

**Identifizierung und Untersuchung von  
Interaktionspartnern der Zyklin-abhängigen  
Kinase PtkA in *Aspergillus nidulans***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte  
DISSERTATION  
von  
**Claudia Kempf**  
aus  
Landau in der Pfalz

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer  
Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer  
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper  
Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2012

**Inhaltsverzeichnis**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Zusammenfassung</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Einleitung</b>  | <b>2</b>  |
| 2.1 Der Modellorganismus <i>Aspergillus nidulans</i>  | 2         |
| 2.2 Regulierung der Entwicklung in <i>A. nidulans</i>   | 2         |
| 2.2.1 Ablauf der asexuellen und sexuellen Entwicklung in <i>A. nidulans</i>   | 3         |
| 2.2.2 Die asexuelle Entwicklung wird durch die Aktivierung einer Genkaskade kontrolliert                              | 5         |
| 2.3 Zykline   | 9         |
| 2.3.1 PclA – ein Zyklin der Pcl-Familie mit unterschiedlichen Interaktionspartnern in <i>A. nidulans</i>              | 10        |
| 2.3.2 PchA – Identifizierung eines T Zyklins in <i>A. nidulans</i>  | 11        |
| 2.4 Zyklin-abhängige Kinasen mit unterschiedlichen Funktionen   | 13        |
| 2.5 Cdk9 – konserviert von der Hefe bis zum Menschen  | 16        |
| 2.5.1 <i>A. nidulans</i> PtkA – ein neues Mitglied der Cdk9 Familie   | 18        |
| <b>3. Ergebnisse</b>  | <b>20</b> |
| 3.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner mit Hilfe eines Yeast two-hybrid Screens                                | 20        |
| 3.2 Bestätigung der gefundenen Interaktionen aus dem Y2H-Screen   | 27        |
| 3.2.1 Bestätigung der Interaktion von PtkA mit PclB durch Y2H und BiFC  | 27        |
| 3.2.2 Bestätigung der Interaktion von PtkA mit PipA durch Y2H und BiFC  | 30        |
| 3.3 Lokalisierung der Interaktionspartner in <i>A. nidulans</i>   | 33        |
| 3.3.1 Lokalisierung von PclB  | 33        |
| 3.3.2 Lokalisierung von PipA  | 36        |
| 3.4 Transkriptionelle Regulation der Expression von <i>pipA</i> und den Zyklinen <i>pclB</i> , sowie <i>pchA</i>      | 38        |
| 3.5 Überexpression von PipA hemmt die asexuelle Sporenbildung   | 40        |
| 3.6 Deletion verschiedener Interaktionspartner  | 47        |
| 3.6.1 Deletion von <i>pclB</i> hat keine Auswirkung auf das Wachstum  | 47        |
| 3.6.2 Deletion von <i>pipA</i> könnte letal sein  | 49        |
| 3.6.3 Deletion von <i>pchA</i> verursacht einen starken Wachstumsdefekt während der asexuellen Entwicklung            | 53        |
| 3.6.4 Gleichzeitige Deletion von zwei Zyklinen führt zu einer Verstärkung im Phänotyp der jeweiligen Einzeldelationen | 55        |
| 3.7 Mutation konservierter Domänen in PtkA  | 60        |

