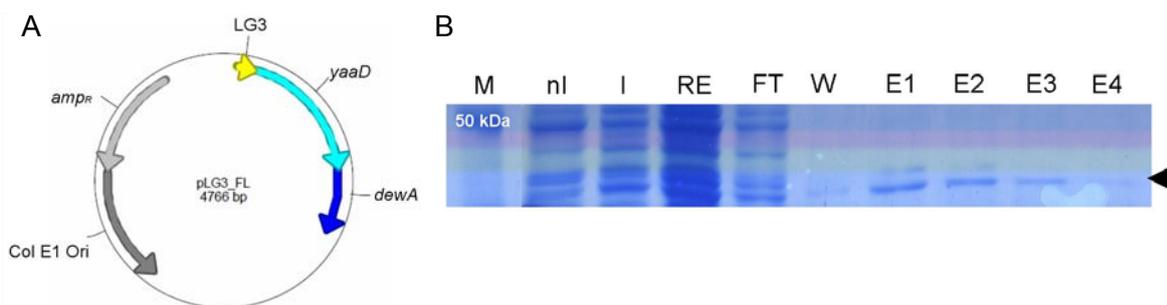


Abb. 3.57: Expression des LG3-Peptids fusioniert an YaaD fl

(A) Abbildung des für die Expression von LG3-YaaDfl-DewA verwendeten Vektors. (B) Auf das Coomassie gefärbte SDS-Gel wurden folgende Proben der Expression und Aufreinigung von LG3-YaaDfl-DewA aufgetragen: Zellextrakt vor der Induktion (nl = nicht induziert), Zellextrakt nach sechsstündiger Expression (I = induziert), Rohextrakt nach dem Aufschluss (RE), Überstand nach dem Pelletieren (FT), ein Waschschritt (W) und die Elutionsschritte (E1 – E4) nach Solubilisierung der Proteine. In allen Elutionsfraktionen ist die Bande bei ~ 48 kDa erkennbar (Pfeil), wobei die Intensität von Elutionsschritt eins nach vier abnimmt.

Im Coomassie gefärbte SDS-Gel ist in den Elutionen die erwartete Bande bei ~ 48 kDa erkennbar (Abb. 3.57 (B)). Diese Bande detektiert das aufgereinigte LG3-Peptid fusioniert an YaaD (fl). Die Stärke der Bande nimmt von Elution eins bis vier ab. Das gewonnene Protein

wurde im Anschluss gefriergetrocknet und könnte dann für Beschichtungsversuche eingesetzt werden.

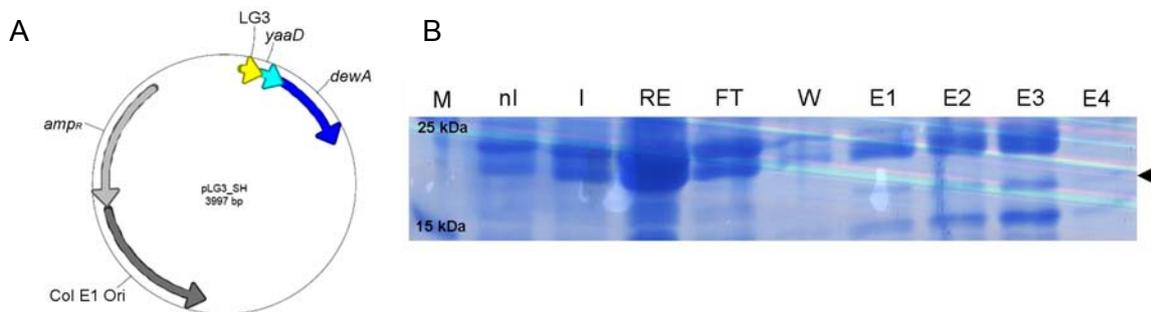


Abb. 3.58: Expression des LG3-Peptids fusioniert an das verkürzte YaaD (sh)

(A) Der Vektor, welcher für die Expression von LG3-YaaDsh-DewA verwendete wurde. (B) Die Proben, welche die der Expression und Aufreinigung des LG3-Peptids fusioniert an das verkürzte YaaD (sh) gewonnen wurden sind hier gezeigt. Folgende Proben wurden aufgetragen: Zellextrakt vor der Induktion (nl = nicht induziert), Zellextrakt nach sechsstündiger Expression (I = induziert), Rohextrakt nach dem Aufschluss (RE), Überstand nach dem Pelletieren (FT), ein Waschschrift (W) und die Elutionschritte (E1 - E4) nach Solubilisierung der Proteine. Die erwartete Proteinbande bei ~ 20 kDa ist in allen Elutionsfraktionen, am stärksten aber in Fraktion E3, erkennbar (Pfeil).

Das exprimierte und aufgereinigte LG3-Fusionsprotein mit YaaD sh ist in den Elutionsfraktionen im gefärbten SDS-Gel (Abb. 3.58 (B)) gezeigt. Die Bande ist wie erwartet bei ~ 20 kDa erkennbar. Die Bande detektiert das aufgereinigte LG3-Peptid fusioniert an YaaD (sh). Die Bande des aufgereinigten Proteins ist im dritten Elutionsschritt (E3) am stärksten. Das gewonnene Protein wurde im Anschluss gefriergetrocknet und kann für Beschichtungsversuche eingesetzt werden.

3.6.5 Adhäsion und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen auf Hydrophobin beschichteten Oberflächen

Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, dienen die aufgereinigten Proteine der Oberflächenbeschichtung. Bei Fusion des funktionellen Peptides soll der Einfluss der Adhäsion und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) getestet werden. Diese Versuche wurden von Dr. Stephane Boeuf aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Richter (Kooperationspartner in Rahmen des Forschungsprogramms „Biomaterialien“ der Landesstiftung Baden-Württemberg) im *Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie* (Heidelberg) durchgeführt.

Bei den beschichteten Oberflächen handelt es sich um Zellkulturschalen. Zur Beschichtung wurde zum einen das exprimierte DewA fusioniert an das verkürzte YaaD (blau) verwendet. Zum anderen das RGD-Peptid fusioniert an das DewA mit verkürztem YaaD (lila) und das

LG3-Peptid fusioniert an das DewA mit verkürztem YaaD (weiß) (Abb. 3.59). Als Kontrollen wurden die unbeschichteten Zellkulturschalen (haben BSA auf der Oberfläche) und Zellkulturschalen beschichtet mit Fibronectin verwendet (orange). Fibronectin ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und für die Adhäsion vieler Zellen verantwortlich (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984).

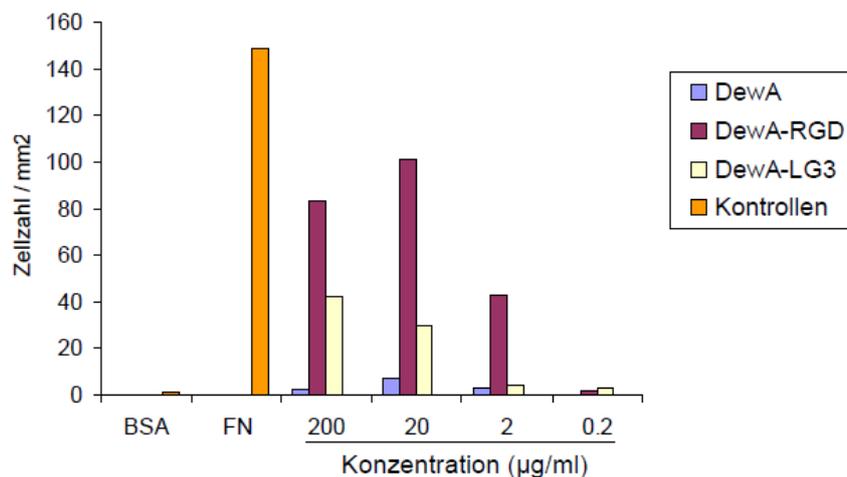


Abb. 3.59: Osteogenese von MSC auf Hydrophobin-beschichteten Oberflächen

Untersuchung der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC) auf Hydrophobin-beschichteten Oberflächen. Zellkulturschalen (24 Well) wurden mit Fibronectin (Positivkontrolle) und den Hydrophobinen DewA mit verkürztem YaaD (blau), RGD mit YaaD sh (DewA-RGD, lila) und LG3 mit YaaD sh (weiß) beschichtet, bzw. nicht beschichtet (Kontrolle). Die MSC wurden ausgesät und drei Wochen in osteogenem Medium kultiviert. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde in Zelllysaten spektrophotometrisch bestimmt.

Das Experiment zeigt, dass die MSC am besten auf Fibronectin adhären, dies ist nicht verwunderlich, da wie schon erwähnt Fibronectin für die Adhäsion vieler Zellen verantwortlich ist. Das Diagramm zeigt auch, dass die MSC auf dem RGD-Fusionspeptid (fusioniert an YaaD sh mit DewA, lila Balken) ebenfalls adhären. Die beste Adhäsion zeigt sich, wenn zur Oberflächenbeschichtung eine Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt wurde. Auch auf dem LG3-Fusionspeptid (fusioniert an YaaD sh mit DewA, weiße Balken) zeigen die MSC eine leichte Adhäsion. Dies deutet, dass die Peptide in den *in vitro*-Versuchen vergleichbare Ergebnisse zu den ähnlichen Experimenten mit SC3 zeigen (Scholtmeijer *et al.* 2002).

4 Diskussion

4.1 Die vier Hydrophobine in *A. nidulans*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei bisher unbekannte Hydrophobine untersucht, welche die Namen *dewB* und *dewC* bekamen und im Genom von *A. nidulans* gefunden wurden. Alle vier Hydrophobine, die beiden neuen und die beiden bisher bekannten Hydrophobine, *rodA* und *dewA*, zeigen die typischen acht Cysteine, welche für die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken verantwortlich sind und können aufgrund ihrer Länge zu den Klasse I Hydrophobinen gezählt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Hydrophobine charakterisiert, um sie und ihre besonderen Eigenschaften besser zu verstehen.

4.1.1 RodA ist verantwortlich für die *rodlet*-Bildung - welche Rolle spielt dabei eine mutmaßliche Glykosylierung?

Die *rodlet*-Schicht auf der Oberfläche von Pilzen hat viele Funktionen. Sie verleiht der Oberfläche, die der Luft ausgesetzt ist, ihre Hydrophobizität (Wösten *et al.* 1994) und ermöglicht es Pilzen einer wässrigen Umgebung zu entkommen (Wösten *et al.* 1999).

Durch AFM-Aufnahmen der Sporenoberflächen der verschiedenen Hydrophobin-Deletionsmutanten in *A. nidulans* (Kapitel 3.1) wurde deutlich, dass nur ein Fehlen des RodA-Proteins zu einem Verlust der *rodlet*-Schicht auf der Sporenoberfläche führte. Eine Besonderheit ist, dass bei den Einzeldelationen der anderen Hydrophobine die *rodlet*-Schicht noch vorhanden war. Die drei Hydrophobine DewA, DewB und DewC sitzen zwar auch auf der Sporenoberfläche, aber ihr Verlust hat nur eine Verringerung der Hydrophobizität zur Folge. Dies bedeutet, dass RodA das wichtigste Hydrophobin in *A. nidulans* ist (ähnlich wie z. B. HCf-1 aus *C. fulvum*; Lacroix & Spanu, 2009) und die weiteren Hydrophobine nur eine untergeordnete, unterstützende Rolle spielen.

Auch in anderen Pilzen konnte durch Deletion von Hydrophobingen ein Phänotyp ohne *rodlets* generiert werden. Dies wurde beispielsweise bei der *eas*-Mutante in *N. crassa* (Beever & Dempsey, 1978), der *mpg1*-Mutante in *M. grisea* (Talbot *et al.* 1996) oder der *rodA_{AF}*-Mutante in *A. fumigatus* beobachtet (Chang & Timberlake, 1993).

Die *A. fumigatus* RodA_{AF}-Proteinsequenz hat 85% Ähnlichkeit mit der des *A. nidulans*. Den Δ rodA_{AF}-Mutanten fehlt ebenfalls die *rodlet*-Schicht auf den Konidien, außerdem ist die

Oberfläche hydrophil. RodA_{Af} spielt eine wichtige Rolle in der Verbreitungseffizienz der Konidien über die Luft (Thau *et al.* 1994). In *A. fumigatus* wurde auch ein zweites Hydrophobin (RodB_{Af}) gefunden. Ein As-Sequenzvergleich zeigt, dass RodB_{Af} zu 47% homolog zu RodA aus *A. nidulans*, zu 44% Ähnlichkeit zu RodA_{Af} aus *A. fumigatus*, aber nur 26% homolog zu DewA aus *A. nidulans* ist. D. h. RodB_{Af} ist ähnlicher zu RodA_{Af} aus *A. fumigatus* und RodA aus *A. nidulans* als zu DewA. Sporulierende Kolonien des *A. fumigatus* Wildtyp- und des $\Delta rodB_{Af}$ -Stammes sind morphologisch ähnlich. Sie zeigen eine hellgrüne Farbe und werden nicht feucht, wenn Wasser oder einer verdünnten Detergenslösung auf die Oberfläche der Kolonie getropft wird. Die $\Delta rodA_{Af}\Delta rodB_{Af}$ -Doppeldelation zeigte eine dunklere Farbe und die Konidien lassen sich leicht durch destilliertes Wasser benetzen. Die Doppelmutante ($\Delta rodA_{Af}\Delta rodB_{Af}$) zeigte eine glatte Oberfläche der Konidien, während die $\Delta rodA_{Af}$ -Mutante eine körnige Oberfläche aufwies, d. h. RodB_{Af} bildet keine *rodlets* an der Oberfläche der *A. fumigatus*-Konidien, sondern ist an der Bildung der äußeren Zellwand der Konidien beteiligt (Paris *et al.* 2003). Dies könnte auch auf die anderen *A. nidulans*-Hydrophobine DewA, DewB und DewC zutreffen.

Der Pilz *C. fulvum* besitzt sechs Hydrophobine. Durch gezielte Gendeletion von *hCf-1* konnte nachgewiesen werden, dass *hCf-1* eine wichtige Rolle in der Hydrophobizität der Konidien spielt und damit für die Fähigkeit der Konidien-Verbreitung durch Wasser essentiell ist (Whiteford & Spanu, 2001). In Kultur lokalisieren HCf-1, -2, -3 und -4 auf den Konidien und auf Lufthyphen. In jungen Kolonien (drei Tage alt), zeigen HCf-1, -2, -3 und -5 eine ähnliche Verteilung. Sie sind auf Lufthyphen von der Agar-Luft-Grenze bis zur Spitze der Hyphe detektierbar. Für HCf-4 konnte kein Signal nachgewiesen werden. Außerdem waren keine Hydrophobine auf den Hyphen, die im Agarmedium wachsen, zu beobachten. Im sporulierenden Myzel (sieben Tage alt) sind HCF-1, -2 und -3 immer noch sehr deutlich auf Lufthyphen lokalisiert, jedoch war kein HCF-5 in diesem Stadium detektierbar. In diesem älteren Myzel ist HCF-4 sowohl auf den Lufthyphen als auch auf dem im Agarmedium wachsenden Myzel lokalisiert. HCF-6 scheint sekretiert zu werden und bildet eine Schicht an der Agar-Luft-Grenze (Lacroix *et al.* 2008). Die anderen Hydrophobine von *C. fulvum* spielen, neben HCf-1, vermutlich eine eher untergeordnete Rolle und zeigen nach der Deletion keinen eindeutigen Phänotyp (Lacroix & Spanu, 2009).

In *Agaricus bisporus* (Champignons) wurden die drei Hydrophobine *abh1*, *abh2* und *abh3* nachgewiesen. Die Expression von *abh1* wurde in der Pileipellis (= Huthaut) des Champignons lokalisiert. ABH2 ist ein Fruchtkörper-spezifisches Protein, das nur in geringen Mengen exprimiert wird. Die Hydrophobine ABH1 und ABH3 werden unterschiedlich reguliert und haben wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen bei der Entwicklung (De Groot *et al.* 1999). Die Gene *abh1* und *abh2* werden in der Regel im Fruchtkörper des Heterokaryon exprimiert, *abh3* wird ausschließlich im Substratmyzel des Heterokaryons und Homokaryons

exprimiert (Lugones *et al.* 1998). Die Art der Regulierung dieser Hydrophobine ähnelt denen der Hydrophobine in *S. commune*. Hier wird *sc3* sowohl im primären als auch im sekundären Myzel exprimiert, während *sc1*, *sc4* und *sc6* im sekundären Myzel zu finden sind (Mulder & Wessels, 1986). Die Expression des Hydrophobins Sc3 ist in den Hyphen des Monokaryons und der Dikaryen detektierbar und ist an der Haftung von Hyphen an hydrophobe Oberflächen beteiligt (Wösten *et al.* 1993). Das *sc4*-Gen ist Dikaryon spezifisch und wird während Fruchtkörperbildung aktiv (Mulder & Wessels, 1986). Es wird von dikaryotischen Hyphen und den Hyphen des inneren Gewebes der Fruchtkörper vor allem zum Zeitpunkt der Primordien-Bildung exprimiert. Das Hydrophobin Sc4 wurde auf der Oberfläche Gaskanäle im Fruchtkörper lokalisiert (Lugones *et al.* 1999). Die Expression von *sc1* war in beiden Geweben kaum nachweisbar und die Fruchtkörper zeigten keinerlei *sc6*-Genexpression (Banerjee *et al.* 2008). An diesen beiden Beispielen, ist deutlich erkennbar, dass die Hydrophobine oft nur bestimmte Funktionen im Pilz erfüllen.

Die Hydrophobine DGH1, DGH2 und DGH3 im *Basidiomyceten Dictyonema glabratum* werden vom Mycobiont und nicht in den Photobionten exprimiert. Es gibt Hinweise, sie strukturelle und funktionale Ähnlichkeiten haben (Trembley *et al.* 2002). Alle Hydrophobine in *D. glabratum* haben ähnliche Expressionsmuster im gekräuselten Rand der Fruchtkörper Locke und jüngeren Regionen des Basidiocarps, zeigen aber eine differentielle Expression in den älteren, geschichtete Teilen des Pilzes. Es ist möglich, dass junge, sich entwickelnde Teile der Proteine, synergistisch zusammen arbeiten, um hydrophobe Oberfläche der Schichten zu schaffen oder sich funktionell zu ergänzen (Trembley & Horgen, 2002).

In vielen Pilzen werden mehrere Hydrophobine gleichzeitig exprimiert. Oft haben sie unterschiedliche Funktionen (HCF-1 und HCF-4) oder sind auf verschiedenen Oberflächen lokalisiert (SC3 und SC4), aber es wird vermutet, dass einige Hydrophobine in ihrer Funktion zusammenarbeiten (DGH1, DGH2 und DGH3) und z. B. die Funktion der anderen ergänzen. Da auch die Hydrophobine RodA, DewA, DewB und DewC auf den gleichen Strukturen exprimiert werden, aber nur RodA für die *rodlet*-Bildung wichtig ist, ist es möglich, dass auch DewA, DewB und DewC synergistisch zusammen arbeiten, um Hydrophobizität der Sporenoberfläche zu gewährleisten oder sich funktionell ergänzen (Kapitel 4.1.2).

Auch die Doppeldeletionsmutante ($\Delta rodA \Delta dewA$) und die *triple*-Deletion von $\Delta rodA \Delta dewA \Delta dewC$ zeigen keine *rodlets*, da hier kein *rodA* vorhanden ist. Es ist aber eindeutig erkennbar, dass hier die Hydrophobizität noch stärker reduziert ist, was auf eine unterstützende Rolle der anderen Hydrophobine, die hier ebenfalls fehlen, hindeutet. Das Fehlen von HCF-1 und HCF-2 in *C. fulvum*, entweder einzeln oder in der Doppeldeletion, hat keine offensichtliche Auswirkung auf die Fähigkeit des Pilzes *in vitro* auf Agarplatten oder in Flüssigkultur zu wachsen. Das Myzel wächst und sporuliert in gleicher Weise wie der

Wildtyp. Im Gegensatz dazu produziert der Deletionsstamm, in dem die vier Klasse I Hydrophobine (HCf-1 bis -4) fehlen, rund 10 Mal weniger Konidien. Außerdem ist die Keimungseffizienz der Konidien nur etwa 50% im Vergleich zum Wildtyp. Die Myzelien der Doppeldeletion und der *quadruple*-Deletion ($\Delta hcf-1$ bis -4) zeigen eine stark verringerte Hydrophobizität. Ein Wassertropfen auf der Oberfläche ist nicht stabil, sondern flacht ab, breitet sich aus und dringt allmählich in das Myzel ein (Whiteford & Spanu, 2001). Auch die $\Delta rodA_{Af} \Delta rodB_{Af}$ -Doppeldeletion in *A. fumigatus* zeigte eine starke Reduktion der Wasserresistenz der Konidien, außerdem eine glatte Oberfläche der Konidien, während die $\Delta rodA_{Af}$ -Mutante eine körnige Oberfläche aufwies. Dies bedeutet, dass RodB_{Af} an der Bildung der äußeren Zellwand der Konidien beteiligt (Paris *et al.* 2003). Die Reduktion der Hydrophobizität konnte auch für die Doppeldeletion und *triple*-Deletion in *A. nidulans* beobachtet werden. So dass auch eine Rolle in der Bildung der äußeren Zellwand der Konidien und der Erhaltung der Hydrophobizität der anderen *A. nidulans*-Hydrophobine DewA, DewB und DewC wahrscheinlich ist.

Schon in der Literatur wird über einen möglichen Zusammenhang zwischen Glykosylierung der Hydrophobine und der *rodlet*-Bildung bzw. Selbstassemblierung diskutiert (De Vocht *et al.* 1998). Daher wurden auch die vier *A. nidulans*-Hydrophobine untersucht. Mittels Analysen der Proteinsequenzen (NetNGlyc 1.0 Server; NetOGlyc 3.1 Server; Hansen *et al.* 1998) konnte folgendes festgestellt werden:

- RodA besitzt eine N-Glykosylierungsstelle an As-Position 47, aber keine O-Glykosylierungsstellen (Abb. 4.1).

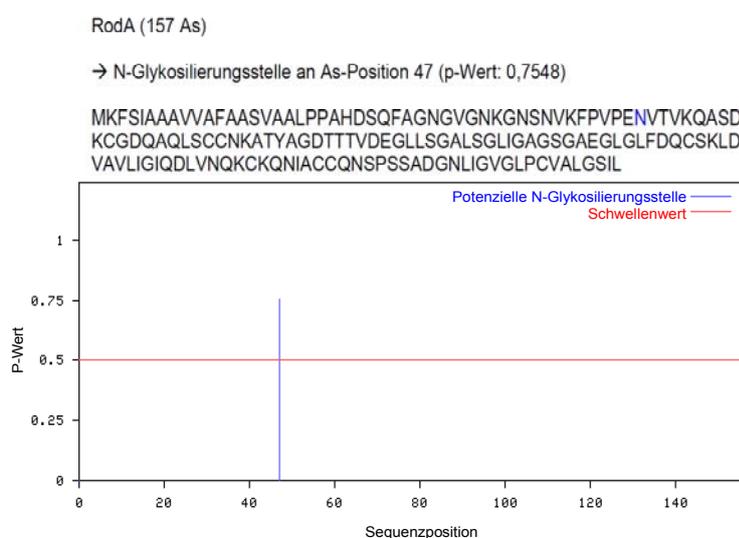


Abb. 4.1: Position der mutmaßlichen N-Glykosylierungsstelle in der Proteinsequenz von RodA

Die N-Glykosylierungsstelle (blau) weist einen p-Wert von 0,7548 auf. Die Analyse wurde mit dem NetNGlyc 1.0 Server durchgeführt.

- Die Proteinsequenz von DewA weist gleich zwei potenzielle O-Glykosylierungsstellen auf (Abb. 4.2 (A)). Die erste O-Glykosylierungsstelle befindet sich an As-Position 31, die

zweite an As-Position 132. Es konnte aber keine N-Glykosylierungsstelle in der Sequenz gefunden werden.

- Bei DewB ist ebenfalls keine N-Glykosylierungsstelle in der Proteinsequenz vorhanden. Es wurde aber eine O-Glykosylierungsstelle an As-Position 27 prognostiziert (Abb. 4.2 (B)).
- In der Proteinsequenz von DewC konnte keine der beiden Glykosylierungsstellen nachgewiesen werden.

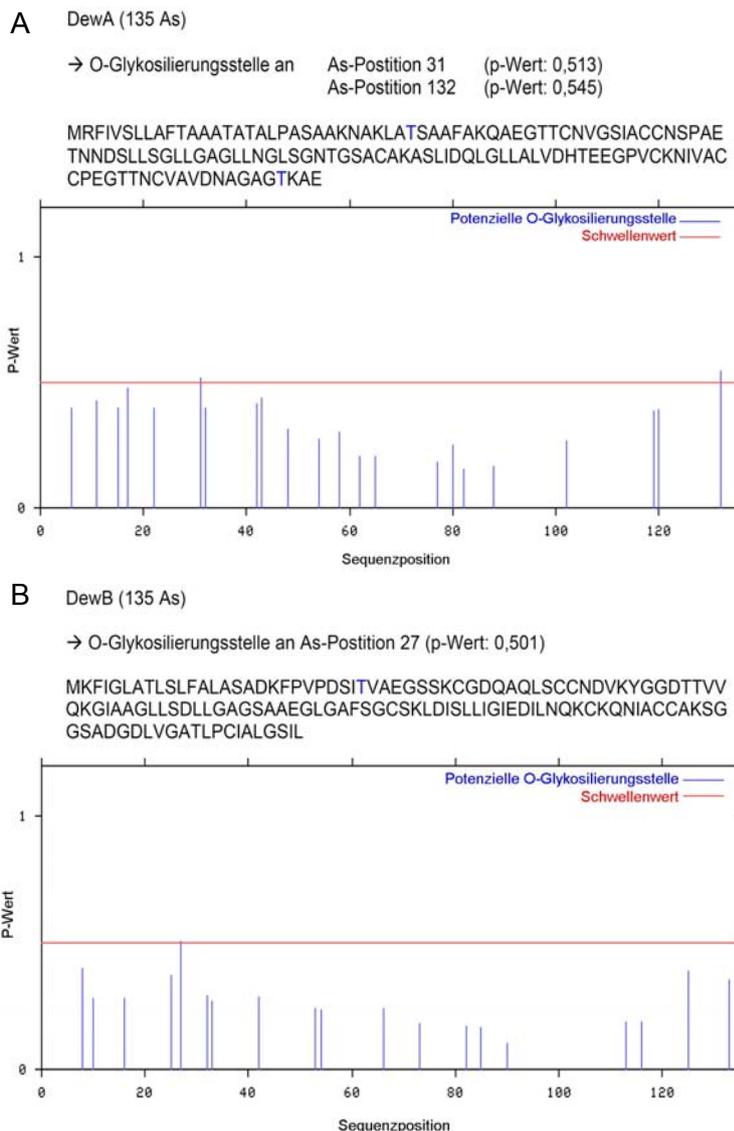


Abb. 4.2: Position der mutmaßlichen O-Glykosylierungsstelle in der Proteinsequenz von DewA und DewB

(A) Die erste O-Glykosylierungsstelle von DewA an As-Position 31 weist einen p-Wert von 0,513 auf. Bei der zweiten O-Glykosylierungsstelle an As-Position 132 wird ein p-Wert von 0,545 angegeben. (B) Die O-Glykosylierungsstelle von DewB hat einen p-Wert von 0,501. Die Analysen wurden mit dem NetOGlyc 3.1 Server durchgeführt.

Betrachtet man die Proteinsequenzen der vier Hydrophobine aus *A. nidulans*, so fällt auf, dass RodA als einziges der vier Hydrophobine eine N-Glykosylierungsstelle besitzt. In den Sequenzen der anderen Hydrophobine finden sich entweder keine oder ausschließlich O-Glykosylierungsstellen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die N-Glykosylierung eine entscheidende Rolle in der *rodlet*-Bildung spielt.

Ob die Glykosylierung der Hydrophobine eine Auswirkung auf die *rodlet*-Bildung hat, ist aber nicht eindeutig zu klären. Bisher wurde nur für SC3 eine Auswirkung auf die Assemblierung des amphiphatischen Films beschrieben (Bürglin 1991; Andrianopoulos & Timberlake, 1994), ob die *rodlet*-Bildung durch eine Glykosylierung beeinflusst wird wurde nicht beschrieben. Es ist also davon auszugehen, dass eine Deglykosylierung oder ein Verlust der Glykosylierungsstellen durch Punktmutation zu einer Veränderung der Proteinstruktur führt, die sich auf die Assemblierung auswirkt. Daher ist es gut möglich, dass auch die *rodlet*-Bildung gestört wird.

Hydrophobine aus anderen Pilzen, wie z. B. SC3 und SC4 aus *S. commune* oder ABH3 aus *Agaricus bisporus*, bilden *rodlets*, aber nicht alle haben Glykosylierungsstellen in ihrer Sequenz. Beispielsweise hat SC4 zwei mutmaßliche N-Glykosylierungsstellen an As-Position 39 und As-Position 71, während SC3 keine N-Glykosylierungsstellen aufweist (Schuren & Wessels, 1990).

Das Hydrophobin SC3 besteht aus 112 Aminosäuren mit 16 - 22 Mannoseresten im N-terminalen Teil des Proteins, die mit 14 möglichen O-Glykosylierungsstellen in Verbindung gebracht werden (Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Die Deglykosylierung von SC3 führt zu einer geringeren Festigkeit des amphiphatischen Films auf hydrophoben Oberflächen und zu einer veränderten Sekundärstruktur. Die Glykosylierung könnte für Hydrophobine mit einem langen Sequenzbereich vor dem ersten Cystein wichtig sein, da sie hilft diese Domäne in einer hydrophilen Umgebung zu halten (Marshall & Timberlake, 1991). Das Hydrophobin ABH3 zeigt ebenfalls keine Glykosylierungsstelle in der Proteinsequenz, bildet aber *rodlet*-Strukturen (Lugones *et al.* 1998). MPG1 weist keine N-Glykosylierungsstelle, aber eine mögliche O-Glykosylierungsstelle in der Proteinsequenz auf (Marshall & Timberlake, 1991). Klasse II Hydrophobine, wie z. B. HFBI und HFBII von *T. reesei*, werden nicht glykosyliert (Askolin *et al.* 2001; Linder *et al.* 2001).

4.1.2 Die Deletion der Hydrophobine hat Auswirkungen auf die Hydrophobizität des Myzels

Der Hydrophobizitätstest wurde unter ähnlichen Bedingungen wie 1995 von Stringer und Timberlake durchgeführt (Stringer & Timberlake, 1995). Bei allen Einzeldelationen, sowie der Doppeldelationsmutante und der *triple*-Deletion war eine reduzierte Hydrophobizität bei der verwendeten detergenshaltigen Lösung erkennbar. Diese wurde durch die mehrfache Deletion noch verstärkt, was darauf hindeutet, dass die Hydrophobine sich gegenseitig in dieser Aufgabe unterstützen. Eventuell wird in den Einzeldelationen auch der Verlust des

einen Hydrophobins durch ein anderes ausgeglichen. Vor allem bei DewA und den beiden neuen Hydrophobinen DewB und DewC, die nicht für die *rodlet*-Bildung verantwortlich sind, ist dies eher wahrscheinlich. Dies zeigt sich auch in der Doppeldeletion und der *triple*-Deletion, da ist die Hydrophobizität weiter reduziert. Hier wäre es interessant zu untersuchen, ob die Expression eines der anderen Hydrophobine durch die Deletion beeinflusst, also hoch oder runter reguliert wird. Dies wäre durch vergleichende Untersuchungen z. B. mit quantitativer *Real-Time*-PCR möglich.

Die Gendeletion von *mpg-1* (*M. grisea*, Klasse I Hydrophobin) hatte ebenso eine reduzierte Hydrophobizität zur Folge (Talbot *et al.* 1996). Bei der Deletion von *mhp-1* (*M. grisea*, Klasse II Hydrophobin) zeigte das Myzel eine reduzierte Hydrophobizität gegen eine Detergenzlösung (Stringer & Timberlake, 1995). Bei sporulierenden Kolonien des $\Delta hfb2$ -Stamms war ebenfalls eine Reduktion der Hydrophobizität erkennbar, genauso wie bei Kolonien von $\Delta hfb1$ (Klasse II Hydrophobine aus *T. reesei*; Askolin *et al.* 2005). Dass die Expression eines nicht betroffenen Hydrophobins durch die *down*-Regulation eines anderen beeinflusst wird, konnte bei RNAi-Untersuchungen im Pilz *C. fulvum* nachgewiesen werden. Hier wurde die Expression von HCf-5 auf ca. 3% des Normalwertes gehemmt. Dies hatte Auswirkungen auf die Expression aller anderen Hydrophobine des Pilzes (egal ob Klasse I oder II) (Lacroix & Spanu, 2009).

Die $\Delta rodA\Delta dewA$ -Doppeldeletionsmutante und die $\Delta rodA\Delta dewA\Delta dewC$ -*triple*-Deletion zeigen eine noch stärker reduzierte Hydrophobizität als die Einzeldelationen, was auf eine unterstützende Rolle der anderen Hydrophobine hindeutet. Im Pilz *C. fulvum* wurde ebenfalls eine Doppeldeletionsmutante ($\Delta hCf-1\Delta hCf-2$) und eine *quadruple*-Deletion ($\Delta hCf-1$ bis -4) auf ihre Hydrophobizität untersucht. Die Myzelien zeigen eine stark verringerte Hydrophobizität. Einem Wassertropfen auf der Oberfläche war nicht stabil, sondern flachte ab, bereitet sich auf dem Myzel aus und drang allmählich in das Myzel ein (Whiteford & Spanu, 2001). Auch hier wird, unterstützende Rolle der Hydrophobine untereinander vermutet, was der Hypothese, die für DewA, DewB und DewC aufgestellt wurde, entspricht.

4.1.3 Rekplementation des *rodlet*-Phänotyps in der *rodA*-Deletionsmutante

In dem $\Delta rodA$ -Stamm wurde *rodA* fusioniert an *rfp* retransformiert und mittels AFM auf *rodlet*-Bildung untersucht. Es wurden sowohl das komplette *rodA*-Gen und eine verkürzte Version für die Retransformation verwendet. 2009 wurde von De Goot *et al.* veröffentlicht, dass RodA und DewB einen mutmaßlichen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) besitzen und damit kovalent in der Zellwand verankert sein könnten (De Groot *et al.* 2009). Dies konnte durch Datenbankanalyse zusätzlich bestätigt werden (Kapitel 2.6.1). Bei der verkürzten Version fehlt der prognostizierte GPI-Anker (Kapitel 3.5), dadurch ging aber auch das letzte Cystein in der Proteinsequenz und damit eine Disulfidbrücke in der Proteinstruktur verloren. Auf die Lokalisierung des verkürzten RodA-Proteins hat dies keine Auswirkungen.

Betrachtet man die Sporenoberfläche mit dem AFM so fällt auf, dass durch Expression des kompletten *rodA* wieder *rodlets* auf der Oberfläche auftreten, d. h. der *rodlet*-Phänotyp wird rekomplementiert. Bei der Längenvermessung der *rodlets* konnte kein signifikanter Unterschied zu den Wildtyp-*rodlets* festgestellt werden, d. h. auch durch das fusionierte *rfp* findet keine Veränderung der *rodlets* statt. Anders sieht dies in der verkürzten *rodA*-Version aus, hier finden sich zwar teilweise *rodlet*-ähnliche Strukturen auf der Sporenoberfläche, diese sind aber völlig ungeordnet. Des Weiteren sind auf den Sporen auch Bereiche zu finden, auf denen die Oberfläche glatt, also ohne *rodlets* erscheint. Bei der AFM-Aufnahme erschien die Oberfläche wie durch eine weitere Schicht verdeckt zu sein (persönliche Kommunikation mit Tobias Heiler, Doktorand der Arbeitsgruppe Schimmel, Kooperationspartner im Rahmen des Forschungsprogramms „Biomaterialien“ der Landesstiftung Baden-Württemberg).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass durch die Verkürzung des *rodA*-Gens die Proteinstruktur und somit die Assemblierung soweit gestört ist, dass keine „normalen“ *rodlets* mehr gebildet werden können. Die Beobachtungen von Tobias Heiler lassen ebenfalls darauf schließen, dass die Proteinschicht, die auf der Sporenoberfläche liegt, entweder nicht richtig verankert ist oder sich von der Oberfläche ablöst. Dies könnte auf den fehlenden GPI-Anker zurückzuführen sein. Es ist aber auch möglich, dass durch die Verkürzung die Ordnung der *rodlets*, durch Beeinflussung der Selbstassemblierung, gestört wurde.

Nach Literaturangaben ist nach Austausch von Hydrophobingenen, auch wenn diese starke Sequenzunterschiede aufweisen, eine zumindest teilweise Rekplementation möglich. Dies ist am Beispiel der Expression von ABH1 in der SC3-Deletionsmutante ersichtlich (Lugones *et al.* 1999). Auch in der *mpg1*-Deletionsmutante konnte dies nachgewiesen werden. Wird in der *mpg1*-Nullmutante *sc1* aus *S. commune* unter seinem natürlichen

Promotor exprimiert, konnte der Phänotyp von *mpg1* teilweise wiederhergestellt werden (Kershaw *et al.* 1998). Wurden andere Hydrophobine, wie z. B. *sc1* und *sc4* aus *S. commune*, *rodA* und *dewA* aus *A. nidulans* oder *eas* aus *N. crassa*, unter dem *mpg1*-Promotor exprimiert, konnte zumindest eine der diversen Funktionen von MPG1 rekompensieren, wie z. B. die annähernd normale Appressorium-Bildung, die Bildung der *rodlet*-Schicht oder der leicht benetzbare Phänotyp (Kershaw *et al.* 1998). SC4 kann SC3 bei der Bildung von Lufthyphen ersetzen (van Wetter *et al.* 2000). Ein $\Delta sc3$ -Stamm produziert nur wenige Lufthyphen und diese sind hydrophil (van Wetter *et al.* 1996). Die Oberfläche der Lufthyphen des $\Delta sc3$ -Stammes zeigt keine *rodlets*. Im Vergleich dazu waren *rodlets* auf den Lufthyphen der SC4 exprimierenden $\Delta sc3$ -Transformanten zu beobachten. Ähnlich denen, die SC4 auf den Fruchtkörpern (Lugones *et al.* 1999) und die SC3 auf Wildtyp-Lufthyphen bilden (Wösten *et al.* 1994).

Im Gegensatz zu der *rodlet*-Membran, die von SC3 gebildet wurde, löst sich die von SC4 gebildete *rodlet*-Membran oft von der Hyphenoberfläche ab, was auf eine reduzierte Interaktion der hydrophilen Seite der SC4-*rodlet*-Membran mit der hydrophilen Zellwand hindeutet. Zusätzlich ist die Menge des SC4-Proteins aus dem $\Delta sc3$ -Stamm, das ins Medium sekretiert wird, über drei bis vier Mal geringer als die Menge an SC3 die der Wildtyp-Stamm absondert (van Wetter *et al.* 2000).

Die anderen dikaryon-spezifischen Hydrophobine, SC1 und SC6 können die SC4-Funktion offenbar nicht ersetzen. Darüber hinaus wurde durch die Expression des *sc4*-Gens hinter dem Promotor von *sc3* in einem $\Delta sc3$ -Stamm der SC3-Phänotyp nicht vollständig wiederhergestellt (van Wetter *et al.* 2000). Beide Hydrophobine werden also exprimiert, um bestimmte Funktionen zu erfüllen, wohingegen sie nicht alle Aufgaben des anderen vollständig übernehmen können. Dies deutet darauf hin, dass auch die Hydrophobine DewA, DewB und DewC sich in ihrer Funktion komplementieren könnten.

4.1.4 Regulation der Hydrophobin-Expression durch *brlA* und *abaA*

Genetische und biochemische Untersuchungen während der asexuellen Sporulation von *A. nidulans* haben zur Identifizierung von nur drei Genen geführt, die speziell für die Entwicklung der Konidiophoren (ohne Beeinträchtigung des vegetativen Wachstums) erforderlich sind. Sie heißen *brlA*, *abaA* und *wetA*. Diese sind für die Sporenbildung absolut notwendig (Abb. 4.3; Clutterbuck, 1969). *brlA* kodiert einen frühen Regulator der asexuellen Entwicklung. Der Phänotyp der *brlA*-Nullmutanten wurde als *bristle* (= Borste) bezeichnet, da in diesen Mutanten der Übergang vom polaren Wachstum des Stielchens in die Schwellung

des Vesikels unterdrückt wird und dieser Phänotyp wie Borsten aussieht (Clutterbuck, 1969). Die Aktivität von *brlA* wird während der kompletten asexuellen Entwicklung bis einschließlich zur Bildung der Konidiosporen benötigt (Adams *et al.* 1998). Die Expression von *brlA* in *A. nidulans* ist notwendig für die Induktion der asexuellen Entwicklung. *brlA* ist ein Transkriptionsregulator, der für die Aktivierung nachgeschalteter, regulatorischer Gene, wie z. B. *abaA* und *wetA* verantwortlich ist.

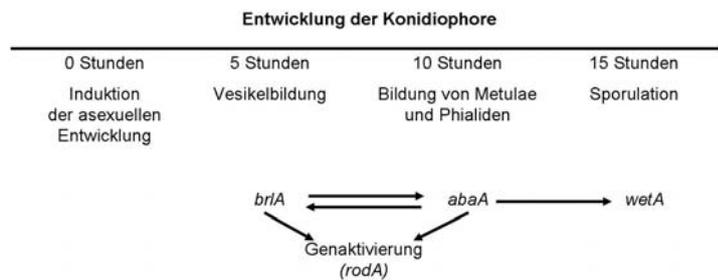


Abb. 4.3: Zeitleiste der Konidienbildung und der involvierte zentrale Signalweg.

Die Gene *abaA* und *wetA* im zentralen regulatorischen Signalweg für Konidiation, so wie *rodA*, werden durch *brlA* aktiviert. Die Aktivierung korreliert mit der Zeitleiste im oberen Teil der Abbildung. (verändert nach Adams *et al.* 1998)

Das BrlA-Polypeptid enthält ein typisches Zinkfinger-Motiv zur Bindung an die DNA (Adams *et al.* 1988). Das konservierte BRE (= *bristle response element*), an welches BrlA an die DNA in der Promotorregion der Gene bindet, lautet 5'-CAAGGG-3' (Abb. 4.4 hellblau unterlegt). Es existiert ein weniger konserviertes BRE mit der Sequenz 5'-(C/A)(A/G)AGGG(G/A)-3' (Abb. 4.4, hellblauer Kasten; Chang & Timberlake, 1993). Durch Bindung von BrlA an das BRE wird die Expression mehrerer Gene einschließlich *abaA*, *wetA* und *rodA* reguliert (Adams *et al.* 1998).

Das Gen *abaA* kodiert für einen Entwicklungsregulator, der von *brlA* während der mittleren Phase der asexuellen Entwicklung (Abb. 4.3; Bildung von Metulae und Phialiden) aktiviert wird (Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Der Phänotyp von *abaA*-Nullmutanten wird als „Abakus“ bezeichnet, weil diese Mutanten Konidiophoren produzieren, die zwar Metulae und Phialiden bilden, aber keine Sporen. Stattdessen bilden diese Mutanten verzweigte Phialiden, was zur Entstehung von langen Ketten von Zellen führt, die wie Perlen auf einer Schnur in einem Abakus erscheinen (Clutterbuck, 1969; Sewall *et al.* 1990). Das AbaA-Polypeptid enthält zur Bindung an die DNA in der Promotorregion eine TEA/ATTS-Domäne (Bürglin, 1991; Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Die TEA/ATTS-Domäne, auch ARE (*abacus response element*) genannt, wurde nach den Anfangsbuchstaben der zuerst beschriebenen Proteine mit dieser Domäne benannt (*TEF-1*, *ScTec1*, *abaA/abaA*, *TEF-1*, *ScTec1*, *scalloped*; Bürglin, 1991). Außerdem enthält *abaA* einen *Leucinezipper*, d. h. es kann dimerisieren.