---

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.7.1     | Veränderung der Lokalisierung von PtkA .....   | 61        |
| 3.7.2     | Konkurrieren die verschiedenen Interaktionspartner von PtkA um die gleiche Bindestelle ? .....   | 63        |
| 3.8       | Heterologe Expression und Aufreinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i> .....  | 67        |
| 3.8.1     | Expression von His-getaggten PtkA, CTD, PclB und PipA in <i>E.coli</i> .....   | 67        |
| 3.8.2     | Expression von GST-getaggten PtkA, CTD und PipA in <i>E. coli</i> .....  | 69        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b> .....  | <b>72</b> |
| 4.1       | PtkA - eine essentielle Kinase – verantwortlich für verschiedene Schritte der Entwicklung .....  | 73        |
| 4.2       | PipA wird für die asexuelle Entwicklung und das polare Wachstum vegetativer Hyphen benötigt.....                                       | 74        |
| 4.3       | PclB wird für die Funktion anderer Zykline während der Entwicklung benötigt77  |           |
| 4.4       | PchA hat eine wichtige Funktion für das normale Wachstum und die Konidiophoren Bildung .....   | 80        |
| 4.5       | Die Veränderung konservierter Domänen in PtkA führt zu einem Verlust der normalen Lokalisierung und der Fähigkeit zur Interaktion..... | 82        |
| 4.6       | Abhängigkeit der Entwicklung von verschiedenen Genen – möglicherweise im Zusammenspiel mit der Feinkontrolle der Transkription.....    | 84        |
| <b>5.</b> | <b>Material &amp; Methoden</b> .....   | <b>88</b> |
| 5.1       | Chemikalien.....   | 88        |
| 5.2       | Verwendete Organismen und Kultivierung .....   | 88        |
| 5.2.1     | Verwendete Stämme von <i>A. nidulans</i> und Kultivierung.....   | 88        |
| 5.2.2     | Bestimmung der Sporenzahl .....  | 91        |
| 5.2.3     | Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> und Kultivierung.....   | 91        |
| 5.2.3     | Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i> und Kultivierung.....   | 92        |
| 5.3       | Molekularbiologische Methoden .....  | 95        |
| 5.3.1     | Gelelektrophorese, DNA-Restriktion und Klonierung von PCR-Fragmenten   | 95        |
| 5.3.2     | PCR und verwendete Oligonucleotide.....  | 96        |
| 5.3.3     | Site-directed Mutagenesis .....  | 100       |
| 5.3.4     | Fusion-PCR zur Herstellung von Deletionskonstrukten und zum Taggen von Genen unter der Kontrolle des natürlichen Promotors .....       | 101       |
| 5.3.5     | <i>E. coli</i> Transformation und Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. coli</i> .....   | 102       |
| 5.3.6     | Hergestellte und verwendete Plasmide .....   | 103       |
| 5.3.7     | Herstellung von Protoplasten und Transformation von <i>A. nidulans</i> .....   | 106       |
| 5.3.8     | PCR mit intakten Sporen (Sporen-PCR) .....   | 107       |
| 5.3.9     | Präparation von genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i> .....   | 107       |
| 5.3.10    | Southern-Blot.....   | 108       |

---

|  |            |
|--|------------|
| 5.3.11 Isolierung von RNA aus <i>A. nidulans</i> .....                             | 109        |
| 5.3.11 Quantitative Real-time PCR .....  | 110        |
| 5.3.12 Kreuzung von <i>A. nidulans</i> .....                                       | 110        |
| 5.3.13 Heterokaryon-Test und Haploidisierung von <i>A. nidulans</i> .....          | 110        |
| 5.3.14 Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen und Transformation..... | 111        |
| 5.3.15 Yeast two-hybrid durch Kreuzung .....                                       | 112        |
| 5.4 Biochemische Methoden .....  | 113        |
| 5.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....        | 113        |
| 5.4.2 Western-Blot.....  | 114        |
| 5.4.3 Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss .....                 | 115        |
| 5.4.4 Aufreinigung von His-getagten Proteinen mit Ni-NTA-Agarose.....              | 115        |
| 5.5 Mikroskopische Methoden.....   | 116        |
| 5.5.1 Fluoreszenzmikroskopie .....   | 116        |
| <b>6. Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>117</b> |
| <b>7. Anhang .....</b>   | <b>127</b> |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | 127        |
| Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen .....                              | 128        |
| Lebenslauf.....  | 129        |
| Danksagung .....   | 130        |

## 1. Zusammenfassung

Der Modellorganismus *Aspergillus nidulans* kann sich in einem asexuellen und in einem sexuellen Weg fortpflanzen. Da er während der Entwicklung und des vegetativen Wachstums verschiedene Strukturen ausbildet, wird er als Modell für die Untersuchung zellbiologischer Prozess und der Entwicklung verwendet.