Promotor von *rodA*

CTACATATACAGTCCCACATCATCGGCAATAACAAACGAGCTCGATGTCTATGGTATTCATCTATAGTGTAGC
TACGTGCTGCAGGTTTCTATCCCTGCTTGGGAAATTACCTAGAGAGATCGCGCATCCCTTGCCGCTT **CAAGG**
GACAGGAGTTG **AGAGGG** ACCAACCCTGCATATGTGTTTTAGATTTCTGGGTTGACTTTGTCTAAATCATCCC
TTGCAGGCTAAAGCATGCAATAGGCCAACAAACAGGCGCTGGGAGCTGAAGCTGGTCGCAAAGCTCCGAGG
AATGTGAAGTACTACTTGCATACCACGAGATGACTGCGGCTGATTTTGTATGGGCGCAATCGACACTGCA
AATGTCACGTAATCCCGCTGCTACTATAACTGGTGATAGCAGCAAATACTAAAGATTGACAGTTTGACATTTT
GGAATGGCAAGAAATGCTGGGATGCAACCTGAGTGGCAGCGGTGCTGTTTGCATAGCGATCTACAGAGCT
GGAGCAGGGGAATGAGACAGTATTGAGTACGCAGCATCCGCTAAAAACGCGAAATGAGTGACCGCTGCCTT
CCAGAGGCAACATCCAGTTGATCCATACCGAATAATGGGTATCACCCTCCGAACACCGAACCCA **CAAGGG**
GCGGCATCAGAGCTCGAAGCTCTGTTCTTGCCTGGTG **CATTCC** AAAGACCCATGAGGGAAGAATTCTCTG
ACAAGGACGTGGTTTGGGAGAGCTTGAGAGAACAAAAACCCATCCGGCAGTCTATATAAGGATGCTATA
TTCACCACCTGTTCAATTCCTCATCACGCTCTCTACAAGACTTTTATAGACAGTCCAGTCCCT **CATTCT** CA
AGCCTCTTCTCCAAAAACCAAAAAACCAACTTCCACCTCTTACA **ATG**

Promotor von *dewA*

CTGGACTAGTCTATGGATGGGGTTTGTAGCATCGGCCG **CATTCC** GTAGCCTCAGGGCAACGTCGGCCCAAT
GAGTAGTTATGGTTTCGTCTCAGGTACATCAAATAAAATAAAATAAATTCACAGCTGACTTGTGCGTTCTGCCCT
CAAATCCTTGAGGGCCAGAATCAAAGTGCATCGGCCTCTACCGATCAT **CGAGGG** GTGGATCAGGAGCAGA
CTTCCCTCGTGGGTACGTTGCCTACACAGACGCGGGTCCCCAGCGCAGGCGCCCTAATCCGGCGACAATAT
CTGGGGTTGGAATGTTACCTGAAATGTATCGATGTAGAAGTGCATAGGTACACACATTTGTCTGCAAAAC
TGCTTTCGACAGTGCATGGATAGATACAGGA **CATTCT** GATAGAGGCTGGTATATCT **CATTCC** ATAGTATCGC
ACCGCAATTGATTTTCTTT
ACAATGCAACAAGCTAGGTGGCGTACTCACAGGTACACTTCTCTAACCACGGCTCATTAGAGCGCTGCTTGC
GGCCTTCGTCAGGACAGGACAAAAACCGGTACGGTCAGGTACAGTTTCGCTTGCGGGCTCGACGATTTCT
GACCAGGAGATGTAGCATTAGTTCGGATCCGAGATTGAGATCATGAACGCAGACTGTAGTATCTCAGAGTTG
TAGTCTTCTGCTGAAAGTAGGTGTCAACGTCAAATATATAGAGCAAATCGGTCCAACCTCAGCTATATAAAC
CTGCCAGTCAACCTTCATCAGCTGCCTTCCATCACAAGCATCTCAAGCAATTCAGCAATTCAGCAATCCAAT
CATCCAGCAACAAGCTTTCAAAGCCAACCTCAACTCAACTCATCAAAA **ATG**

Promotor von *dewB*

AGCCTACGCCATCCTCTGGCTATATCATATATTCTTAAG **CATTCT** GAAATGGCTCAAGCCGGAAGCCGGTG
GGTTCCAGACAGGTAGTGGATGAACCTTACGCCAGAACTCACAATTTTGGGCACTATAAGTACTAAGTCTC
TAGTTCTGAATCTAAGGTGGGCACTGCCATATACTCTAAAGGCCTGCAGAGAAGCAAACAGATGTGCAAGT
GAAGACCGGGTGCCTGGTATACTGAAATCTGAACCCCTAACGGAGCCATTGGCCGGAATCTGTATCCAGA
CTGTTTACTTGTGTTTTCGGTATCAGCAAGGAACCGGATCGGATACGTCGTCAGTATCAAGGAAG
TGCCGATCATTGAAGTTAGCGAATGGCCAGGTCTGGCTTTTTCTTGGCAAGTTTTCTGCATAGATAGTGTCTG
CAAATTCTGAGTCGGACTAATCATGGCAGGATCGAGACATATACAGACCCGAGCCGATAGGTATAAGC
CTCACCGTCAATTCCTGCGTAAAACAAGATTCAATCCGCGTCTGCTTGGATCCCTACCGAGTCTGTCAGC
TATCGATTACCCTGTGCGTCGCCAAATAACTATAGAGCTTCAA **CATTCC** CCGATCCGCGCGTGGGAATGCAA
GGCGTCTGCCAACTAGGGGTATCAGGCACAACCCCGAAACAGCAATTAACAGGCTGTTGATCCTACTCG
TTGGCATGCGAGGTTTGAACCCTAGCAGAAATGTTTCATCATAGCCGCGCATTTATTGCGGCGCTGTCCAC
TCTTCCCTTCTCTTTCTTCTGCTCTCTCACCTACCTCACTACAATCACCTTATTACCTCAGTCTCAT
CTTACTCGCCTCGTTCTCGTGCAGACTAAACGTCACGTCCCATCCATAAAA **ATG**

Promotor von *dewC*

GCGAGGG GGGCGGTAGCTGAGGCACTGAAGAGAGGATACCATCTTGCGTATGTAGAGGAGAGTTTTTCAT
GGTAGGACGAGGCTTTGGGATGGCAATGGATGGGCTTGATTGTCCGGCTGTTTTGGTAATAGATTATCGAGG
ACTAGAGTATACTCTATTTTCGTAGACGTATACGGACATGACTAGAGATTTAGAATGGACACACTTGAATAC
AGCGGATACATGATAGAGTTTGTGCAGATACATAATCGTCTAAATACAGATGGTTATCTCGGCTGTGAATGTG
TGACCATAAATAATAGCGATAAAGCCTGGCCAGGTCAT **CAAGGG** GATATTCATACCACGGTCCCTTGCTTGC
GTACCGACACTCGCCAACCATGACATATCCAGTCTCTGAACCAGCAAGGCACTAGTGGTGGCTCAATATAGG
GAATGTGCGCGGGTGACCGACATGTCACATTGACCCTGGATATCACATATACTCAACGCGGTAGCCAAG
CCCTGAGCTCAATCGTCAATGCAATGATCGGCATCGTATGGCCAGATATGTCCTTATAATCGAACCAACCGC
ATATAGAGTTATGAAATTGATCTGAGGTTTCTTCCGAATATGCCAATTGTCTCGCAGAGGATCAGCTAGGATA
CTGGATTGCCGGCTGTCATAGGTACACTGGCATGCTTACTCGTATAGACTAGATGTCATATGCGCTTGATGAA
CATCAATG **CAAGGG** ATTCACTATAATGACGGCCCGTGTGAGATCGGCCTAGATGGCCGCGGACAGACTTT
GTCTGCTCAGTTCTCTGCGCTGCTGACCCAGTCTGACTCAAGCTATAAAACCTGCCTCAAGTCTTAGACCTTG
TCATCATCATCATCACATCGCAGCATCTTACCAGACACCTCAAAGTGATTTTTCAAAGAATTATTCACCGAAC
ACGTCAAT **ATG**

Abb. 4.4: Promotoranalyse der vier Hydrophobine

Bei der Promotoranalyse der einzelnen Hydrophobine wurde ~ 900 bp vor dem Start-Codon (ATG) der Gene auf die DNA-Bindungssequenzen von BRE und ARE untersucht. Hellblau unterlegt wurden die hoch konservierten DNA-Bindungsstellen von BrlA (BRE). In den hellblauen Kästen befinden sich die weniger konservierten BRE. Die TEA/ATTS-Domäne wurde in den Promotorregionen der Hydrophobine rot unterlegt. Befindet sich am Ende des ARE eine Purin-Base, statt einer Pyrimidin-Base (konservierten Form), ist das ARE mit einem roten Kasten versehen. Das jeweilige Start-Codon der Hydrophobin-Gene wird farblich hervorgehoben (*rodA* = blau; *dewA* = grün; *dewB* = braun; *dewC* = lila).

In der Promotorregion von *rodA* befinden sich zwei hoch konservierte BRE und ein weniger konserviertes BRE, sowie eine TEA/ATTS-Domäne mit Pyrimidin-Base und ein ARE mit Purin-Base am 3'-Ende. Die Promotorregion von *dewA* weist nur ein weniger konserviertes BRE auf, aber es befinden sich zwei TEA/ATTS-Domänen mit Pyrimidin-Base am 3'-Ende und ein ARE mit Purin-Base in der Promotorsequenz. Die *dewB* Promotorsequenz enthält kein BRE, aber je eine TEA/ATTS-Domäne mit Pyrimidin-Base bzw. mit Purin-Base am 3'-Ende. Die Sequenz des *dewC* Promotors zeigt im Gegensatz dazu nur zwei hoch konservierte und ein weniger konserviertes BRE.

AbaA ist, wie BrlA, für die transkriptionelle Aktivierung zahlreicher sporulationsspezifischer Gene verantwortlich. Ergebnisse aus *in vitro*-Analysen zeigten, dass *abaA* an die Konsensus-Sequenz (= ARE) 5'-CATTTCY-3' bindet, wobei das Y eine Pyrimidin-Base darstellt (Abb. 4.4, rot unterlegt; Andrianopoulos & Timberlake, 1994).

In der späten asexuellen Entwicklung wird ein weiteres Gen für die Synthese von entscheidenden Zellwandbestandteilen benötigt, dieses Gen heißt *wetA* (Abb. 4.3) (Marshall & Timberlake, 1991). Der Phänotyp einer *wetA*-Nullmutante wird als *wet-white* (nass-weiß) beschrieben. Diese Mutanten zeigen Konidien, die nicht pigmentiert sind und autolysieren (Sewall *et al.* 1990; Adams *et al.* 1998). Das *wetA*-Gen ist ein Regulator der Sporenspezifischen Genexpression (Marshall & Timberlake, 1991).

Da in der Promotorregion von *rodA* sowohl BRE (Abb. 4.4, hellblau) also auch ARE (Abb. 4.4, rot) zu finden sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression von *brlA* und *abaA* abhängig ist (Abb. 4.3 und 4.5; Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Die *brlA*-abhängige Expression wurde schon 1991 von Stringer *et al.* nachgewiesen (Stringer *et al.* 1991). In der Promotorregion von *dewA* sind zwei TEA/ATTS-Domänen zu finden (Abb. 4.4, rot). Dies deutet darauf hin, dass *dewA* von AbaA reguliert wird. Für BrlA befindet sich nur ein weniger konserviertes Bindungsmotiv im Promotor von *dewA*, was auf eine eingeschränkte Aktivierung durch BrlA hindeuten könnte (Stringer & Timberlake, 1995). Die Sequenz des *dewB*-Promotors weist ausschließlich TEA/ATTS-Domänen auf. Zum einen mit einer Pyrimidin-Base am 3'-Ende (Abb. 4.4, rot unterlegt), zum anderen mit einer Purin-Base (Abb. 4.4, rot umrandet), d. h. in diesem Fall könnte eine Regulation des Gens nur durch AbaA und nicht von BrlA vermittelt werden. Im Gegensatz dazu sind in der Promotorregion von *dewC* nur BRE (Abb. 4.4, hellblau) zu finden, was wiederum auf eine Regulation durch AbaA ausschließen lässt.

Durch die Promotoranalyse kann festgestellt werden, dass eine Aktivierung der Expression der neuen Hydrophobine durch Bindung von *brlA* bzw. *abaA* an deren Motive in der

Promotorregion möglich ist. Dabei werden *dewC* direkt und *dewB* indirekt (über *AbaA*) von *BrlA* reguliert (Abb. 4.5), da sich die Bindungsmotive in der jeweiligen Promotorregion finden.

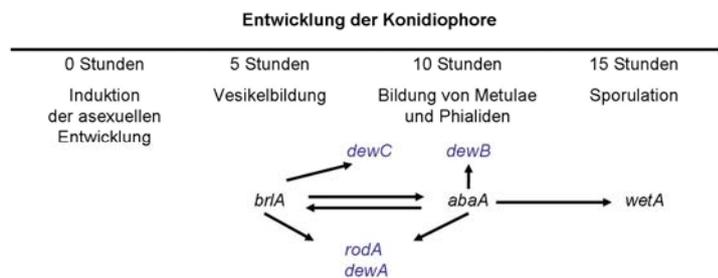


Abb. 4.5: Zeitleiste der Konidienbildung und der zentrale Signalweg mit Aktivierung der Hydrophobin-Gene

Die Gene *abaA* und *wetA* im zentralen Signalweg für die Konidiation, sowie *rodA*, *dewA* und *dewC*, werden durch *brlA* aktiviert. *AbaA* aktiviert *dewB*. Die Aktivierung korreliert mit der Zeitleiste im oberen Teil der Abbildung. (verändert nach Adams *et al.* 1998)

4.1.5 Vergleich zwischen Expression und Lokalisation der Hydrophobine

Bei der Analyse der Expression der vier Hydrophobine mittels *Northern Blot* wurde nachgewiesen, dass alle vier Hydrophobine ungefähr zum gleichen Zeitpunkt, d. h. in etwa der gleichen Stufe der asexuellen Entwicklung exprimiert werden (Kapitel 3.2). Die Expression ist etwa 12 bis 24 Stunden nach Induktion der asexuellen Entwicklung detektierbar, was mit der Bildung von Phialiden und Konidiosporen korreliert. Betrachtet man im Vergleich die Lokalisierung der Hydrophobine, die mittels GFP- und zum Teil mittels RFP-Fluoreszenz detektiert wurden, fällt auf, dass die Hydrophobine auch auf diesen Strukturen lokalisiert sind. In den Kapiteln 3.3 und 3.5 wurde *RodA* mittels Fluoreszenz-Analysen untersucht. Es ist auf den Metulae, Phialiden und Konidiosporen lokalisiert. Die Expression von *rodA* konnte schon nach acht Stunden mittels *Northern Blot* (Kapitel 3.2) nachgewiesen werden, dies entspricht den Ergebnissen, die schon Stringer *et al.* 1991 veröffentlichten (Stringer *et al.* 1991). *RodA* (damals noch als CAN41 bezeichnet) war in Kulturen, die Konidiophoren und Konidiosporen bildeten, nachweisbar.

Die Lokalisierung von *DewA* konnte ebenfalls auf den Metulae, Phialiden und den Konidiosporen dokumentiert werden (Kapitel 3.3). Die *dewA*-Expression zeigte sich nach 12 Stunden in der *Northern Blot*-Analyse (Kapitel 3.2). Zu diesem Zeitpunkt entwickeln sich die Phialiden. Mittels Immunfluoreszenz wurde 1995 von Stringer und Timberlake die Lokalisierung von *dewA* untersucht. Dazu wurde *dewA* am C-Terminus mit einem HA-Tag (= Hämagglutinin) versehen, welcher mit einem FITC-gekoppelten (*Fluorescein*) Antikörper detektiert wurde. *DewA* konnte dadurch in der Zellwand der Konidiophoren und der Konidiosporen nachgewiesen werden. (Stringer & Timberlake, 1995).

Im Fall von *dewB* konnte eine eindeutige Expression nach 12 Stunden nachgewiesen werden (Kapitel 3.2, Bildung der Phialiden). Bei der Lokalisierung mittels GFP war eine Fluoreszenz auf den Metulae, Phialiden und Konidiosporen sichtbar (Kapitel 3.3), die auch über die RFP-Fluoreszenz bestätigt werden konnte (Kapitel 3.5). Die Expression von *dewC* wurde erst nach 24 Stunden detektiert (Kapitel 3.2), dies ist der Zeitpunkt, an dem sich die Konidiosporen entwickeln. Allerdings war die RFP-Fluoreszenz schon auf den Metulae und Phialiden und auch auf Konidiosporen sichtbar (Kapitel 3.5). Die GFP-Fluoreszenz war ebenfalls eindeutig auf den Konidiosporen und auch schwach in den Metulae und Phialiden erkennbar. Es ist also möglich, dass Metulae und Phialiden nach Beginn der Sporenproduktion auch *dewC* exprimieren. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass alle vier Hydrophobine in *A. nidulans* während der asexuellen Entwicklung exprimiert werden. Zusätzlich lokalisieren sie alle auf den Metulae, Phialiden und Konidiosporen.

Der Pilz *Schizophyllum commune* exprimiert ebenfalls vier Hydrophobine. Dabei ist *sc3* nur in vegetativ wachsendem Myzel zu finden. Wohingegen *sc1*, *sc4* und *sc6* während der Fruchtkörperbildung exprimiert werden, d. h. sie werden, wie die Hydrophobine aus *A. nidulans*, gleichzeitig auf denselben Strukturen exprimiert und könnten somit miteinander interagieren oder ihre Funktionen komplementieren (Schuren & Wessels 1990; Wessels, 1996). Der Pilz *C. fulvum* besitzt mindestens die Hydrophobine: HCf-1, HCf-2, HCf-3 und HCf-4 typische Klasse I Hydrophobine und HCf-5 und HCf-6 Klasse II Hydrophobine. Durch gezieltes *RNAi-Silencing* von bestimmten Hydrophobinen in *C. fulvum* konnte gezeigt werden, dass auch die Expression von nicht betroffenen Hydrophobinen beeinflusst wurde (Lacroix & Spanu, 2009). Dies lässt darauf schließen, dass einige Hydrophobine die Funktion anderer übernehmen können.

4.1.6 Interaktion der Hydrophobine!?

Das die *rodlet*-bildenden Hydrophobine sich selbst interagieren ist naheliegend, denn diese Fähigkeit nutzen sie zu Selbstassemblierung an Ober- bzw. Grenzflächen. Diese Interaktion wird durch hydrophil-hydrophobe Proteinwechselwirkung vermittelt (Wösten & de Vocht, 2000). Ob die einzelnen Hydrophobine, die sich auf derselben Struktur bzw. Oberfläche befinden, miteinander interagieren ist bisher nicht geklärt. Wie schon zuvor erwähnt, sind die vier Hydrophobine auf der gleichen Oberfläche lokalisiert und werden gleichzeitig exprimiert, d. h. sie haben die Möglichkeit zur Interaktion miteinander. Durch Analyse mittels BiFC sollte dies für RodA und DewA geklärt werden. Leider zeigte dieser Versuch kein Ergebnis (Kapitel

3.4). Es ist aber nicht klar, warum keine Fluoreszenz in den Transformanten detektierbar war. Eventuell kamen die beiden Teile des YFP nicht nahe genug zusammen für eine Interaktion und um den Fluorophor zu rekonstruieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass RodA und DewA auf der Sporenoberfläche zu weit voneinander entfernt liegen. Es ist aber auch möglich, dass die beiden eher N-terminal interagieren (die Teile des YFP waren C-terminal fusioniert). Dass keine Fluoreszenz detektierbar war, könnte aber z. B. auch damit zusammenhängen, dass der Kontakt der Hydrophobine außerhalb der Zelle stattfand und daher die Interaktion der YFP-Teile nicht möglich ist, da das zytoplasmatische Milieu dafür benötigt wird. Die BiFC-Analyse wurde schon bei Membranproteinen verwendet (Zamyatnin *et al.* 2006). In solchen Studien ist es wichtig, den potenziellen Einfluss der fluoreszierenden Protein-Fragmente auf das Fusionsprotein zu beachten. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Fragmente vor oder während der Insertion in die Membran zu assoziieren (Kerppola, 2009).

Um eine Interaktion zwischen, z. B. Klasse I und II Hydrophobine nachzuweisen, wurden Mischungen der Hydrophobine miteinander zentrifugiert. Durch Lichtmikroskopie konnten Aggregate detektiert werden, die typisch für die Assemblierung von SC3 waren, sowie nadelförmige Strukturen, ähnlich denen nach Selbstassemblierung von HFBI und HFBII. Scheinbar können Klasse I und II Hydrophobine miteinander interagieren. Klasse I und II konkurrieren an Grenzflächen miteinander. Sie zeigen eine Interaktion und bilden gemischte Membranen mit *patches*, die aus Klasse I und II Hydrophobinen zusammengesetzt sind (Askolin *et al.* 2006).

4.2 Expression der Hydrophobine in *E. coli*

Hydrophobine stehen aus natürlichen Ressourcen nur in Milligramm-Mengen zur Verfügung. Außerdem ist ihre Gewinnung sehr aufwendig und man benötigt im Fall von Klasse I Hydrophobine konzentrierte Säuren, um ihre Aggregate wieder aufzulösen. Der Firma *BASF* (Ludwigshafen) gelang es vor kurzem, ein rekombinantes Expressionsverfahren von Hydrophobinen in *E. coli* zu etablieren und ein Klasse I Hydrophobin Kilogramm-Maßstab herzustellen. Das Hydrophobin-Fusionsprotein reichert sich in *inclusion bodies* (IBs = Einschlusskörperchen) in den *E. coli*-Zellen an und ist leicht durch Zentrifugation nach Aufschluss der Zellen zu gewinnen (Wohlleben *et al.* 2009). Bei *BASF* wurden bereits DewA und RodA als Fusionsproteine exprimiert. N-terminal von dem jeweiligen Hydrophobin ist das Fusionsprotein YaaD (eine Synthase aus *Bacillus subtilis*; Sakai *et al.* 2002) und C-terminal

ein 6x His-Tag fusioniert. Die Expression von RodA zeigt nur eine schwache Ausbeute, daher wurde diese nicht weiter durchgeführt.

Warum war die Expression der Hydrophobine in *E. coli* so schwierig? Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich die Hydrophobine aufgrund ihrer hydrophil-hydrophoben Eigenschaften in die Zellmembran der *E. coli*-Zellen einlagerten und diese so durchlöcherten. Das ist auch der Grund, weshalb man sie nicht in die lösliche Fraktion überführen kann, da dies denselben Effekt hätte.

Warum benötigt man große Mengen an Hydrophobin? Wie schon erwähnt, haben Hydrophobine ganz besondere Eigenschaften. Sie können Oberflächen dauerhaft beschichten und deren Eigenschaften umkehren, also beispielsweise eine hydrophobe Oberfläche, wie z. B. Teflon, hydrophil machen oder umgekehrt (Wessels, 1997; Wösten & Wessels, 1997). Außerdem finden sie Anwendung als Emulgatoren, was sie für die Kosmetikindustrie interessant macht.

Vor kurzem wurde ein weiteres Hydrophobin in *E. coli* exprimiert (Kirkland & Keyhani, 2010), das Hydrophobin Hyd2 aus dem endopathogenen Pilz *Beauveria bassiana*. Erste Versuche, das Hyd2-Protein in *E. coli* mit einem C-terminalen Fusions-Tag (z. B. His-Tag) zu exprimieren, ergaben in der Produktion keine signifikanten Mengen. Letztendlich wurde ein System verwendet, in dem N-terminal eine verkürzte Form des *hyd2*-Gens (es fehlen die 16 Aminosäuren die dem Signalpeptid entsprechen), zusammen mit einem Fusionspartner exprimiert wurde. Versuche, das native Hyd2 zu exprimieren und aufzureinigen, waren aber erfolglos, daher wurde zur Optimierung der pH-vermittelten Spaltung des Fusionsproteins der N-Terminus des Hyd2-Proteins verändert. Das Hyd2-Protein wurde nach der Expression hauptsächlich in IBs gefunden. Es wurden verschiedene Strategien, wie z. B. niedrige Temperatur, verringerte Expressionszeit und reduzierte IPTG-Konzentration getestet, um Hyd2 in die lösliche Fraktion zu überführen, dies war aber erfolglos.

Das Hyd2-Protein wurde daher aus den IBs nach einem Denaturierungs-Renaturierungsprotokoll aufgereinigt. Der Renaturierungsprozess wurde über eine stufenweise Dialyse mit abnehmender Harnstoff-Konzentration und einem basischen pH (~ 8,5) durchgeführt. Das Fusionsprotein wurde über eine Chromatographie-Säule geleitet und der Fusionspartner über pH-Absenkung abgespalten (Kirkland & Keyhani, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hydrophobin DewC in *E. coli* exprimiert und nach dem Protokoll der Firma BASF aufgereinigt (Kapitel 3.6.2). Da diese Expression erfolgreich war, müssen nun weitere vergleichende Analysen durchgeführt werden, z. B. ein Vergleich der Ausbeute zum bisher verwendeten DewA. Es wäre auch interessant zu untersuchen, wie die Beschichtungseigenschaften auf hydrophilen bzw. hydrophoben Oberflächen von DewC

sind. Zusätzlich wurde in der eine sequenzoptimierte Version von DewA exprimiert. Die Sequenz von DewA wurde dabei so verändert, dass sie fast ausschließlich aus hydrophoben Bereichen besteht. Begründet wird die Sequenzoptimierung durch das vorher von Timo Strunk (Doktorand der Arbeitsgruppe Dr. Wenzel; Kooperationspartner im Rahmen des Forschungsprogramms „Biomaterialien“ der Landesstiftung Baden-Württemberg) erstellte Templatmodell von DewA (Kapitel 3.6.3), welchem ein motiverhaltendes *Alignment* zwischen DewA und EAS (Klasse I Hydrophobin aus *N. crassa*, Kwan *et al.* 2006) zu Grunde liegt. Experimentelle Untersuchungen an Protein EAS haben gezeigt, dass eine Verkürzung der hydrophoben Schleifen keine strukturelle Änderung nach sich zieht (Kwan *et al.* 2008). Auch hier sollten nun weitere Analysen folgen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob dieses Hydrophobin durch die Sequenzveränderung ein anderes Beschichtungsverhalten auf Oberflächen im Vergleich zu DewA zeigt. Interessant wäre auch, dieses synthetische DewA in den $\Delta dewA$ -Stamm oder gar in den $\Delta rodA$ -Stamm zu integrieren, um zu sehen, wie sich dies z. B. auf den *rodlet*-Phänotyp oder die Hydrophobizität auswirkt.

4.2.1 Expression von funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen in *E. coli* und deren Anwendung für die Zelladhäsion von mesenchymalen Stammzellen

In der Literatur wurde gezeigt, dass bei Verwendung von natürlichen oder veränderten Hydrophobinen in einer Beschichtung das Wachstum und die Morphologie von Fibroblasten auf Teflon verschlechtert oder verbessert werden kann (Janssen *et al.* 2002, 2004). In Rahmen des Forschungsprogramms „Biomaterialien“ der Landesstiftung Baden-Württemberg sollten durch die Beschichtung mit funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen die Adhäsion von mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf Oberflächen verbessert werden (Kapitel 3.6.4). Dazu wurden zwei verschiedene funktionelle Peptide ausgewählt, RGD aus Fibronectin und die globuläre Domäne LG3 aus dem humanen Laminin-5, die in der Adhäsion von Zellen eine wichtige Rolle spielen.

Das RGD-Peptid (RGD = abgekürzt für den Aminosäure-Code Arg-Gly-Asp) des Fibronectin bindet an Integrine, welche sich in der Plasmamembran von Zellen befinden (Kantlehner *et al.* 1999; Schaffner *et al.* 1999; Kantlehner *et al.* 2000), es dient also zur mechanischen Verankerung von Zellen (Ruoslahti & Pierschbacher, 1986; Scholtmeijer *et al.* 2002). RGD ist die am häufigsten verwendete Peptidsequenz für stimulierte Zelladhäsion auf künstlichen Oberflächen. Dies beruht auf ihrer weiten Verbreitung und Nutzung im gesamten

Organismus und der Fähigkeit, mehr als einen Zelladhäsionsrezeptor anzusprechen (Hersel *et al.* 2003).

Es wurde auch die globuläre Domäne 3 (LG3) aus der α 3-Seitenkette des humanen Laminins-5 verwendet. Diese Domäne spielt auch eine Rolle in der Zelladhäsion und der Bindung zum α 3 β 1 Integrin (Kim *et al.* 2005). Laminin-5, ein Protein der Extrazellulären Matrix, besteht aus den Seitenketten α 3, β 3, γ 2 (wird daher auch als Laminin-332 bezeichnet) und hat eine einzigartige Struktur sowie biologische Aktivität. Es fördert z. B. die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC; Klees *et al.* 2007) ebenso wie die flächige Ausbreitung der Zellen auf Oberflächen (McBeath *et al.* 2004; Klees *et al.* 2007) und beeinflusst das Verhalten der Zelle durch die Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wie den Integrinen α 3 β 1 und α 6 β 4 (Carter *et al.* 1991; Niessen *et al.* 1994). Die Laminin-5 α 3-Seitenkette enthält eine C-terminale globuläre Domäne (LG), die aus fünf Modulen besteht (LG1 bis LG5; Talts *et al.* 1998; Timpl *et al.* 2000). Dabei ist die Domäne LG3 essentiell für die Aktivität (Hirosaki *et al.* 2000). Das Peptid-Motiv PPFLMLLLKGSTR innerhalb der LG3-Domäne wurde als aktives Zentrum für die Integrin α 3 β 1-Bindung identifiziert und ist somit unerlässlich für die Zelladhäsion (Kim *et al.* 2005). Diese Domänen wurden als funktionelle Peptide für die Fusion an das DewA-Expressionskonstrukt verwendet und an den N-Terminus des YaaD-Fusionsproteins kloniert. Es wurde darauf geachtet, dass es bei der Beschichtung der Oberflächen mit den Hydrophobinen exponiert ist und daher die Peptide so für die Adhäsion der Zellen besser zugänglich sind. Dies wurde ebenfalls mittels templatebasierter Modellierung von Timo Strunk durchgeführt.

Wie schon zuvor erwähnt, wurde durch Immobilisierung des RGD-Peptides zusammen mit SC3 (*S. commune*) auf einer Oberfläche die Zellanheftung von Fibroblasten gefördert (Olbrich *et al.* 1996; Cannizzaro *et al.* 1998; Kantlehner *et al.* 2000; Janssen *et al.* 2002). Janssen *et al.* konnten feststellen, dass die Zahl der Fibroblasten auf SC3-beschichtetem Teflon niedriger war als auf blankem Teflon. In beiden Fällen waren die Fibroblasten abgerundet und zeigten eine schlechte Adhäsion zur Oberfläche. Wurde das Teflon mit dem modifizierten Hydrophobin (SC3 fusioniert an RGD) beschichtet, konnten die Zellen an der Oberfläche haften (Janssen *et al.* 2002).

Um dies auch mit dem in *E. coli* exprimierten DewA-Fusionsprotein zu untersuchen, wurden die bereits beschriebenen funktionellen Peptide an das DewA-Fusionsprotein gekoppelt, exprimiert und aufgereinigt (Kapitel 3.6.4). Anschließend wurden die funktionellen Peptide-Hydrophobin-Fusionsproteine auf ihre Beschichtungseigenschaften und die Adhäsionseigenschaften von MSC untersucht. Zuerst wurde allerdings getestet, ob die DewA-Fusionsproteine oder YaaD alleine eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen haben. Diese Versuche wurden von Dr. Stephane Boeuf (Arbeitsgruppe Prof. Richter, Kooperationspartner

im Rahmen des Forschungsprogramms „Biomaterialien“ der Landesstiftung Baden-Württemberg) im *Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie* (Heidelberg) durchgeführt. Es wurde keine zytotoxische Wirkung festgestellt. Daher wurden Versuche zur Oberflächenbeschichtung durchgeführt (Kapitel 3.7)

Bei den beschichteten Oberflächen handelt es sich um Zellkulturschalen. Als Kontrollen wurden unbeschichtete Zellkulturschalen (haben BSA auf der Oberfläche) und mit Fibronectin beschichtete Zellkulturschalen verwendet. Das Experiment zeigte, dass die MSC auf dem RGD-Fusionspeptid (fusioniert an YaaD sh mit DewA) adhären. Am besten war die Adhäsion, wenn mit einer Konzentration von 20 µg/ml beschichtet wurde. Auch auf dem LG3-Fusionspeptid (fusioniert an YaaD sh mit DewA) konnte eine leichte Adhäsion nachgewiesen werden. Dies deutet, dass die Peptide in den *in vitro*-Analysen ähnliche Ergebnisse zeigen, wie die bereits veröffentlichten Experimenten mit Fibroblasten auf SC3-modifiziertem Teflon (Janssen *et al.* 2002; Scholtmeijer *et al.* 2002).

Weitergehende Analysen zeigen, dass die MSC auf den Oberflächen, die mit den funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen beschichtet wurden, auch proliferieren (persönliche Kommunikation mit Dr. Stephane Boeuf) und sich differenzieren (Abb. 4.6).

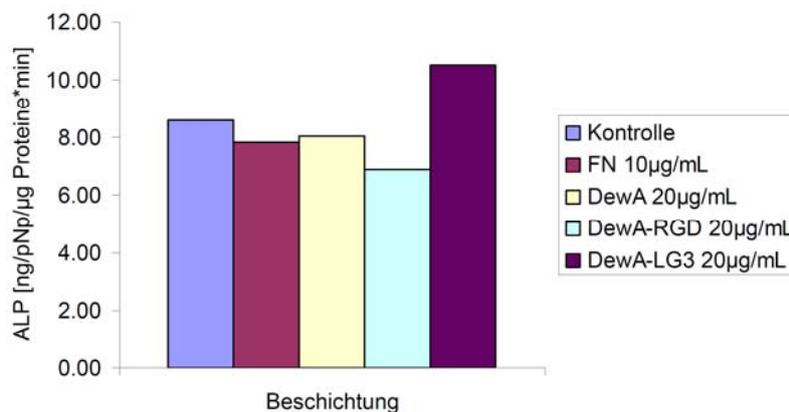


Abb. 4.6: Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC) auf beschichteten Oberflächen. 24 *well*-Zellkulturschalen wurden mit Fibronectin (= FN, aubergine, als Positivkontrolle) und den Hydrophobinen DewA-kurzes YaaD (DewA, gelb), DewA-kurzes YaaD-RGD (DewA-RGD, hellgrün) und DewA-kurzes YaaD-LG3 (DewA-LG3, lila) beschichtet. Die unbeschichtete Zellkulturschale wurde ebenfalls als Kontrolle verwendet (blau). Die MSC wurden ausgesät und 3 Wochen in osteogenem Medium kultiviert. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) wurde in Zelllysaten spektrophotometrisch bestimmt.

Die osteogene Differenzierung der MSC wurde auf beschichteten und unbeschichteten Zellkulturschalen mittels der Aktivität der alkalischen Phosphatase in den anschließend gewonnenen Zelllysaten spektrophotometrisch gemessen (Abb. 4.6). Als Kontrollen wurde die Zellkulturschale zum einen mit Fibronectin (FN) beschichtet oder unbeschichtet (BSA auf der Oberfläche) verwendet. Bei einer Beschichtung mit dem DewA-Fusionsprotein und den funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen konnte festgestellt werden, dass die beste osteogene Differenzierung auf der LG3-DewA-YaaDsh nachzuweisen war.

Weitere Analysen müssen nun zeigen, ob sich die funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteine für einen medizinischen Einsatz, z. B. in der Implantatbeschichtung, eignen.

4.3 Neue Fragen für die Hydrophobin-Forschung und Ausblick

Die während meiner Dissertation erzielten Ergebnisse (Kapitel 3) zeigen viele neue Aspekte über die Hydrophobine in *A. nidulans* auf. Nicht nur, dass zwei weitere, bisher nicht beschriebene Hydrophobine untersucht wurden, es konnte auch nachgewiesen werden, dass RodA als Hauptprotein für die *rodlet*-Bildung verantwortlich ist und die anderen Hydrophobine, obwohl sie zur gleichen Zeit, am selben Ort vorhanden sind, nur eine untergeordnete Rolle spielen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass durch das Fehlen des GPI-Ankers in RodA zwar die Lokalisierung nicht beeinträchtigt ist, aber dafür die Bildung der *rodlets* auf der Sporenoberfläche massiv gestört wird.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden auch neue Fragen und Aufgabenstellungen herausgearbeitet, die zwar in der vorliegenden Arbeit inhaltlich nicht näher betrachtet wurden, aber eine wichtige Grundlage für weiterführende Forschungen darstellen. So wäre es beispielsweise interessant zu untersuchen, was RodA in der *rodlet*-Bildung als wichtigstes Hydrophobin auszeichnet und welche Rolle dabei die N-Glykosylierung oder strukturelle Proteineigenschaften spielen. Durch weitergehende Versuche sollte überprüft werden, welche anderen Aufgaben, außer der Aufrechterhaltung der Hydrophobizität der asexuellen Sporen, die drei weiteren Hydrophobine in *A. nidulans* haben. Durch Herstellung eines *A. nidulans*-Stammes, der keine Hydrophobine mehr auf der Oberfläche besitzt, also eine *quadruple*-Deletionsmutante, könnten ebenfalls wichtige Rückschlüsse auf die Funktionen der Hydrophobine gezogen werden. Zusätzlich könnte man die Hydrophobine einzeln in diese *quadruple*-Deletionsmutante retransformieren und die Auswirkungen auf deren Phänotyp untersuchen.

Da in anderen Pilzen schon gezeigt wurde, dass die Hemmung der Expression eines bestimmten Hydrophobins Auswirkungen auf die Expression der anderen Hydrophobine hat (Lacroix & Spanu, 2009), wäre es spannend, dies in den Einzelmutanten, der Doppel- oder der *triple*-Mutante ebenfalls zu untersuchen. Eventuell wäre hier der Einsatz von *microarrays* oder die Durchführung von quantitativer *Real-Time*-PCR sinnvoll.

Eine besonders wichtige Frage ist auch die Interaktion der Hydrophobine untereinander, die bisher leider nicht geklärt werden konnte, da die BiFC, die zu diesem Zweck in dieser Arbeit

durchgeführt wurde, kein eindeutiges Ergebnis zeigte (Kapitel 3.4). Weitere Arbeiten zu diesem Thema könnten sich mit folgenden Fragestellungen beschäftigen:

- Interagieren die Hydrophobine direkt miteinander und wie wird diese Interaktion vermittelt?
- Interagiert das *rodlet*-bildende RodA mit allen anderen Hydrophobinen oder nur mit einem bestimmten?
- Sind hier auch hydrophobe-hydrophile Wechselwirkungen beteiligt?

Es wäre in diesem Zusammenhang hilfreich z. B. eine *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse oder Co-Immunoprecipitationstests durchzuführen, um diese Fragestellung zu klären.

Durch die Expression des *A. nidulans*-Hydrophobins DewA in *E. coli* konnte ein Durchbruch für den industriellen Einsatz der Hydrophobine erreicht werden. Ob sich die neuen Hydrophobine im Vergleich zu DewA bei der Oberflächenbeschichtung ähnlich verhalten, wäre nun im nächsten Schritt zu überprüfen. Leider war es während dieser Arbeit nicht möglich, auch DewB in *E. coli* zu exprimieren. Es sollten vergleichende Analysen z. B. bei der Ausbeute der exprimierten Hydrophobin-Fusionsproteine oder den Beschichtungseigenschaften durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde auch ein sequenzoptimiertes DewA in *E. coli* exprimiert. Durch weiterführende Experimente sollte nun im nächsten Schritt geklärt werden, ob dieses Hydrophobin durch die Sequenzveränderung ein anderes Beschichtungsverhalten auf Oberflächen zeigt. Das sequenzoptimierte DewA könnte auch in den *A. nidulans* Wildtyp-Stamm, den $\Delta dewA$ -Stamm oder gar den $\Delta rodA$ -Stamm retransformiert werden, um beispielsweise die Auswirkungen z. B. auf den *rodlet*-Phänotyp, die Hydrophobizität oder die Expression der anderen Hydrophobine zu untersuchen. Mit den exprimierten funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteinen konnten schon einige Ergebnisse, wie die verbesserte Adhäsion von MSC, die Proliferation und die osteogene Differenzierung nachgewiesen werden. Diese Versuche sollten nun ebenfalls mit dem exprimierten DewC und dem sequenzoptimierte DewA durchgeführt werden, um auch hier die Auswirkungen auf die MSC zu untersuchen. Durch Vermittlung einer Selektivität für die Stammzelladhäsion auf der beschichteten Oberfläche mit dem funktionellen Peptid-Hydrophobin-Fusionsprotein könnte versucht werden, MSC spezifisch auf der Oberfläche anzureichern, denn die Ausbildung einer Schicht aus Fibroblasten zwischen Implantat und Knochen ist eine der Hauptursachen für die Lockerung von Implantaten.

Die aktuelle Hydrophobin-Forschung fokussiert sich auf deren Nutzung für biotechnologische und industrielle Anwendungen, hierbei steht ein breites Spektrum an Einsatzgebieten offen. Hydrophobine wurden schon als Fusionspartner für die Aufreinigung von Proteinen in

wässrigen Zwei-Phasen-Systemen verwendet (Lahtinen *et al.* 2008; Joensuu *et al.* 2010) und können so auch zur selektiven Aufreinigung als Fusionspartner für rekombinante Proteine verwendet werden (Linder *et al.* 2001; Joensuu *et al.* 2010). Mit Hydrophobinen kann man Elektroden beschichten, um z. B. mit fusionierten Enzymen die Effektivität von Biosensoren zu erhöhen (Corvis *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2009). Sie wurden auch schon für die Stabilisierung von Emulsionen eingesetzt (Wohlleben *et al.* 2009), was sie für die Nahrungsmittel-, Reinigungsmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie interessant macht. Auch eine ihrer wichtigsten Eigenschaften, die stabile Oberflächenbeschichtung, macht sie natürlich für sehr viele Industriezweige wirtschaftlich interessant.

Durch Modifikationen der in *E. coli* exprimierten Hydrophobine konnten weitere Einsatzmöglichkeiten erschlossen werden. Nicht nur die Adhäsion von Zellen kann gefördert werden, sondern auch z. B. die Anhaftung von Bakterien und Pilzen durch Fusion antimikrobieller bzw. fungizider Peptide könnte verhindert werden. An diesem Projekt wird bereits seit 2009 in unserem Institut gearbeitet.

Klar ersichtlich ist, dass es für die Forschung an den Hydrophobinen in *A. nidulans* und ihrer Anwendungsmöglichkeiten zahlreiche Gründe gibt. Da die Hydrophobine mit ihren besonderen Eigenschaften eine so einzigartige Protein-Gruppe darstellen, bin ich mir sicher, dass es nicht mehr lange dauert, bis sie industriell eingesetzt werden und dann auch Einzug in unsere Privathaushalte finden, wenn dies nicht schon lange ohne unser Wissen geschehen ist.

5 Material und Methode

Die verwendeten Chemikalien, Kits und Reagenzien stammen, soweit nichts anderes angegeben wurde, von den Firmen *AppliChem* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe), *Sigma-Aldrich* (Hamburg), *Invitrogen* (Karlsruhe) und *Merck* (Darmstadt). Restriktionsenzyme und der DNA-Marker stammen von *New England Biolabs* (Frankfurt), *Fermentas* (St. Leon-Rot) und *Roth* (Karlsruhe).

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem *Zeiss AxiomagerZ.1* mit einer *Zeiss AxioCamMR* (Software *AxioVision 4.5*) angefertigt. Die Fluoreszenzaufnahmen am konfokalen Mikroskop *Leica TCS SP5* wurden mit der *Leica Software LAS AF Version 2.10* aufgenommen und bearbeitet. Des Weiteren wurden die Programme *Serial Cloner 2-1*, *ApE-A plasmid editor v1.13* und *Vector NTI Advance 10 (Demo Version)* verwendet.

5.1 Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 5.1 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 5.1: Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Chemilumineszenzdetektor	Chemi-Smart 5000	<i>Peqlab</i> , Erlangen,
Hybridisierungsöfen	Biometra OV1, Compact OV4	<i>Biometra</i> , Göttingen
Inkubatoren	Memmert Typ B40	<i>Memmert</i> , Schwabach
	Gyrotory water bath shaker Model G76	<i>Edison</i> , N.J., USA
Mikroskop	AxiomagerZ.1	<i>Zeiss</i> , Jena
	Leica TCS SP5	<i>Leica</i> , Wetzlar
PCR-Cycler	Eppendorf Mastercycler personal, gradient	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
SDS-PAGE Apparatur	Mini-PROTEAN® Tetra System mit Power Supply Gerät Model 1000/500	<i>Bio-Rad</i> , München
Spektrophotometer	Nanodrop- Spectrophotometer Typ 2000 C	<i>Peqlab</i> , Erlangen
Thermomixer	Thermomixer comfort, 5436	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Transilluminator	Alpha Innotech	<i>Cell Biosciences</i> , Santa Clara, USA
Zentrifugen	RC5C Sorvall Instruments	<i>Thermo Fisher Scientific</i> ,
	Rotoren: SS-34, GSA	Bonn
	Universal 320R Hettich	<i>Hettich</i> , Tuttlingen
	Eppendorf Centrifuge 5415C; 5415R; 5415D	<i>Eppendorf</i> , Hamburg

5.2 Verwendete Organismen

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Stämmen von *Aspergillus nidulans* und *Escherichia coli* gearbeitet (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1; endA1; gyrA96; thi-1; hsdR17; Stratagene (Agilent supE44; relA1; lac [F' proAB lacI_qZΔM15 Technologies), Tn10 (Tet_R)</i>	Darmstadt
Rosetta (DE3) pLysS	<i>F⁻ ompT hsdSB(R_B⁻m_B⁻) gal dcm Novagen (Merck), λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam_R)</i>	Darmstadt
<i>A. nidulans</i>		
FGSCA4	<i>Glasgow wild type</i>	Fungal Genetic Stock Center, Missouri, USA
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	Fungal Genetic Stock Center, Missouri, USA
TN0 2A3	<i>pyrG89; argB2; nkuA::argB; pyr A4</i>	Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	G. May, Houston, USA
RMS011	<i>pabaA1; yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1; trpC801</i>	Stringer et al. 1991
SRF200	<i>pyrG89; ΔargB::trpCDB; pyroA4; veA1</i>	R. Fischer, Karlsruhe
RMS019	<i>pabaA1; yA2; veA1; trp801 ΔargB::trpCΔA; ΔrodA::argB</i>	Stringer et al. 1991
TMS027	<i>pabaA1; yA2; ΔargB::trpCΔA; ΔdewA::argB; veA1 trp801</i>	Stringer & Timberlake, 1995

SCV2	Kreuzung zwischen RMS019 und SRF <i>Nadicom</i> , Karlsruhe 200 <i>pabaA1; pyrG89; yA2; ΔargB::trpCΔA;</i> <i>ΔdewA::argB; veA1 trp801</i>	
RMS049	<i>pabaA1; pyrG89; yA2; ΔargB::trpCΔA;</i> Stringer & <i>ΔrodA::argB; ΔargB::trpCΔA;</i> Timberlake 1995 <i>ΔdewA::argB; veA1 trp801</i>	
STT01	TN0 2A3 transformiert mit <i>ΔdewB::pyrG</i>	Diese Arbeit
STT02	TN0 2A3 transformiert mit <i>ΔdewC::pyrG</i>	Diese Arbeit
STT03	RMS011 transformiert mit <i>alcA(P)::rodA::sGFP</i>	Diese Arbeit
STT04	RMS011 transformiert mit <i>alcA(P)::dewA::sGFP</i>	Diese Arbeit
STT05	RMS011 transformiert mit <i>alcA(P)::dewB::sGFP</i>	Diese Arbeit
STT06	RMS011 transformiert mit <i>alcA(P)::dewC::sGFP</i>	Diese Arbeit
STT07	GR5 transformiert mit <i>rodA</i> (mit natürlichem Promotor)::N-YFP und <i>dewA</i> (mit natürlichem Promotor)::C-YFP	Diese Arbeit
STT08	SCV2 transformiert mit pTT07	Diese Arbeit
STT09	SCV2 transformiert mit pTT08	Diese Arbeit
STT10	SCV2 transformiert mit pTT09	Diese Arbeit
STT11	SCV2 transformiert mit pTT10	Diese Arbeit
STT12	Kreuzung von RMS049 mit STT02	Diese Arbeit

5.3 Kultivierung der Organismen

5.3.1 Kultivierung der von *A. nidulans*

Tabelle 5.3: Medien für *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung je 1l
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung; 1 ml Spurenelementlösung; 2% Glukose, Threonin oder Glycerin; mit 10 M NaOH auf pH 6,5, zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 KCl supplementiert
Salz-Stammlösung (20x)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ *7 H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung (1000x)	22 g ZnSO ₄ *7 H ₂ O; 11 g H ₃ BO ₃ ; 5 g MnCl ₂ *4 H ₂ O; 5 g FeSO ₄ *7 H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ *5 H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ *5 H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ *4 H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit KOH-Plätzchen auf pH 6,5

Die *A. nidulans*-Stämme wurden auf oder in Minimalmedium (MM) kultiviert (Tabelle 5.3). Als Kohlenstoffquelle diente dabei standardgemäß Glukose. Zur Induktion von Proteinen, die unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors stehen, wurde eine Kombination von 2% Threonin und 0,2% Glukose verwendet. Die Medien wurden je nach Bedarf mit den entsprechenden Auxotrophiemarkern supplementiert (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: Zusätze für *A. nidulans*

Substanz	Konzentration der Stammlösung	eingesetzte Menge je 1l
Arginin	500 mM (= 100x) sterilfiltrieren	10 ml
Pyridoxin-HCl	0,10% (= 1000x) autoklavieren	1 ml
P-Aminobenzoesäure	0,10% (= 1000x) autoklavieren	1 ml
Uracil	-	1 g
Uridin	-	1 g

Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben im Schüttler bei 180 rpm entweder über Nacht (für Protoplasten) oder für mindestens 24 Stunden auf Threonin-Platten gezüchtet. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Medium eingewogen. Die Pilzkulturen wurden, falls nicht anders vermerkt, bei 37° C inkubiert. Medien und Lösungen wurden 20 Minuten bei

121° C und mindestens 1 bar Überdruck autoklaviert. Glaswaren wurden im Hitzesterilisator ~ 4 Stunden bei 180° C sterilisiert. Hitze-empfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0.2 bzw. 0.45 µm Porengröße).

5.3.2 Kreuzungen und Genotypbestimmungen

Die Kreuzung wurde nach Sievers *et al.* (1997) durchgeführt. Zuerst wurden die Kreuzungspartner auf Agarplatten mit Komplexmedium (CM) im Abstand von ~ 1,5 cm angeimpft und zwei bis drei Tage bei 37° C inkubiert. Waren die Kolonien zusammengewachsen, wurden aus den Berührungspunkten der Kolonien kleine Agarblöcke (ca. 4 x 4 mm) ausgeschnitten und auf Minimalmedium-Platten mit geeigneten Auxotrophiemarkern, die nur ein Wachstum des Heterokaryons erlauben, überführt. Nach Verschließen der Platten mit ParafilmTM und Klebeband zur Erhöhung des CO₂ Partialdruckes (Dies führt zur Induktion des sexuellen Zyklus) wurden die Platten für mindestens 7 - 14 Tage inkubiert. In diesem Zeitraum bilden sich die Fruchtkörper (Kleistothezien), die mit Hilfe einer sterilen Impfnadel freigelegt, auf einer neuen Agarplatte unter dem Binokular durch vorsichtiges Rollen von den Hüllzellen und anhaftenden vegetativen Sporen befreit und in 300 µl H₂O im Deckel eines Eppendorf-Gefäßes zerdrückt wurden. Aliquots der Ascosporensuspension wurden auf CM-Platten ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation konnte die Kreuzung ausgewertet werden. Für die Genotypbestimmung eines *A. nidulans*-Stamms wurde dieser auf MM-Platten transferiert, auf denen jeweils der zu testenden Auxotrophiemarker fehlte.

5.3.3 Kultivierung von *E. coli*

Der *E. coli* Stamm *XL1-blue* wurde für Klonierungen und zum Anlegen von Glycerolstocks in der Plasmidsammlung verwendet. Die Standardkultivierung für *E. coli* erfolgte aerob, in/auf LB-Medium (Tabelle 5.5) bei 37° C. Das Medium wurde mit den entsprechenden Antibiotika versehen. Flüssigkulturen wurden dabei bei 200 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt.

Tabelle 5.5: Medien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung je 1l
Lysogeny Broth (LB)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7,5
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 0,19 g KCl; 2 g MgCl ₂ *7 H ₂ O; 3,6 g Glukose; pH 7,0
EC3	15 g Hefeextrakt, 15 g Trypton, 30 g Glycerin, separat einwiegen und lösen: 2 g KH ₂ PO ₄ , 5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 g MgSO ₄ *7 H ₂ O, 0,1 g CaCl ₂ *2 H ₂ O, pH 7, 50 ml SL 4 Spurenelemente
SL 4 Spurenelemente	500 mg C ₆ H ₈ O ₇ *H ₂ O, 200 mg FeSO ₄ *H ₂ O, ZnSO ₄ *7 H ₂ O, MnCl ₂ *4 H ₂ O, H ₃ BO ₃ , CoCl ₂ *6 H ₂ O, CuCl ₂ *2 H ₂ O, NiCl ₂ *6 H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O

Der Stamm *BL21(DE3)* wurde für Proteinexpressionen verwendet und dafür jeweils frisch mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Für Proteinexpressionen wurde in 500 ml EC3-Medium mit entsprechenden Antibiotika in 2 l-Erlenmeyerkolben geschüttelt.

Tabelle 5.6: Antibiotika für *E. coli* Medien

Substanz	Stammlösung (1000x)
Ampicillin	100 mg/ml (sterilfiltriert)
Kanamycin	30 mg/ml (sterilfiltriert)

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Klonierung von PCR-Fragmenten und *E. coli*-Transformation

Die PCR wurde entweder mit der Taq- Polymerase, der Pfu-Polymerase (*Fermentas*) oder der Phusion-Polymerase (*Finnzymes*, Frankfurt) durchgeführt. Für eine Zwischenklonierung des PCR-Produkts wurde der Vektor pJET1.2/blunt (CloneJET™ PCR Cloning Kit, *Fermentas*) verwendet. Die Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firmen *Biomers* (Ulm) oder *MWG* (Ebersberg) bezogen. Die PCR-Standard-Reaktion wurde in einem

Gesamtvolumen von 50 µl (mit 100 - 200 µM dNTPs und einer Primer-Endkonzentration von 0,4 µM) angesetzt. Für eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase wurden eine MgSO₄-Konzentrationen von 2 mM verwendet. Das PCR-Protokoll variierte je nach Angaben des Herstellers, Größe des PCR-Produktes und Schmelztemperatur der Primer (Denaturierung: 95 - 98° C für 20 sec, Annealing: 56 - 68° C für 20 sec, Elongation bei 72° C für 15 sec - 2 min/kb). Die PCR-Produkte wurden über einen Reinigungskit (z. B. Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, *ZymoResearch*, Freiburg) von den übrigen Komponenten der PCR getrennt und in pJET1.2/blunt (CloneJET™ PCR Cloning Kit, *Fermentas*) ligiert. Die Klonierung von PCR-Fragmenten in den pENTR™/D-TOPO®-Vektor wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (*Invitrogen*).

Als DNA-Größenstandard wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (*Fermentas*) verwendet. Ein Restriktionsverdau wurde in einem Gesamtvolumen von 10 - 50 µl durchgeführt. Die Ansätze enthielten 0,3 - 1 µl (5 - 100 U/µl) von jedem Restriktionsenzym und entsprachen in ihrer Zusammensetzung und Durchführung den jeweiligen Herstellerangaben. Die Ligation von Restriktionsfragmenten erfolgte in einem 10 - 20 µl Ansatz mit der T4-Ligase (*New England Biolabs*) in der Regel über Nacht bei 16° C. Anschließend wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit *E. coli* (*XL-1 blue*) transformiert. Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock für 60 Sekunden bei 42° C. Für die Transformation mit *BL21(DE3)* wurden 100 - 500 ng der gereinigten Plasmid-DNA verwendet.

Tabelle 5.7: Verwendete Oligonukleotide

Name des Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Ko_dewB_LB_fwd	GTAACGCCAGGGTTTCCCAGTCACGACG
Ko_dewB_LB_rev	ATCCACTTAACGCTTACTGAAATCAGGCGT AGAGATGAGACT
Ko_dewB_RB_fwd	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCAGACTCG TTCAGTACCTTCC
Ko_dewB_RB_rev	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC
Af_pyrG_3'end_fwd (dewB)	GCATCAGTGCCTCCTCTTCAGAC
Ko_dewB_RF_rev	CTTTACTGTCTTAGACGCTTC
dewB_LB_fwd	GGTGAACGTCTGCGGATGTAGAGCATTG
dewB_LB_Sfil_rev	CGGCCATCTAGGCCGAGGACGAAAGAAAG
dewB_ATG_fwd	ATGAAGTTCATCGGCCTTGCCAC
dewB_noStop_rev	CAGAATGGAGCCAAGGGCAATG
Ko_dewC_P1_fwd	ATGACGCCAAAGTCTTACTACAC
Ko_dewC_P2_fwd	AGGATACCATCTTGCGTATG

Kapitel 5: MATERIAL UND METHODE

Ko_dewC_P3_rev	TGGCCGCGTTGGCCTTGATGATGATGATG ACAAGG
Ko_dewC_P4_fwd	TGGCCTGAGTGGCCCGGAATTTATCTCAC GCTTTG
Ko_dewC_P5_rev	AGCTTAACAGCAATGGTAGG
Ko_dewC_P&_rev	CCCAGTACAGGAACAGAGTC
dewC_Topo_fwd	CACCATGCAATTCACAATCGC
dewC_noStop_rev	GAGAACCTGGACAGGAACACAAG
Af_pyrG_3'end_fwd (dewC)	ACGCCAAGGCTTTATCTATG
rodA_Topo_fwd	CACCATGAAGTTCTCCATTGCTGC
rodA_noStop_rev	GAGGATGGAGCCAAGGGCAAC
dewA_Topo_fwd	CACCATGCGCTTCATCGTCTC
dewA_noStop_rev	CTCAGCCTTGGTACCGGCG
dewA_EcoRI_Sfil_fwd	GGAATTCGGCCACTGAGGCCCTGGACTAGTCT ATGGATGGG
dewA_AscI_rev	CGGCGCGCCCTCAGCCTTGGTACCGGC
rodA_Sfil_fwd	GGGCCACTGAGGCCGTTTCGGCTCCTACAC TGTTAC
rodA_AscI_rev	CGGCGCGCCGAGGATGGAGCCAAGGGC
N-YFP_AscI_fwd	GGGCGCGCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
N-YFP_Pacl_rev	CTTAATTAATTACATGATATAGACGTTGTGG CTGTTG
C-YFP_AscI_fwd	GGGCGCGCCGATGGCCGACAAGCAGAAGAACG
C-YFP_Pacl_rev	CTTAATTAATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
BsaI_EcoRI_(nP)rodA_fwd	GGTCTCGAATTCCAAGTTTGAGGTTATTTTCTGG
(nP)rodA(SP)_KpnI_rev	CAGGTACCGAGGGCCGCGACGGAGGCGGCG
AscI_rodA(oSP)_fwd	AGGCGCGCCTCCTCCTGCCCATGATTCCCAG
rodA_mGPI_Pacl_rev	GTTAATTAATTAGAGGATGGAGCCAAGGGCAACGC
rodA_oGPI_Stop_Pacl_rev	CTTAATTAATTAAGTTCTGGCAGCAGGCAATGTTTTG
dewB_oSP_AscI_fwd	AGGCGCGCCTGACAAGTTCCCCGTCCCC
dewB_mGPI_Pacl_rev	CTTAATTAATTACAGAATGGAGCCAAGGGC
dewC_oSP_AscI_fwd	AGGCGCGCCTGCCCCCATGCCCCCGG
dewC_Pacl_rev	GTTAATTAATTAGAGAACCTGGACAGGAACAC
RGD_ligation_sense	AATTCATTAAGAGGAGAAATTAACC ATGCGGGGCGACCA
RGD_ligation_antisense	CATGTGGT CGCCCCGCAT

LG3_ligation_sense	GGTTAATTTCTCCTCTTTAATG AATTCATTAAGAGAGAAATTAACC ATGCCGCCGTTCTGATGCTGCTGAAAGGTTCT ACCCGTCA
LG3_ligation_antisense	CATGTG ACGGGTAGAACCTTTCAGCAGCATCAG GAACGGCGGCAT GGTTAATTTCTCCTCTTTAATG
yaaD_RGD(sdm1)_dewA_fwd	GGAGCTGTCATTGAAGGCCGCATG CGGGG CGCTTCCATCGTCTCTCTCCTCGCC
yaaD_RGD(sdm1)_dewA_rev	GGCGAGGAGAGACGATGGAAGC GCCCC GCATGCGGCCTTCAATGACAGCTCC
yaaD_RGD(sdm2)_dewA_fwd	GGAGCTGTCATTGAAGGCCGCATG CGGGGCGAC CGCTTCCATCGTCTCTCTCCTCGCC
yaaD_RGD(sdm2)_dewA_rev	GGCGAGGAGAGACGATGGAAGC GCCCCGTCC GCATGCGGCCTTCAATGACAGCTCC

5.4.2 Klonierung über GATEWAY-LR-Rekombinationsreaktion

Für die LR-Rekombinationsreaktion wurden 300 ng ENTRY-Vektor und 300 ng Destination-Vektor eingesetzt. Mit dem LR-Rekombinationsmix „Gateway LR Clonase™ enzyme mix“ von der Firma *Invitrogen* wurde der LR-Rekombinationsreaktion nach der Angabe des Herstellers durchgeführt.

5.4.3 Plasmid-DNA-Präparationen aus *E. coli*

Tabelle 5.8: Puffer für die Plasmid-Mini-Präparation

Puffer	Zusammensetzung
Zell-Suspensionspuffer	10 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mg RNase H
Zell-Lysispuffer	1% SDS, 0,2 M NaOH

Die Präparation von Plasmid-DNA (pDNA) erfolgte in zwei unterschiedlichen Maßstäben. Um Transformanten einer Klonierung zu testen, wurde eine Minipräparation durchgeführt, bei

welcher ausgehend von einer 5 ml *E. coli*-Übernachtskultur DNA präpariert wurde. Das Zellpellet von 1,5 ml der Übernachtskultur wurde im Eppendorfgefäß abzentrifugiert und zum Abbau von RNA zunächst in Zell-Suspensionspuffer resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte mit 200 µl Zell-Lysispuffer und die Fällung der Proteine mit 200 µl 1,5 M Kaliumacetat pH 4,8 für 10 min auf Eis. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min wurden Zelltrümmer und präzipitierte Proteine abgetrennt. Der Überstand der Zentrifugation wurde sauber in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 500 µl 100% Isopropanol für 30 min bei -20° C gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 4° C für 30 min pelletiert, anschließend einmal mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die pDNA wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und bei 68° C für ca. 10 min im Heizblock gelöst.

Benötigte man die pDNA für eine *A. nidulans* –Transformationen oder besonders rein für andere Anwendungen, wurde sie im größeren Maßstab (Midipräparation) präpariert und aus 50 - 100 ml Kulturansätzen gewonnen. Hierfür wurde ein Kit (Nucleobond AX100; *Macherey-Nagel*, Düren) verwendet. Die Konzentration und die Reinheit der präparierten DNA wurde durch Absorptionsmessungen bei 260/280 nm im Nanodrop-Spektrophotometer bestimmt.

5.4.4 Hergestellte und verwendete Plasmide

Tabelle 5.9: Übersicht über die hergestellten und verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pJET1.2/blunt	Klonierungsvektor für die blunt-end Klonierung von PCR-Produkten	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot
pQE60	Expressionsvektor für Aufreinigung via 6x His-Tag	<i>Qiagen</i> , Hilden
pCMB17apx	Überexpression von Genen in <i>A. nidulans</i> mittels <i>alcA(p)</i> ; N-terminale Fusion mit GFP beim Einklonieren der PCR-Produkte in <i>Ascl</i> + <i>Pacl</i> , <i>Amp_R</i> , <i>pyr-4</i> -Marker	Efimov <i>et al.</i> 2006
pDM8	GFP ersetzt durch <i>mRFP1</i> in pCMB17apx	Veith <i>et al.</i> 2005
pENTR TM / D-TOPO	Gateway-Topo-Vektor für Klonierung von PCR-Produkten, <i>Kan_R</i>	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
pMTsGFP (pJW22)	<i>alcA(P)::ccdB</i> -Kassette (inkl. flankierender <i>attR</i> -Stellen)::sGFP in <i>alcA(P)</i> in <i>Bam</i> HI, <i>argB</i> in <i>NotI</i> in pBluescript-II-KS ⁻	Toews <i>et al.</i> 2004

pBASF1	pQE60 + <i>yaaD</i> + <i>dewA</i> + 6x His-Tag	Wohlleben <i>et al.</i> 2009
pBASF2	pQE60 + auf 40 As verkürztes <i>yaaD</i> + <i>dewA</i> + 6x His-Tag	Wohlleben <i>et al.</i> 2009
pTT 01	<i>alcA(P)::dewA::sGFP</i> , Amp _R , <i>argB</i>	Diese Arbeit
pTT 02	<i>alcA(P)::rodA::sGFP</i> , Amp _R , <i>argB</i>	Diese Arbeit
pTT 03	<i>alcA(P)::dewB::sGFP</i> , Amp _R , <i>argB</i>	Diese Arbeit
pTT 04	<i>alcA(P)::dewC::sGFP</i> , Amp _R , <i>argB</i>	Diese Arbeit
pTT 05	GFP ersetzt durch <i>rodA</i> mit natürlichem Promotor in pCMB17apx, N-YFP kloniert über <i>Ascl</i> + <i>Pacl</i>	Diese Arbeit
pTT 06	GFP ersetzt durch <i>dewA</i> mit natürlichem Promotor in pCMB17apx, C-YFP kloniert über <i>Ascl</i> + <i>Pacl</i>	Diese Arbeit
pTT 07	<i>alcA(P)</i> ersetzt durch den natürlichen Promotor mit Signalpeptid von <i>rodA</i> in pDM8, <i>rodA</i> (ohne Signalpeptid) kloniert über <i>Ascl</i> + <i>Pacl</i>	Diese Arbeit
pTT 08	<i>alcA(P)</i> ersetzt durch den natürlichen Promotor mit Signalpeptid von <i>rodA</i> in pDM8, verkürztes <i>rodA</i> (ohne Signalpeptid und GPI Anker) kloniert über <i>Ascl</i> + <i>Pacl</i>	Diese Arbeit
pTT 09	<i>alcA(P)</i> ersetzt durch den natürlichen Promotor mit Signalpeptid von <i>rodA</i> in pDM8, <i>dewB</i> (ohne Signalpeptid) kloniert über <i>Ascl</i> + <i>Pacl</i>	Diese Arbeit
pTT 10	<i>alcA(P)</i> ersetzt durch den natürlichen Promotor mit Signalpeptid von <i>rodA</i> in pDM8, <i>dewC</i> (ohne Signalpeptid) kloniert über <i>Ascl</i> + <i>Pacl</i>	Diese Arbeit
pTT 11	pQE60, auf 40AS verkürztes <i>yaaD</i> kloniert über <i>EcoRI</i> und <i>NcoI</i>	Diese Arbeit
pTT 12	pTT 11, <i>dewC</i> kloniert über <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pTT 13	pBASF2 mit dem synthetischen DewA kloniert über <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i>	Diese Arbeit
pTT 14	pBASF1 mit dem RGD-Peptid am N-Terminus des YaaD kloniert über <i>EcoRI</i> - und <i>NcoI</i> -Ligation	Diese Arbeit
pTT 15	pBASF2 mit dem RGD-Peptid am N-Terminus des YaaD kloniert über <i>EcoRI</i> - und <i>NcoI</i> -Ligation	Diese Arbeit
pTT 16	pBASF2 mit dem RGD-Peptid nach dem ATG des YaaD eingefügt über <i>Site-directed mutagenesis</i>	Diese Arbeit

pTT 17	pBASF1 mit dem LG3-Peptid am N-Terminus des YaaD Diese Arbeit kloniert über <i>EcoRI</i> - und <i>NcoI</i> -Ligation
pTT 18	pBASF2 mit dem LG3-Peptid am N-Terminus des YaaD Diese Arbeit kloniert über <i>EcoRI</i> - und <i>NcoI</i> -Ligation

5.4.5 Herstellung von Protoplasten und Transformation

Zur Anzucht des zu transformierenden *A. nidulans* Stammes wurden 500 ml Minimalmedium (+ Supplemente) mit Konidiosporen von einer Agarplatte beimpft und bei 30° C, 200 rpm für ~ 12 Stunden inkubiert. Die Kultur wurde durch steriles „Miracloth“ (*Calbiochem*, Heidelberg) abfiltriert und mit Myzel-Waschlösung gespült, um Reste vom Anzuchtsmedium zu entfernen. Das Myzel (~ 1 g) wurde in einen sterilen 100 ml-Erlenmeyerkolben gegeben und mit 5 ml osmotischen Medium versetzt. Der Verdau der Zellwände erfolgte durch Zugabe von 140 mg *Glucanex* (gelöst in 1 ml osmotischem Medium) und 6 mg Albumin (gelöst in 0,5 ml osmotischem Medium) für zwei Stunden bei 30° C, langsam schüttelnd (~ 65 rpm).

Tabelle 5.10: Puffer für die Protoplasten-Transformation

Puffer	Zusammensetzung
Myzel-Waschlösung	0,6 M MgSO ₄
Osmotisches Medium	1,2 M MgSO ₄ ; 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 5,8
<i>Trapping</i> -Puffer	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris-Cl pH 7,0
STC-Puffer	1,2 M Sorbitol; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-Cl pH 7,5
PEG-Lösung	60% Polyethylenglykol 4000; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-Cl pH 7,5

Nach ein bis zwei Stunden wurde die Protoplasten-Bildung am Mikroskop überprüft. Die Suspension wurde in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig mit 10 ml *Trapping*-Puffer überschichtet. Die Protoplasten reichern sich während einer 15 minütigen Zentrifugation bei 5.000 rpm im Ausschwingrotor in der Grenzschicht zwischen osmotischem Medium und *Trapping*-Puffer an. Die an der Phasengrenze gebildete Protoplastenbande wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen. Diese Protoplasten-Suspension wurde in ein steriles Zentrifugegefäß (*Corex-Tube*) überführt und mit 10 ml STC versetzt. Um die Protoplasten zu pelletieren wurde 10 min bei 7.000 rpm, 4° C zentrifugiert. Das STC wurde

vorsichtig abgegossen und das Protoplasten-Pellet bei Bedarf nochmals mit 10 ml STC in gleicher Weise gewaschen. Zum Schluss wurden die Protoplasten in 100 - 300 µl STC (je nach Menge) mit einer großen Pipettenspitze resuspendiert.

Zur Transformation wurden 100 µl der Protoplasten-Suspension mit 100 µl DNA-Lösung (enthält 5 - 10 µg pDNA und wird mit STC auf 100 µl aufgefüllt) in einem 15 ml-Reaktionsgefäß gemischt. Der Ansatz für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml PEG-Lösung zugegeben, das Reaktionsgefäß bis zur Homogenisierung der Lösung gerollt und noch einmal 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend 8 ml STC-Lösung zugegeben und durch Rollen durchmischt. Diese Transformationssuspension wurde auf Selektionsmedium (Minimalmedium-Agar mit 0,6 M KCl und ohne den auf der pDNA codierten Auxotrophie-Marker) ausplattiert und für drei Tage bei 37° C inkubiert.

5.4.6 Präparation von genomischer DNA aus *A. nidulans*

Tabelle 5.11: Puffer für die Präparation von genomischer DNA aus *A. nidulans*

Puffer	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA; 0,2% SDS

Für die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus *A. nidulans* wurden ~ 20 ml Minimalmedium mit der Sporensuspension des entsprechenden Stammes beimpft und für ca. 16 Stunden stehend bei 37° C inkubiert. Das Pilzmyzel wurde zwischen Papiertüchern trocken gepresst, in flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet, gemörsert und mit 1 ml Extraktionspuffer gemischt. Diese Suspension wurde für zwei Stunden bei 68° C im Wasserbad inkubiert. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für fünf Minuten wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 60 µl 8M Kalium-Acetat pH 4,2 gemischt. Die Fällung der Proteine wurde durch 10 minütige Inkubation auf Eis eingeleitet. Eine anschließende Pelletierung der Proteine erfolgte durch Zentrifugation bei 13.000 rpm fünf Minuten. Der Überstand wurde sauber in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Durch die Zugabe desselben Volumens an 100% Isopropanol wurde die Präzipitation der DNA bewirkt. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl H₂O über Nacht

im Kühlschrank gelöst. Die Konzentration und Reinheit der präparierten gDNA wurde durch Absorptionsmessungen bei 260/280 nm im Nanodrop-Spektrophotometer bestimmt.

5.4.7 Southern Blot

Die *Southern Blot*-Analysen wurden mit DIG-markierten Sonden, mittels einer PCR mit Komponenten aus dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (*Roche*, Mannheim) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl hergestellt. Als Kontrolle dient derselbe PCR-Ansatz ohne DIG-dNTPs, um den *Shift* im Gel zwischen DIG-markiertem und unmarkiertem PCR-Produkt zu sehen.

Tabelle 5.12: Puffer für den *Southern Blot*

Puffer	Zusammensetzung
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	0,25 M Tris-Cl pH 7,5; 1,5 M NaCl
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat
DIG-Standard	5x SSC; 0,02% SDS; 1% Blocking Reagenz (<i>Roche</i>);
Hybridisierungspuffer	0,1% N-Laurylsarcosin
2x Waschlösung	2x SSC; 0,1% SDS
0,5x Waschlösung	0,5x SSC; 0,1% SDS
Waschpuffer	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,3% Tween 20
Blockingpuffer	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 1% Blocking Reagenz
AP-Puffer	0,1 M Tris-Cl pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂

Für einen *Southern Blot* wurde die gDNA von den entsprechenden *A. nidulans* Stämmen über Nacht mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Hierfür wurde ein Reaktionsvolumen von 30 µl gewählt und etwa 8 - 12 µg gDNA eingesetzt. Die verdaute DNA wurde in einem 1%igem Agarosegel mit großen Taschen langsam aufgetrennt (50 V für drei bis vier Stunden), das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und die Markerbanden mittels Pipettenspitze markiert. Danach wurde das Gel wie folgt behandelt:

- Depurinierung für 10 Minuten in 250 mM HCl, spülen mit H₂O
- Denaturierung zweimal 15 Minuten in Denaturierungspuffer, spülen mit H₂O

- Neutralisierung zweimal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer
- Äquilibrierung für 10 Minuten in 20x SSC

Der DNA-Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (*Roche*) erfolgte über Kapillarwirkung. Hierfür wurde eine Brücke aus Blottingpapier Typ *Whatman*[®] Stärke 0,34 mm (*Hartenstein*, Würzburg) zwischen zwei mit 20x SSC gefüllte Tanks gebildet, alles gut befeuchtet und der Blot in folgender Reihenfolge aufgebaut (Abb. 5.1):

- Agarosegel (umgekehrt liegend, d.h. die Taschen auf der *Whatman*[®]-Brücke aufliegend)
- Nylonmembran (in 20x SSC äquilibriert)
- 3 Lagen *Whatman*[®]-Blottingpapier
- Stapel aus saugfähigen Papiertüchern
- ~ 150 g Gewicht (gleichmäßig über Fläche verteilt)

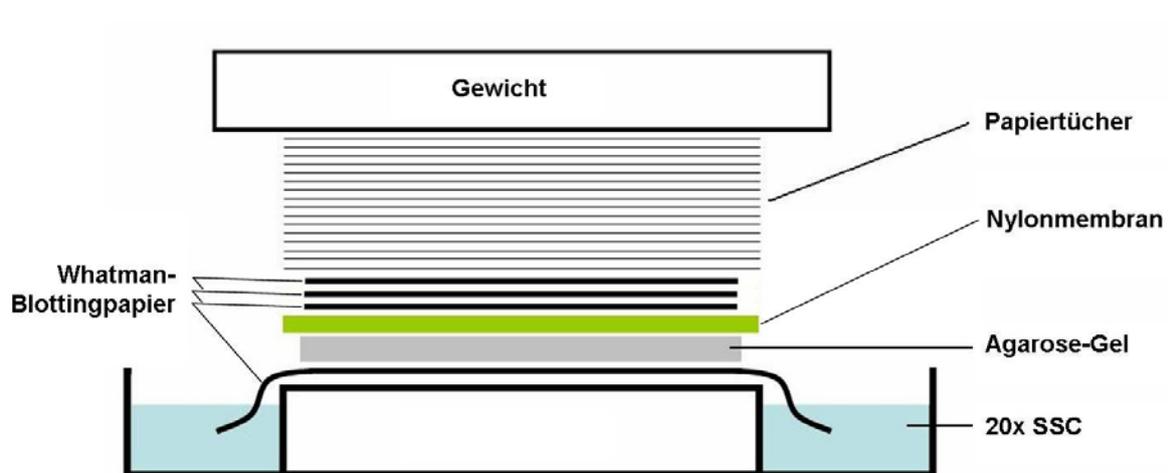


Abb. 5.1: Schematischer Aufbau eines Southern Blots

In den Tanks (unten) befindet sich 20x SSC zur Befeuchtung. Über eine Brücke aus *Whatman*[®]-Papier wird dieser Puffer aufgesogen. Auf der Brücke liegt, mit den Taschenöffnungen nach unten das Agarose-Gel (grau). Auf dem Gel wird die vor befeuchtete Nylonmembran (grün) möglichst Luftblasen frei platziert. Auf die Membran kommen 3 trockene *Whatman*[®]-Papiere und ein ca. 5 cm hoher Stapel aus saugfähigen Papieren. Oben auf den Aufbau kommt ein ~ 150 g schweres Gewicht.

Der Transfer erfolgte über Nacht. Vor dem Auseinanderbauen wurden der Marker und die Positionen der Taschen mit einem Bleistift auf der Membran markiert. Die Nylonmembran wurde anschließend von jeder Seite für eine Minute mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA zu fixieren. Anschließend wurde die Membran in einer Schraubdeckelglasröhre mit vorgewärmten DIG-Standard Hybridisierungspuffer inkubiert. Diese Prähybridisierung erfolgte für mindestens eine Stunde bei 68° C rollend im Hybridisierungssofen.

Zur Präparation der Sonde wurde das aufgereinigte DIG-markierte PCR-Produkt mit 40 µl sterilem Wasser in einem Eppendorfgesäß gemischt und anschließend für fünf Minuten bei ~ 95° C denaturiert. Nach der Hitzeeinwirkung wurde die Sonde kurz auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und anschließend zu 15 ml DIG-Standard Hybridisierungspuffer (ebenfalls auf 68° C vorgewärmt) gegeben. Die Membran wurde zusammen mit der Sonde über Nacht bei 68° C inkubiert. Die Sonde kann mehrmals wieder verwendet werden und wurde zur Lagerung bei -20° C eingefroren. Anschließend wurde wie folgt vorgegangen:

- Zweimal fünf Minuten waschen der Membran bei RT mit 2x Waschlösung
- Zweimal 15 Minuten waschen bei 68° C mit 0,5x Waschlösung
- fünf Minuten waschen bei RT mit Waschpuffer
- 1 Stunde Blockieren unspezifischer Bindestellen auf der Membran bei RT mit Blockingpuffer
- 30 Minuten Inkubation mit dem α-DIG-Antikörper, (alkalische Phosphatase-Konjugat, *Roche*)
- Zweimal 15 Minuten waschen bei RT mit Waschpuffer
- Äquilibrierung in AP-Puffer

Zur Entwicklung wurde die Membran auf eine Plastikfolie gelegt. Auf der Membranoberseite wurden 500 µl Farbreagenz (5 µl CDP Star, *Roche*, in 500 µl AP-Puffer) verteilt und eine zweite Folie aufgelegt. Nach ~ 10 Minuten Inkubation im Dunkeln wurden die Folien gewechselt und die Signale auf der Membran mittels Chemilumineszenzkamerasystem detektiert.

5.4.8 RNA-Isolierung aus *A. nidulans*

Es wurden 10⁶ Sporen in ca. 20 ml Flüssigmedium (mit entsprechenden Wachstumsfaktoren) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die an der Oberfläche gebildete Kahmhaut abgenommen, trocken getupft und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das zu Pulver zerkleinerte Myzel wurde in ein Eppendorfgesäß überführt (bis etwa zur 0,5 ml-Marke) und mit 1 ml TRI Reagent versetzt. Das Eppendorfgesäß wurde kurz gevortext und fünf Minuten auf Eis stehend inkubiert. Alle anschließenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 11.500 rpm und 4° C.

Tabelle 5.13: Lösungen zur RNA-Isolierung

Lösung	Zusammensetzung
Na-Citrat/NaCl	0,8 M Tri-Natrium-Citrat, 1,2 M NaCl
DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC/l H ₂ O

Nach der Inkubation auf Eis wurde 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde 15 Sekunden gevortext und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 Minuten, wonach die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Gefäß überführt wurde. Zu dieser Suspension wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und gevortext. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten. Erneut wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Dieser Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, gut gemischt und 10 Minuten zentrifugiert. Wieder wurde die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,25 ml Na-Citrat/NaCl und 0,25 ml 100% Isopropanol 30 Minuten auf Eis gefällt. Nach der Fällung wurde fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren von fünf Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet 10 - 15 Minuten bei RT luftgetrocknet und in 150 µl DEPC-Wasser gelöst. Dazu wurde die RNA mehrmals auf 65° C erwärmt und gevortext.

Die gelöste RNA wurde dann 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die Konzentration mittels Nanodrop-Spektrophotometer gemessen und bei -70° C eingefroren.

5.4.9 Northern Blot

Für den *Northern Blot* wurden 5 bzw. 10 µg Gesamt-RNA auf formaldehydhaltige (Endkonzentration: 1,925%) Agarosegele (1,2%) aufgetragen. Hier diente als Größenvergleich ein RNA-Marker (0,5-10 kb, *Invitrogen*). Vor dem Auftragen wurde 2x RNA *Loading Dye* (*Fermentas*) zu den Proben und dem Marker gegeben. Durch das im Ladepuffer enthaltene Ethidiumbromid wurden die 18 S und 28 S rRNA-Banden in den Proben und die Markerbanden unter UV-Licht sichtbar und konnten fotografiert werden.

Nach der RNA-Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, die Markerbanden mittels Pipettenspitze markiert und die Taschen abgeschnitten. Anschließend erfolgte der Aufbau des Blots (Abb. 5.2). Die Membran wurde vorher in 20x SSC äquilibriert und es wurde bei dem gesamten Aufbau darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen bildeten. Als Abdeckung, zur Verhinderung des Verdunstungssogs, diente der Gießschlitten des Agarosegels, der mit einem Gewicht von ~ 200 g beschwert wurde.

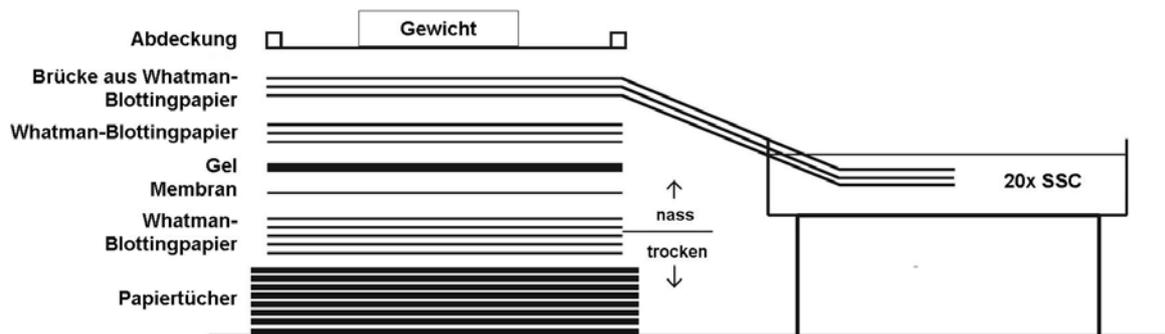


Abb. 5.2: downward transfer-Northern Blot (modifiziert nach Chomczynski, 1992)

Auf einem ca. 5 – 8 cm hohen Stapel aus saugfähigen Papiertüchern werden drei trockene und zwei nasse *Whatman*[®]-Blottingpapiere gelegt. Auf die *Whatman*[®]-Papiere kommt die positiv geladene Nylonmembran. Um Luftblasen zu vermeiden wird das Agarosegel von unten nach oben langsam auf die Nylonmembran gelegt. Ganz oben kommen drei Brücken aus *Whatman*[®]-Papier auf den Aufbau, die zum nebenstehenden Tank führen. Dieser ist mit 20x SSC gefüllt. Der *Northern Blot*-Aufbau wird mit einem Gel-Schlitten und einem ~ 200 g schweren Gewicht abgedeckt.

Nach ca. drei Stunden ist der Transfer beendet. Der Erfolg des Transfers wurde überprüft, indem die Membran unter UV-Licht fotografiert wurde. Bei erfolgreichem RNA-Transfer konnte man die RNA-Bande (auf Grund des Ethidiumbromid haltigen Ladepuffers) auf der Membran sehen. Zur späteren Überprüfung der Bandengröße nach dem Entwickeln wurden die Markerbanden auf der Membran mit Bleistift eingezeichnet. Anschließend wurde die Membran mit der RNA-Seite nach unten für ein bis zwei Minuten auf dem Transilluminator bei eingeschaltetem UV-Licht inkubiert. Dieser Schritt dient der kovalenten Quervernetzung der RNA mit der positiv geladenen Nylonmembran.

Im nächsten Schritt wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre überführt, mit ~ 15 ml vorgewärmter Prähybridisierungslösung (High-SDS-Lösung) versetzt und bei 42° C ein bis zwei Stunden in einem Hybridisierungssofen rollend inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Dazu wurde die DIG-markierte Sonde (Herstellung Kapitel 5.4.7) 10 Minuten auf 95° C erhitzt, kurz auf Eis gestellt, in ~ 15 ml vorgewärmte High-SDS-Lösung überführt und zur Membran gegeben. Die Sonde wurde nach Gebrauch bei -20° C eingefroren und konnte mehrmals verwendet werden.

Tabelle 5.14: Puffer für den *Northern-Blot*

Puffer	Zusammensetzung
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Tri-Natrium-Citrat; pH 7
High-SDS-Lösung (100ml)	7 g SDS; 50 ml Formamid; 25 ml 20x SSC; 20 ml 10x Blocking Solution; 5 ml Natrium-Phosphat-Puffer; 0,1 g N-Laurylsarkosin
Natriumphosphatpuffer	1 M NaH ₂ PO ₄ ; 1 M Na ₂ HPO ₄ ; pH 7
10x Blockinglösung	10% Blocking Reagenz (<i>Roche</i>) in Maleinsäurepuffer
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5
1x Waschlösung	1x SSC; 0,1% SDS
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer; 0,3% Tween 20
Blockingpuffer	1% Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer
AP-Puffer	0,1 M Tris-Cl pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂

Am nächsten Tag erfolgten das Waschen und Entwickeln der Membran. Zuerst wurde zweimal 15 Minuten bei RT und zweimal 15 Minuten bei 65° C mit der 1x Waschlösung gewaschen. Alle anschließenden Schritte erfolgten bei RT. Im Anschluss wurde fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen und die Membran 45 Minuten mit Blockingpuffer inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, *Roche*) in einer Verdünnung von 1:10.000 zum Blockingpuffer zugegeben. Nach 30 Minuten erfolgte erneut ein Waschschrift, zweimal 15 Minuten mit Waschpuffer. Als nächstes wurde die Membran fünf Minuten in AP-Puffer äquilibriert, bevor sie entwickelt wurde. Dazu wurde eine 1:100 Verdünnung von CDP-Star (*Roche*, Mannheim) in AP-Puffer auf die Membran pipettiert, ca. 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Chemilumineszenz, die durch die Spaltung des Substrates durch die alkalische Phosphatase des Antikörpers entsteht, mit dem Chemilumineszenzkamerasystem detektiert.

5.4.10 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der „SuperScript II RT“ (*Invitrogen*) und wurde laut Hersteller durchgeführt. Für eine zusätzliche Reinheit der cDNA wurde die RNA vor der reversen Transkription mit DNase behandelt. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA konnte dann als *Template* in einer PCR verwendet werden.

5.4.11 Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementations Ansatz (BiFC)

Um Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen zu können wurde der BiFC-Ansatz verwendet. Hierbei wurden die beiden Proteine von Interesse mit jeweils einer Hälfte des YFP-Proteins fusioniert. Nur wenn beide Hälften in ausreichende Nähe gebracht wurden, d.h. wenn beide Proteine miteinander interagieren, wurde die Struktur und Funktionalität des YFP wieder hergestellt. Die zu untersuchenden Proteine wurden jeweils am C-Terminus mit einer YFP-Hälfte fusioniert und unter der Kontrolle des natürlichen Promotors exprimiert. Die Anzucht der Stämme und mikroskopische Kontrolle erfolgte wie in 5.6 beschrieben.

5.4.12 Insertion eines Peptides via Primerligation

Die Peptide wurden an den N-Terminus des *yaaD* fusioniert. Dazu wurden Primer synthetisiert, die die Sequenzen der Promotorregion zwischen den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NcoI* enthalten. Das *yaaD*-Gen *downstream* des Peptides bleibt Leseraster. Die Primer von MWG (Ebersberg) wurden dort nach der Synthese wegen Ihrer Länge durch HPLC aufgereinigt. Der *forward*- und *reverse*-Primer jedes Peptides wurden in PCR-Puffer bei 95° C für eine Minute inkubiert und anschließend auf RT herunter gekühlt, um die Doppelstrangbildung zu ermöglichen. Die Vektoren pBASF1 und pBASF2 wurden mit *EcoRI* und *NcoI* verdaut. Anschließend wurden die Vektor-Banden aus dem Agarosegel mit dem „Zymo Gel DNA Recovery Kit“ (ZymoResearch, Freiburg)) aufgereinigt und mit den doppelsträngigen Primern über Nacht ligiert. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* XL-1 blue Zellen transformiert. Die korrekten Integrationen wurden mittels Sequenzierung (MWG) bestätigt.

5.4.13 Insertion eines Peptides via Vektormutation (Site-directed mutagenesis)

Das Einführen der Peptidmutation wurde mit Hilfe des „QuickChangeXL Site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Amsterdam) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dabei wurde für im Vektor pBASF2 hinter dem ATG des yaaD-Fusionspetid an der Position 118 erst 5 Nukleotide und im zweiten Schritt weitere 4 Nukleotide eingefügt. Für die PCR wurde die *Pfu-Turbo-Polymerase (Stratagene)* verwendet. Als Oligonukleotide dienten die komplementären Primer, die die gewünschte Mutation trugen. Als Vorlage wurde Plasmid-DNA eingesetzt. Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde die DNA für eine Minute bei 95°C denaturiert. Dann folgten 18 Zyklen bei 95°C 50 Sekunden, 60°C 50 Sekunden, 68°C 7 bis 12 Minuten (1 min pro kb), sowie ein finaler Amplifikationsschritt von 7 Minuten bei 68°C. Anschließend wurde das methylierte Vorlagen-Plasmid mit *DpnI* verdaut und das mutierte Plasmid in TOP10-Zellen transformiert. Die Punktmutationen wurden mittels Sequenzierung (*MWG, Ebersberg*) bestätigt.

5.5 Biochemische Methoden

5.5.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle Komponenten und Puffer für die SDS-PAGE wurden, wie in Sambrook & Russel (Appendix 8; Gele auf Seite A8.43; Sambrook & Russell, 2000) beschrieben, hergestellt. Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden SDS-Gele mit unterschiedlichem Anteil an Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1), *Roth*) vorbereitet. Üblicherweise wurde ein 10%iges Gel verwendet. Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95° C denaturiert. Als Größenstandards wurden Roti-Mark Standard Prestained (*Roth*) und PAGE Ruler Prestained (*Fermentas*) benutzt. Zum Anfertigen der Polyacrylamidgele und zur Gelelektrophorese wurde das „Mini Protean“ System von *Bio-Rad* (München) verwendet. Anschließend wurde das Gel für einen *Western Blot* (Kapitel: 5.6.2) verwendet oder mittels Coomassie gefärbt.

Bei einer Coomassie-Färbung wurde das SDS-Gel für mindestens 30 Minuten in der Färbelösung inkubiert und im Anschluss für mehrere Stunden entfärbt, wobei der Entfärber ein bis zweimal erneuert wurde. Bis zur vollständigen Hintergrund-Entfärbung wurde das Gel mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen. Alle Schritte wurden auf einem Schütteltisch durchgeführt.

Tabelle 5.15: Lösungen für die SDS-PAGE

Lösungen	Zusammensetzung
4x SDS-Ladepuffer	200 mM Tris-Cl pH 6,8; 400 mM DTT; 8% SDS; 0,4% Bromphenolblau; 40% Glycerol
Coomassie-Färbelösung	0,1% <i>Serva Blue R</i> , 45% Ethanol, 10% Essigsäure
Entfärber	20% Ethanol; 10% Essigsäure

5.5.2 Western Blot

Tabelle 5.16: Lösungen für den *Western Blot*

Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	12 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,01% SDS; 20% Methanol
PonceauS-Lösung	0,5% PonceauS in 5% Trichloressigsäure
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,3
TBS	20 mM Tris-Cl pH 7,5; 140 mM NaCl
TBS-T	0,1% Tween 20 in TBS
Blockingpuffer	5% Magermilch in PBS
Verdünnungspuffer	1% Magermilch in TBS-T
Bromochloroindolyphosphat (BCIP) (<i>Roche</i> , Mannheim)	50 mg/ml in 100% Dimethylformamid
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) (<i>Roche</i> , Mannheim)	50 mg/ml in 70% Dimethylformamid
AP-Puffer	100 mM Diethanolamin; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; pH 9,5

In dieser Arbeit wurde im Tank-Blot-Verfahren mit der Apparatur „Mini Trans Blot Cell“ von *Bio-Rad* (München) gearbeitet. Ein SDS-Gel wurde zusammen mit einer Nitrocellulosemembran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran, *Whatman*[®], Dassel) luftblasenfrei aufeinander gelegt und zwischen in Puffer getränkte Filterpapiere so in die Apparatur eingebaut, dass sich die Membran auf der Seite der positiven Elektrode befand.

Der Proteintransfer erfolgte im Transferpuffer für eine Stunde bei 100 V und 150 mA oder über Nacht bei 30 V und 40 mM unter kühlen Bedingungen.

Durch Anfärben der Nitrocellulosemembran mit PonceauS-Lösung wurde der Proteintransfer überprüft. Zum Abdecken unspezifischer Bindestellen wurde die Membran entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C in Blockingpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran zweimal fünf Minuten mit 20 ml TBS-T gewaschen. Der Antikörper Anti-His(C-Term)-AP von *Invitrogen* wurde im Verhältnis 1:2.000 in Verdünnungspuffer verdünnt und zur Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei RT rollend. Durch viermaliges Waschen der Membran mit 20 ml TBS-T für jeweils 10 Minuten wurde ungebundener Antikörper abgespült und durch zweimaliges Waschen mit TBS wird die Detergens (Tween 20) entfernt.

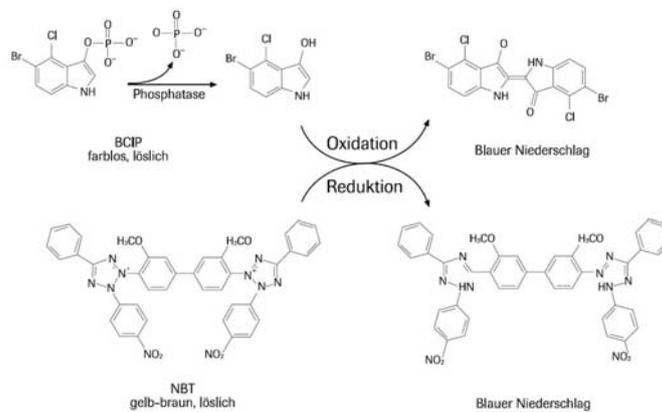


Abb. 5.3: Reaktionsschema der Farbstoff-erzeugenden Redox-Reaktion

Vermittelt durch die alkalische Phosphatase wird ein Phosphat am BCIP abgespalten. Dadurch kann es mit NBT reagieren. Im Anschluss an die ReOx-Reaktion mittels der Reaktionsprodukte ein blauer Niederschlag sichtbar. (Quelle: www.roche.de)

Für die Färbung des Blots wurden 66 µl des NBT zu 10 ml AP-Puffer gegeben und gut gemischt, dann wurden 33 µl BCIP zu dieser Lösung pipettiert und ebenfalls gemischt. Die Färbelösung musste zur Verwendung frisch angesetzt werden. Diese Färbelösung wurde auf die Membran gegeben und im Dunkeln bei RT inkubiert. Dabei wurde ab und zu die Farbentwicklung kontrolliert. Je nach Protein-Konzentration war eine Färbung nach 10 - 30 Minuten sichtbar. Um die Farbentwicklung zu stoppen wurde 10 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen, dabei wurde das Wasser einmal gewechselt. Anschließend wurde der Blot an der Luft getrocknet.

5.5.3 Dot Blot

Um die Expression der Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteine nachzuweisen wurde ein *Dot Blot* durchgeführt. Dafür wurde eine Nitrocellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert, in die *Dot Blot*-Apparatur eingespannt und diese unter Vakuum gesetzt. Es wurden jeweils 30 µl der Probe punktförmig aufgetragen und für einige Minuten einziehen lassen. Die Membran wurde im Anschluss mit Blockingpuffer versetzt. Alle weiteren Schritte wurden wie in Kapitel 5.5.3 durchgeführt.

5.5.4 Proteinexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Für Proteinexpressionen wurde der *E. coli*-Stamm Rossetta (*DE3*)*pLysS* frisch mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert und die so erzeugten Kolonien bis zu vier Wochen verwendet. Für jede neue Kultivierung wurde mit einer frischen Kolonie beimpft. Für eine Vorkultur wurde LB-Medium (plus Selektionsantibiotikum) mit der Rossetta (*DE3*)*pLysS*-Transformante beimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Die Hauptkultur (meist 0,5 l in 2 l-Erlenmeyerkolben) wurde dann mit einem zwanzigstel Volumen (25 ml) aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde etwa 2 - 3 Stunden bei 37° C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ~ 0,8 geschüttelt. Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert und die Expression für vier bis sechs Stunden bei 37° C (oder über Nacht) durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 15.000 rpm, 4° C für 15 Minuten (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor) geerntet. Das Pellet wurde, falls nicht gleich verwendet, bei -80° C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Für den nächsten Schritt wurde das Gewicht des Zellpellets aus Expressionskultur ermittelt und pro Gramm Biofeuchtmasse (BFM) 1 ml 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,5 zugegeben.

Der Zellaufschluss erfolgte unter Kühlung an einer „*French Pressure Cell Press*“ (*American Instrument Company*, Maryland; USA) mit einer Druckeinstellung von 800 PSI (*Pound-force per square inch* = Pfund pro Quadratzoll), dies entspricht ca. 55 bar. Durch anschließende Zentrifugation für 30 Minuten bei 10.000 rpm, 4° C (GSA-Rotor) wurde mit dem Überstand der Protein-Gesamtextrakt gewonnen.

5.5.5 Schnelltest auf Proteinexpression in *E. coli*

Sollte ein neu hergestelltes Expressionskonstrukt in *E. coli* exprimiert werden, wurde zunächst in einem kleineren Maßstab getestet. Für solch einen Schnelltest wurde der Zellaufschluss ausgehend von 50 ml Hauptkultur. Die Proteinexpression wurde ab einer OD_{600} von $\sim 0,7$ mit 0,5 mM IPTG induziert. Alle Kulturen wurden anschließend für vier bis sechs Stunden bei 37° C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die OD_{600} (als 1:10-Verdünnung) ermittelt und eine BFM, die einer OD_{600} von 1/ml entspricht, abzentrifugiert.

So wurde gewährleistet, dass bei vergleichenden Ansätzen überall von der gleichen BFM ausgegangen werden konnte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für fünf Minuten, 4° C gewonnen. Die Zellpellets wurden für mindestens 20 Minuten bei -20° C eingefroren und anschließend mit 50 μ l H₂O versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte am Ultraschallgerät (Labsonic M; *B. Braun Biotech International*, Melsungen), wobei pro Ansatz viermal eine Minute (2 Sekunden Pulse/eine Minute Pausen, Amplitude 70%) im Kühlblock gepulst wurde. Für die SDS-PAGE wurden 4x Ladepuffer zugegeben und $\sim 5 \mu$ l geladen.

5.5.6 Heterologe Expression und Aufreinigung von DewA-Fusionsproteinen mittels Ni-Affinitätschromatographie

Die Expression der DewA-Fusionsproteine erfolgte als His-Tag-Fusionsprotein. Die Kultivierung der transformierten Rossetta (*DE3*)*pLysS*, die die DewA-Fusionsprotein-Vektoren enthielten, erfolgte in EC3-Medium + Ampicillin. Die Proteinexpression wurde bei einer OD_{600} von ca. 0,5 mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG für vier bis sechs Stunden bei 37° C induziert. Ernten der Bakterien bei 16.000 g 10 Minuten im GSA Rotor (*Sorvall* Zentrifuge). Sollte Pellet nicht direkt verwendet werden, wurde es bei -70° C eingefroren und zur Verwendung auf Eis aufgetaut. Das Zellpellet wurde gewogen und in 10 ml/g BFM Lysispuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte an der *French Pressure Cell Press*“ (*American Instrument Company*, Einstellungen Kapitel 5.5.3). Anschließend wurden die Zelltrümmer von der Suspension durch Zentrifugation des Lysats bei 160.000 g für 30 Minuten bei 4° C angetrennt. In der Suspension sollten sich aufgrund der hohen Harnstoff-Konzentration auch die unlöslichen Proteine befinden. Zur Kontrolle wurde eine Probe von 500 μ l entnommen, die als Rohextrakt (RE) für spätere Analyse via SDS-PAGE diente.

Tabelle 5.17: Puffer für die Aufreinigung mittels Ni-Affinitätschromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Lysispuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; 20 mM Imidazol; pH-Wert 8,0
Waschpuffer I	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; 50 mM Imidazol; pH-Wert 6,3
Waschpuffer II	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; 100 mM Imidazol; pH-Wert 6,3
Elutionspuffer I	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; 300 mM Imidazol; pH-Wert 5,5
Elutionspuffer II	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; 400 mM Imidazol; pH-Wert 4,5

Die Aufreinigung der exprimierten Proteine erfolgte als Ni-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren bei 4° C. Hierfür musste das Säulenmaterial Ni-Sepharose™ Fast Flow (1:1 in 20% Ethanol, *GE Healthcare*) äquilibriert werden. In einem Eppendorfgefäß wurde 1 ml Säulenmaterial mit 1 ml Lysispuffer vermengt und zu der Zellsuspension gegeben, vermischt und bei 800 rpm fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 1 ml neuer Lysispuffer zugegeben und der Vorgang wiederholt. Im Anschluss wurde das Säulenmaterial zur Suspension gegeben und eine Stunde bei RT rollend inkubiert. Danach wurde das Gemisch in eine Leersäule gefüllt und, so dass das Säulenmaterial mit dem gebundenen Protein in der Säule verblieb und damit vom übrigen Durchfluss (FT) getrennt wurde. Vom Durchfluss wurde eine Probe für die SDS-PAGE entnommen. Nach der Sedimentation wurde dann zweimal mit 4 ml Waschpuffer I (W1) gewaschen und der Durchfluss für die SDS-PAGE aufgefangen, anschließend wurde dies mit 4 ml Waschpuffer II (W2) wiederholt. Die Elution erfolgte viermal mit 0,5 ml Elutionspuffer I und viermal 0,5 ml Elutionspuffer II. Alle Fraktionen wurden in der SDS-PAGE getestet.

5.5.7 Heterologe Expression und Aufreinigung von DewA-Fusionsproteinen mittels Separation der Einschlusskörperchen (Inclusion bodies = IB)

Die Expression der DewA-Peptid-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* Rossetta (DE3)pLysS in EC3-Medium + Ampicillin. Die Proteinexpression wurde bei einer OD_{600} zwischen 0,7 - 0,9 mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG für vier bis sechs Stunden oder über Nacht bei 37° C induziert. Um die Zellen zu ernten, wurde 30 Minuten bei 10.000 rpm (GSA-Rotor) zentrifugiert und die BFM wurde, falls nicht direkt weiterverarbeitet, bei -20° C gelagert.

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte durch Abtrennung und Reinigung der IBs. Das Zellpellet aus der 0,5 L-Kultur wurde in 10 ml/g BFM 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7,5 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter Kühlung an der *French Pressure Cell Press* (American Instrument Company, Einstellungen Kapitel 5.5.3). Anschließend wurde alle Zentrifugationsschritte in einem 50 ml-Reaktionsgefäß bei 5.000 rpm, 30 Minuten, 4° C durchgeführt, um die IBs von den Zelltrümmern und den löslichen Proteinen abzutrennen.

Zunächst wurde die gleiche Menge an 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7,5 zum Pellet zugegeben, resuspendiert und wieder durch Zentrifugation pelletiert. Als nächstes wurde ca. 40 ml Reinstwasser zum Pellet zugegeben, dieses gelöst und wieder zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Um die IBs aufzuschließen wurde nun das übrig gebliebene Pellet gewogen und mit ~ 10% Reinstwasser resuspendiert, Dazu wurde 0,1 M NaOH gegeben (111 µl in 10 ml) und 20 Minuten auf dem Magnetrührer gemischt. Dies diente zur Solubilisierung der IBs. Mit 20% H_3PO_4 wurde dann ein pH von 8,5 - 9 eingestellt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Diesmal befand sich das Protein im Überstand. Dieser wurde nach Abnahme eine Probe für die SDS-PAGE gefriergetrocknet.

5.5.8 Beschichtung von Oberflächen

Zur Beschichtung der verschiedenen Oberflächen mit den Hydrophobinen wurde das Hydrophobin gekoppelt mit dem YaaD-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und verwendet. Die Lösungen zur Beschichtung sind in Tabelle 5.18 aufgeführt.

Zuerst wurde eine Stammlösung von 1 mg/ml des Proteins hergestellt. Dazu wurde das getrocknete Protein im Beschichtungspuffer gelöst, und zwei bis drei Stunden bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt. Die zu beschichtenden Oberflächen wurden gründlich mit 70%igem

EtOH gereinigt und die Proteinkonzentration auf 50 µg/ml eingestellt. Die Oberflächen wurden 16 Stunden bei 80° C in der Hydrophobinlösung inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal 10 Minuten mit sterilem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

Tabelle 5.18: Verwendete Lösungen für die Hydrophobinbeschichtung

Lösung	Zusammensetzung
Beschichtungspuffer	50mM Tris pH 8, 1 mM CaCl ₂

5.6 Mikroskopie

Tabelle 5.19: Filter für die Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz	Erregerfilter (BP)	Farbteiler	Sperrfilter (LP)
GFP	450-490 nm	510 nm	520 nm
YFP	D 510/20	530 DCLP	D 560/40

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die entsprechenden *A. nidulans*-Stämme auf Minimalmedium-Platten mit 2% Threonin (+ Supplemente), um den *alcA*-Promotor zu induzieren oder auf Minimalmedium-Platten mit 2% Glukose (+ Supplemente), bei Verwendung des natürlichen Promotor, angeimpft und für 48 Stunden bei 37° C inkubiert. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem 63-er Objektiv durchgeführt. Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde das DIC-Verfahren (Differentialer Interferenzkontrast = engl.: differential interference contrast) angewendet. Zur Bildaufnahme diente die Zeiss AxioCamMR und als Quelle für Fluoreszenzlicht eine HBO100 Quecksilberdampf Lampe. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden folgende Filter verwendet:

5.6.1 Konfokales Laser-Scanning Mikroskop

Die konfokalen Mikroskopaufnahmen wurden mit dem TCS SP5 von Leica (Wetzlar) aufgenommen. Verwendet wurde ein 100x Immersionsöl-Objektiv. Der Laser DPSS 561 mW (561 nm, Laserpower 30%) wurde für die Anregung der mRFP Fluoreszenz verwendet. Zur Verbesserung der Aufnahmequalität wurde der Notchfilter 488/561/633 verwendet. Die Proben wurden wie in 5.6 vorbereitet.

6 Literatur

- Adams, T. H., Boylan, M. T., & Timberlake, W. E. (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 54(3), 353-62.
- Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(1), 35-54.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., et al. (2005). *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie* (thrid.). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Andrianopoulos, A., & Timberlake, W. E. (1994). The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Molecular and Cellular Biology*, 14(4), 2503-15.
- Asgeirsdóttir, S. A., Halsall, J. R., & Casselton, L. A. (1997). Expression of two closely linked hydrophobin genes of *Coprinus cinereus* is monokaryon-specific and down-regulated by the *oid-1* mutation. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 22(1), 54-63.
- Askolin, S., Nakari-Setälä, T., & Tenkanen, M. (2001). Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(1-2), 124-30.
- Askolin, S., Linder, M., Scholtmeijer, K., Tenkanen, M., Penttilä, M., Vocht, M. L. de, et al. (2006). Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules*, 7(4), 1295-301.
- Askolin, S., Penttilä, M., Wösten, H. A. B., & Nakari-Setälä, T. (2005). The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development. *FEMS microbiology letters*, 253(2), 281-8.

- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., *et al.* (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(5), 326-32.
- Aumailley, M., El Khal, A., Knöss, N., & Tunggal, L. (2003). Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 22(1), 49-54.
- Bailey, M. J., Askolin, S., Hörhammer, N., Tenkanen, M., Linder, M., Penttilä, M., *et al.* (2002). Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobins I and II in transformants of *Trichoderma reesei*. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(6), 721-7.
- Banerjee, G., Robertson, D. L., & Leonard, T. J. (2008). Hydrophobins Sc3 and Sc4 gene expression in mounds, fruiting bodies and vegetative hyphae of *Schizophyllum commune*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 45(3), 171-9.
- Beever, R. E., & Dempsey, G. P. (1978). Function of rodlets on the surface of fungal spores. *Nature*, 272(5654), 608-10.
- Beever, R. E., Redgwell, R. J., & Dempsey, G. P. (1979). Purification and chemical characterization of the rodlet layer of *Neurospora crassa* conidia. *Journal of bacteriology*, 140(3), 1063-70.
- Bilewicz, R., Witomski, J., Van Der Heyden, A., Tagu, D., Palin, B., & Rogalska, E. (2001). Modification of Electrodes with Self-Assembled Hydrophobin Layers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(40), 9772-9777.
- Binnig, G., Quate, C., & Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical review letters*, 56(9), 930-933.
- Brody, H., & Carbon, J. (1989). Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), 6260-3.
- Bürglin, T. R. (1991). The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell*, 66(1), 11-2.

- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., *et al.* (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 7877-82.
- Cannizzaro, S. M., Padera, R. F., Langer, R., Rogers, R. A., Black, F. E., Davies, M. C., *et al.* (1998). A novel biotinylated degradable polymer for cell-interactive applications. *Biotechnology and bioengineering*, 58(5), 529-35.
- Carter, W. G., Ryan, M. C., & Gahr, P. J. (1991). Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell*, 65(4), 599-610.
- Casselton, L., & Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature reviews. Genetics*, 3(9), 683-97.
- Chang, Y. C., & Timberlake, W. E. (1993). Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics*, 133(1), 29-38.
- Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical biochemistry*, 201(1), 134-9.
- Claessen, D., Rink, R., Jong, W. de, Siebring, J., Vreugd, P. de, Boersma, F. G. H., *et al.* (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & development*, 17(14), 1714-26.
- Claverie-Martin, F., Diaz-Torres, M. R., & Geoghegan, M. J. (1986). Chemical Composition and Elektron Microscopy of the Rodlet Layer of *Aspergillus nidulans* Conidia. *Curr Microbiol*, 14(4), 221-225.
- Clutterbuck, A. J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 63(2), 317-27.
- Corvis, Y., Walcarius, A., Rink, R., Mrabet, N. T., & Rogalska, E. (2005). Preparing catalytic surfaces for sensing applications by immobilizing enzymes via hydrophobin layers. *Analytical chemistry*, 77(6), 1622-30.

- De Groot, P. W., Roeven, R. T., Van Griensven, L. J., Visser, J., & Schaap, P. J. (1999). Different temporal and spatial expression of two hydrophobin-encoding genes of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 5, 1105-13.
- De Groot, P.W. J., Brandt, B. W., Horiuchi, H., Ram, A. F. J., Koster, C. G. de, & Klis, F. M. (2009). Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 46 Suppl 1(1), S72-81. Elsevier Inc.
- De Groot, P. W. J., Ram, A. F., & Klis, F. M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 42(8), 657-75.
- De Vries, O. M. H., Fekkes, M. P., Wösten, H. A. B., & Wessels, J. G. H. (1993). Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch Microbiol*, 159(4), 330-335.
- Dempsey, G. P., & Beever, R. E. (1979). Electron microscopy of the rodlet layer of *Neurospora crassa* conidia. *Journal of bacteriology*, 140(3), 1050-62.
- Dons, J. J., Springer, J., Vries, S. C. de, & Wessels, J. G. (1984). Molecular cloning of a gene abundantly expressed during fruiting body initiation in *Schizophyllum commune*. *Journal of bacteriology*, 157(3), 802-8.
- Efimov, V. P., Zhang, J., & Xiang, X. (2006). CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans*. *Molecular biology of the cell*, 17(4), 2021-34.
- Eisenhaber, B, Bork, P., & Eisenhaber, F. (2001). Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein engineering*, 14(1), 17-25.
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M., & Eisenhaber, F. (2004). A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida*

albicans, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of molecular biology*, 337(2), 243-53.

FAZ. (2007). Ein Regenmantel für Pilze. *Franfurter Allgemeine Zeitung*, Oktober(10).

Ferguson, M. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *Journal of cell science*, 112 (Pt 1, 2799-809.

Ferguson, M. A., Homans, S. W., Dwek, R. A., & Rademacher, T. W. (1988). Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4841 Pt 1), 753-9.

Fischer, R., & Timberlake, W. E. (1995). *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *The Journal of cell biology*, 128(4), 485-98.

Flier, A. van der, & Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell and tissue research*, 305(3), 285-98.

Fujita, M., & Jigami, Y. (2008). Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(3), 410-20.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., et al. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1105-15.

Gebbink, M. F. B. G., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, Lubbert, & Wösten, H. A. B. (2005). Amyloids--a functional coat for microorganisms. *Nature reviews. Microbiology*, 3(4), 333-41.

Hakanpää, J., Linder, M., Popov, A., Schmidt, A., & Rouvinen, J. (2006a). Hydrophobin HFBII in detail: ultrahigh-resolution structure at 0.75 Å. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 62(Pt 4), 356-67.

- Hakanpää, J., Szilvay, G. R., Kaljunen, H., Maksimainen, M., Linder, M., & Rouvinen, J. (2006b). Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI--the structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 15(9), 2129-40.
- Hansen, J. E., Lund, O., Tolstrup, N., Gooley, A. A., Williams, K. L., & Brunak, S. (1998). NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconjugate journal*, 15(2), 115-30.
- Hektor, H. J., & Scholtmeijer, K. (2005). Hydrophobins: proteins with potential. *Current opinion in biotechnology*, 16(4), 434-9.
- Hersel, U., Dahmen, C., & Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24(24), 4385-415.
- Hess, W. M., Sassen, M. M., & Remsen, C. C. (1968). Surface characteristics of *Penicillium conidia*. *Mycologia*, 60(2), 290-303.
- Hess, W. M., & Stocks, D. L. (1968). Surface characteristics of *Aspergillus conidia*. *Mycologia*, 61(3), 560-71.
- Hirosaki, T., Mizushima, H., Tsubota, Y., Moriyama, K., & Miyazaki, K. (2000). Structural requirement of carboxyl-terminal globular domains of laminin alpha 3 chain for promotion of rapid cell adhesion and migration by laminin-5. *The Journal of biological chemistry*, 275(29), 22495-502.
- Hynes, R. O., & Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *The Journal of cell biology*, 150(2), F89-96.
- Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(4), 409-17.
- Janssen, M. I., Leeuwen, M. B. M. van, Kooten, T. G. van, Vries, J. de, Dijkhuizen, L., & Wösten, H. A. B. (2004). Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state. *Biomaterials*, 25(14), 2731-9.

- Janssen, M. I., Leeuwen, M. B. M. van, Scholtmeijer, K., Kooten, T. G. van, Dijkhuizen, L., & Wösten, H. A. B. (2002). Coating with genetic engineered hydrophobin promotes growth of fibroblasts on a hydrophobic solid. *Biomaterials*, 23(24), 4847-54.
- Joensuu, J. J., Conley, A. J., Lienemann, M., Brandle, J. E., Linder, M. B., & Menassa, R. (2010). Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant physiology*, 152(2), 622-33.
- Kantlehner, M., Finsinger, D., Meyer, J., Schaffner, P., Jonczyk, A., Diefenbach, B., et al. (1999). Selective RGD-Mediated Adhesion of Osteoblasts at Surfaces of Implants. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(4), 560-562.
- Kantlehner, M., Schaffner, P., Finsinger, D., Meyer, J., Jonczyk, A., Diefenbach, B., et al. (2000). Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 1(2), 107-14.
- Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et biophysica acta*, 1426(2), 373-83.
- Kerppola, T. K. (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chemical Society reviews*, 38(10), 2876-86.
- Kershaw, M. J., Wakley, G., & Talbot, N. J. (1998). Complementation of the *mpg1* mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *The EMBO journal*, 17(14), 3838-49.
- Kim, J.-M., Park, W. H., & Min, B.-M. (2005). The PPFLMLLLKGSTR motif in globular domain 3 of the human laminin-5 alpha3 chain is crucial for integrin alpha3beta1 binding and cell adhesion. *Experimental cell research*, 304(1), 317-27.

- Kim, S., Ahn, I.-P., Rho, H.-S., & Lee, Y.-H. (2005). MHP1, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Molecular microbiology*, 57(5), 1224-37.
- Kirkland, B. H., & Keyhani, N. O. (2010). Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E. coli*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*.
- Klees, R. F., Salaszyk, R. M., Vandenberg, S., Bennett, K., & Plopper, G. E. (2007). Laminin-5 activates extracellular matrix production and osteogenic gene focusing in human mesenchymal stem cells. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 26(2), 106-14.
- Krüger, M., Sievers, N., & Fischer, R. (1997). Molekularbiologie der Sporentragerentwicklung des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans*. *Biologie in unserer Zeit*, 27(6), 375-382.
- Kwan, A. H. Y., Winefield, R. D., Sunde, M., Matthews, J. M., Haverkamp, R. G., Templeton, M. D., *et al.* (2006). Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3621-6.
- Kwan, A. H., Macindoe, I., Vukasin, P. V., Morris, V. K., Kass, I., Gupte, R., *et al.* (2008). The Cys3-Cys4 loop of the hydrophobin EAS is not required for rodlet formation and surface activity. *Journal of molecular biology*, 382(3), 708-20.
- Kück, U., Nowrousian, M., Hoff, B., & Engh, I. (2009). *Schimmelpilze*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Lacroix, H., & Spanu, P. D. (2009). Silencing of six hydrophobins in *Cladosporium fulvum*: complexities of simultaneously targeting multiple genes. *Applied and environmental microbiology*, 75(2), 542-6.
- Lacroix, H., Whiteford, J. R., & Spanu, P. D. (2008). Localization of *Cladosporium fulvum* hydrophobins reveals a role for HCf-6 in adhesion. *FEMS microbiology letters*, 286(1), 136-44.

- Lahtinen, T., Linder, M. B., Nakari-Setälä, T., & Oker-Blom, C. (2008). Hydrophobin (HFBI): A potential fusion partner for one-step purification of recombinant proteins from insect cells. *Protein expression and purification*, 59(1), 18-24.
- Latgé, J.-P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology*, 66(2), 279-90.
- Leidich, S. D., Drapp, D. A., & Orlean, P. (1994). A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 269(14), 10193-6.
- Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M. R., & Penttilä, M. (2001). The hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules*, 2(2), 511-7.
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., & Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 29(5), 877-96.
- Lugones, L. G., Bosscher, J. S., Scholtmeyer, K., Vries, O. M. de, & Wessels, J. G. (1996). An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology (Reading, England)*, 142 (Pt 5(5), 1321-9.
- Lugones, L. G., Scholtmeijer, K., Klootwijk, R., & Wessels, J. G. (1999). Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. *Molecular microbiology*, 32(4), 681-9.
- Lugones, L. G., Wösten, H. A., Birkenkamp, K. U., Sjollema, K. A., Zagers, J., & Wessels, J. G. (1999). Hydrophobins line air channels in Fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*. *Mycol Res*, 103(5), 635-640.
- Lugones, L. G., Wösten, H. A., & Wessels, J. G. (1998). A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus*

- (common white button mushroom). *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 8, 2345-53.
- Mackay, J P, Matthews, J. M., Winefield, R. D., Mackay, L. G., Haverkamp, R. G., & Templeton, M. D. (2001). The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures. *Structure (London, England : 1993)*, 9(2), 83-91.
- Marshall, M. A, & Timberlake, W. E. (1991). *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Molecular and cellular biology*, 11(1), 55-62.
- Mayor, S., & Riezman, H. (2004). Sorting GPI-anchored proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(2), 110-20.
- McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., & Chen, C. S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental cell*, 6(4), 483-95.
- Mulder, G. H., & Wessels, J. G. (1986). Molecular Cloning of RNAs Differentially Expressed in Monokaryons and Dikaryons of *Schizophyllum commune* in relation to Fruiting. *Experimental Mycology*, 10, 214-227.
- Munk, K., Dersch, P., Eikmanns, B., Eikmanns, M., Fischer, R., Jahn, D., *et al.* (2008). *Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., *et al.* (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172(3), 1557-66.
- Niessen, C. M., Hogervorst, F., Jaspars, L. H., Melker, A. A. de, Delwel, G. O., Hulsman, E. H., *et al.* (1994). The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Experimental cell research*, 211(2), 360-7.
- Nozaki, M., Ohishi, K., Yamada, N., Kinoshita, T., Nagy, A., & Takeda, J. (1999). Developmental abnormalities of glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient embryos revealed by Cre/loxP system. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(3), 293-9.

- Olbrich, K. C., Andersen, T. T., Blumenstock, F. A., & Bizios, R. (1996). Surfaces modified with covalently-immobilized adhesive peptides affect fibroblast population motility. *Biomaterials*, 17(8), 759-64.
- Orlean, P., & Menon, A. K. (2007). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *Journal of lipid research*, 48(5), 993-1011.
- Paananen, A., Vuorimaa, E., Torkkeli, M., Penttilä, M., Kauranen, M., Ikkala, O., *et al.* (2003). Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry*, 42(18), 5253-8.
- Paris, S., Debeaupuis, J.-P., Crameri, R., Carey, M., Charlès, F., Prévost, M. C., *et al.* (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), 1581-8.
- Pierschbacher, M. D., & Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309(5963), 30-3.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D., & Bufton, A. W. J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics*, 5, 141-238.
- Qin, M., Wang, L.-K., Feng, X.-Z., Yang, Y.-L., Wang, R., Wang, C., *et al.* (2007). Bioactive surface modification of mica and poly(dimethylsiloxane) with hydrophobins for protein immobilization. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23(8), 4465-71.
- Ruoslahti, E., & Pierschbacher, M. D. (1986). Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*, 44(4), 517-8.
- Sakai, A., Kita, M., Katsuragi, T., Ogasawara, N., & Tani, Y. (2002). *yaaD* and *yaaE* are involved in vitamin B6 biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(3), 309-12.

- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Volume* (3rd ed., p. 999). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sassen, M. M., Remsen, C. C., & Hess, W. M. (1967). Fine structure of *Penicillium megasporum* conidiospores. *Protoplasma*, 64(1), 75-88.
- Schaffner, P., Meyer, J., Dard, M., Wenz, R., Nies, B., Verrier, S., et al. (1999). Induced tissue integration of bone implants by coating with bone selective RGD-peptides in vitro and in vivo studies. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 10(12), 837-9.
- Scholtmeijer, K., Janssen, M. I., Gerssen, B., Vocht, M. L. de, Leeuwen, B. M. van, Kooten, T. G. van, et al. (2002). Surface modifications created by using engineered hydrophobins. *Appl Environ Microbiol*, 68(3), 1367-1373.
- Schuren, F. H., & Wessels, J. G. (1990). Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene*, 90(2), 199-205.
- Sewall, T. C., Mims, C. W., & Timberlake, W. E. (1990). *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *The Plant cell*, 2(8), 731-9.
- Sievers, N., Krüger, M., & Fischer, R. (1997). Kreuzung von *Aspergillus nidulans*. *Biologie in unserer Zeit*, 27(6), 383-388.
- Stringer, M. A., Dean, R. A., Sewall, T. C., & Timberlake, W. E. (1991). Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes & development*, 5(7), 1161-71.
- Stringer, M. A., & Timberlake, W. E. (1995). *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Molecular microbiology*, 16(1), 33-44.
- Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beever, R. E., & Mackay, J. P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 39(7), 773-84.

- Talbot, N. J., Kershaw, M. J., Wakley, G. E., De Vries, O., Wessels, J., & Hamer, J. E. (1996). MPG1 Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant cell*, 8(6), 985-999.
- Talts, J. F., Mann, K., Yamada, Y., & Timpl, R. (1998). Structural analysis and proteolytic processing of recombinant G domain of mouse laminin alpha2 chain. *FEBS letters*, 426(1), 71-6.
- Teertstra, W. R., Deelstra, H. J., Vranes, M., Bohlmann, R., Kahmann, R., Kämper, J., *et al.* (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 12), 3607-12.
- Thau, N., Monod, M., Crestani, B., Rolland, C., Tronchin, G., Latgé, J. P., *et al.* (1994). rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, 62(10), 4380-8.
- Timpl, R., Tisi, D., Talts, J. F., Andac, Z., Sasaki, T., & Hohenester, E. (2000). Structure and function of laminin LG modules. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 19(4), 309-17.
- Toews, M. W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., *et al.* (2004). Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination *in vitro* (GATEWAY). *Current genetics*, 45(6), 383-9.
- Trembley, M. L., & Horgen, P. A. (2002). Differential expression of hydrophobins DGH1, DGH2 and DGH3 and immunolocalization of DGH1 in strata of the lichenized basidiocarp of *Dictyonema labratum*. *New Phytol*, 154(1), 175-184.
- Trembley, M. L., Ringli, C., & Honegger, R. (2002). Hydrophobins DGH1, DGH2, and DGH3 in the lichen-forming basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 35(3), 247-59.

- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V. P., & 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*. *Journal of cell science*, 118(Pt 16), 3705-16.
- Vocht, M. L. de, Reviakine, I., Wösten, H. A., Brisson, A., Wessels, J. G., & Robillard, G. T. (2000). Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *The Journal of biological chemistry*, 275(37), 28428-32.
- Vocht, M. L. de, Scholtmeijer, K., Der Vegte, E. W. van, Vries, O. M. de, Sonveaux, N., Wösten, H. A., *et al.* (1998). Structural characterization of the hydrophobin SC3, as a monomer and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Biophysical journal*, 74(4), 2059-68.
- Vocht, M. L. de, Reviakine, I., Ulrich, W.-P., Bergsma-Schutter, W., Wösten, H. A. B., Vogel, H., *et al.* (2002). Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 11(5), 1199-205.
- Wachem, P. B. van, Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J. P., & Aken, W. G. van. (1985). Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials*, 6(6), 403-8.
- Wang, X., Permentier, H. P., Rink, R., Kruijtzter, J. A. W., Liskamp, R. M. J., Wösten, H. A. B., *et al.* (2004). Probing the self-assembly and the accompanying structural changes of hydrophobin SC3 on a hydrophobic surface by mass spectrometry. *Biophysical journal*, 87(3), 1919-28.
- Wang, X., Shi, F., Wösten, H. A. B., Hektor, H., Poolman, B., & Robillard, G. T. (2005). The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties. *Biophysical journal*, 88(5), 3434-43.
- Webb, K., Hlady, V., & Tresco, P. A. (1998). Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *Journal of biomedical materials research*, 41(3), 422-30.

- Wessels, J. G. H. (1997). Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Advances in microbial physiology*, 38, 1-45.
- Wessels, J. G. H. (1994). Developmental regulation of fungal cell-wall formation. *Annu Rev Phytopathol*, 32, 413-437.
- Wessels, J. G. H. (1996). Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends Plant Sci*, 1(1), 9-15.
- Wessels, J. G. H., Vries, O. M. de, Asgeirsdóttir, S. A., & Springer, J. (1991). The *thn* mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the Sc3 hydrophobin gene. *Journal of general microbiology*, 137(10), 2439-45.
- Wessels, J. G. H., De Vries, O., Asgeirsdottir, S. A., & Schuren, F. (1991). Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *The Plant cell*, 3(8), 793-799.
- Wetter, M. A. van, Schuren, F. H., Schuurs, T. A., & Wessels, J. G. H. (1996). Targeted mutation of the SC3 hydrophobin gene of *Schizophyllum commune* affects formation of aerial hyphe. *FEMS Microbiology Letters*, 140, 265-269.
- Wetter, M. A. van, Wosten, H. A., & Wessels, J. G. H. (2000a). SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Mol Microbiol*, 36(1), 201-210.
- Wetter, M. A. van, Wösten, H. A., Sietsma, J. H., & Wessels, J. G. H. (2000b). Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 31(2), 99-104.
- Whiteford, J. R., & Spanu, P. D. (2001). The hydrophobin HCf-1 of *Cladosporium fulvum* is required for efficient water-mediated dispersal of conidia. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 32(3), 159-68.
- Whiteford, J. R., & Spanu, P. D. (2002). Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular plant pathology*, 3(5), 391-400.

- Wintterlin, J., Wiechers, J., Brune, H., Gritsch, T., Höfer, H., & Behm, R. (1989). Atomic-resolution imaging of close-packed metal surfaces by scanning tunneling microscopy. *Physical review letters*, 62(1), 59-62.
- Wohlleben, W., Subkowski, T., Bollschweiler, C., Vacano, B. von, Liu, Y., Schrepp, W., *et al.* (2010). Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *European biophysics journal : EBJ*, 39(3), 457-68.
- Wösten, H. A., De Vries, O., & Wessels, J. G. H. (1993). Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer. *The Plant cell*, 5(11), 1567-1574.
- Wösten, H. A. (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual review of microbiology*, 55, 625-46.
- Wösten, H. A., Asgeirsdóttir, S. A., Krook, J. H., Drenth, J. H., & Wessels, J. G. H. (1994a). The fungal hydrophobin Sc3p self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *European journal of cell biology*, 63(1), 122-9.
- Wösten, H. A., Schuren, F. H., & Wessels, J. G. H. (1994b). Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *The EMBO journal*, 13(24), 5848-54.
- Wösten, H. A., & Vocht, M. L. de. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica et biophysica acta*, 1469(2), 79-86.
- Wösten, H. A., & Wessels, J. G. H. (1997). Hydrophobins, from molecular structure of multiple functions in fungal development. *Mycoscience*, 38, 363-374.
- Wösten, H. A., Wetter, M. A. van, Lugones, L. G., Der Mei, H. C. van, Busscher, H. J., & Wessels, J. G. H. (1999). How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current biology : CB*, 9(2), 85-8.

- Yin, Q. Y., Groot, P. W. J. de, Koster, C. G. de, & Klis, F. M. (2008). Mass spectrometry-based proteomics of fungal wall glycoproteins. *Trends in microbiology*, 16(1), 20-6.
- Zamyatnin, A. A., Solovyev, A. G., Bozhkov, P. V., Valkonen, J. P. T., Morozov, S. Y., & Savenkov, E. I. (2006). Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 46(1), 145-54.
- Zekert, N., Veith, D., & 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(5), 795-805.
- Zhao, Z.-X., Wang, H.-C., Qin, X., Wang, X.-S., Qiao, M.-Q., Anzai, J.-I., *et al.* (2009). Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 71(1), 102-106.
- Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K., & Elings, V. (1993). Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science*, 290(1-2), L688-L692.

7 Anhang

7.1 *Curriculum vitae*

Name: Tanja Throm (geb. Sauerbrunn)
Geburtsdatum: 04.10.1981
Geburtsort: Bretten
Adresse: 76698 Ubstadt-Weiher, Talwiesen 31
E-Mail tthrom@gmx.de

Bildungsgang

Sept 2007 bis Feb 2011 Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
Titel der Dissertation: „Charakterisierung der Hydrophobine in *Aspergillus nidulans* und deren Anwendung zur Oberflächenbeschichtung und –funktionalisierung“
Im Institut für Angewandte Biowissenschaften; Abteilung Mikrobiologie von Prof. Reinhard Fischer des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

Aug 2006 bis Juni 2007 Diplomarbeit am Zoologischen Institut II – Molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie der Universität Karlsruhe (TH)
Titel der Diplomarbeit: „Einfluss von XCadherin-11 und Cdc42 auf das Adhäsionsverhalten von kranialen Neuralleistenzellen“ von *Xenopus laevis* (glatter Krallenfrosch)

Juli 2007 Diplom Hauptfächer: Zoologie, Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik, Paläontologie

Juli 2007 bis Okt 2001 Studium zur Diplom-Biologin an der Universität Karlsruhe (TH)

2001 bis 1998 Abitur am Wirtschaftsgymnasium (Wilhelm-Röpke-Schule, Ettlingen)

1992 bis 1998 Mittlere Reife an der Anne-Frank-Realschule (Ettlingen)

1988 bis 1992 Grundschule (Thiebauthschule, Ettlingen)

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Originalartikel in Fachzeitschriften

- 2011 Throm, T; Heiler, T; Strunk, T; Wenzel, W; Schimmel, T; Fischer, R;
in Vorbereitung
- 2011 Boeuf, S; Mühlberg, L; Hoffmann, M; Throm, T; Fischer, R; Richter, W ;
in Vorbereitung

Konferenzbeiträge

- 2009 Vortrag: 9th Symposium – Molecular Biology of Fungi; Münster, Deutschland
- 2009 Vortrag: CA-Symposium – Applied Life Science; Karlsruhe, Deutschland
- 2008 Vortrag: Final Eurofungbase Meeting, San Feliu de Guixols, Spanien
- 2009 Poster: CFN Summer School on Nano-Biology; Bad Herrenalb, Deutschland
- 2008 Poster: First German/French/European/Meeting Yeast and Filamentous Fungi;
Straßbourg, Frankreich

7.2 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Reinhard Fischer bedanken, der mir die Gelegenheit gab, diese Arbeit selbstständig anzufertigen, mir stets mit Rat und Tat zu Seite stand und mir zudem ermöglichte, meine Arbeit auch auf einigen nationalen und internationalen Konferenzen vorzustellen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Rolf Geisen für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Der nächste Dank gilt den Kooperationspartnern im Rahmen des Forschungsprogramms „Biomaterialien“ der Landesstiftung Baden-Württemberg für ihre Unterstützung. So möchte ich mich ganz herzlich bei Tobias Heiler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Schimmel (Institut für Nanotechnologie (INT) – KIT) für die AFM-Aufnahmen und Kontaktwinkelmessungen, Timo Strunk aus der Arbeitsgruppe von Dr. Wolfgang Wenzel (Institut für Nanotechnologie (INT) – KIT) für sein Proteinmodellierung und Dr. Stephane Boeuf aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Wiltrud Richter im Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie (Heidelberg) für die Durchführung der Beschichtungsversuche und der Analyse der Osteogenese bei MSC bedanken.

Weiterhin möchte ich allen meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe danken. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Tobias Schunck, Jan Siebenbrock und Elisabeth Poth, die mich während meiner Dissertation von Anfang bis Ende begleitet haben (Lang lebe die Außenstelle!). Ebenso möchte ich mich bei Constanze Seidel und Nadine Zekert für ihre Hilfe bedanken. Außerdem danke ich sehr herzlich Maren Hedtke und Beatrice Gutt, die mir mit ihrer Diskussions- und Hilfsbereitschaft stets zur Seite standen.

Ein großes Dankeschön auch an die Nadicom, die Arbeitsgruppe von Prof. Jörg Kämper, und an die Arbeitsgruppe von Prof. Natalia Requena für die angenehme Arbeitsatmosphäre, jeden netten Plausch und manche Anregungen. Hier möchte ich vor allem Hannah Kuhn danken, mit der mich seit der Zeit unseres gemeinsamen Studiums eine gute Freundschaft verbindet.

Der folgende Dank gilt meiner Familie und der Familie meines Mannes, die mich immer unterstützten, vor allem aber meinen Eltern, ohne die ich nie zu dem geworden wäre, was ich heute bin.

Zum Abschluss möchte ich noch der wichtigsten Person in meinem Leben danken - meinem Mann Christian Thom. DANKE, dass du immer für mich da bist, mich bei allem was ich tue unterstützt und mir auch ab und zu den Weg weist, wenn ich ihn verloren habe.