Die asexuelle Entwicklung wird durch eine Reihe stadienspezifischer Transkriptionsfaktoren gesteuert, die hunderte von Genen kontrollieren, welche für die Ausbildung der morphologischen Strukturen notwendig sind. Durch Analyse einer neuen Entwicklungsmutante wurde das Zyklin PclA entdeckt, das für die schnelle Sporenproduktion benötigt wird. Das Zyklin PclA interagiert mit dem Hauptregulator des Zellzyklus, NimX, sowie mit der Cdk9 Kinase, PtkA. Die Kinase PtkA hat eine essentielle Funktion in *A. nidulans* und interagiert mit einem weiteren Zyklin, PchA, welches ebenfalls für das normale Wachstum des Pilzes wichtig ist. Cdk9 Kinasen sind in höheren Eukaryoten an der Transkriptionskontrolle beteiligt und werden durch mehrere interagierende Proteine in ihrer Aktivität reguliert.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung weiterer Interaktionspartner der Zyklin-abhängigen Kinase PtkA in *A. nidulans*. Durch Verwendung eines Yeast two-hybrid Screens wurden verschiedene mögliche Interaktionspartner isoliert, von denen zwei Gene für eine genauere Untersuchung ausgewählt wurden. Die Gene wurden als *pclB* und *pipA* bezeichnet und mit Hilfe von Lokalisierungs-, sowie Expressionsstudien und der Herstellung von Deletionsmutanten näher charakterisiert. Durch die Lokalisierungsstudien wurde festgestellt, dass sowohl PclB als auch PipA vor allem in den Konidiophoren vorkommen, aber auch in den Hyphen zu finden sind. Die Interaktion mit PtkA fand jedoch ausschließlich in den Konidiophoren statt. Die Veränderung der Expression von *pipA* führte zu einer Störung der asexuellen Entwicklung. Eine verminderte Expression verursachte eine Verringerung der Sporenproduktion, wohingegen eine Überexpression die Entstehung von Konidiophoren vollständig hemmte und ausschließlich Hyphen gebildet wurden. Die Deletion oder veränderte Expression von *pclB* hatte keinerlei Auswirkungen auf das Wachstum. Jedoch führte die Deletion von *pclB* in einer *pclA* oder *pchA* Mutanten zu einer Verstärkung des bereits vorhandenen Phänotyps.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine Modulation der Transkriptionsmaschinerie während der asexuellen Entwicklung hin und lassen eine weitere Ebene der Entwicklungsregulation vermuten.

## 2. Einleitung

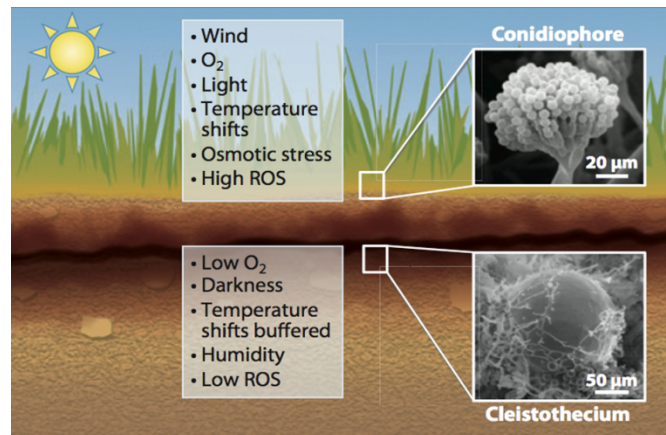
### 2.1 Der Modellorganismus *Aspergillus nidulans*

Der Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* ist ein filamentös wachsender homothallischer Ascomycet, welcher in der Natur vor allem im Boden vorkommt. Im Labor wird er als Modellorganismus verwendet, da er unterschiedliche Strukturen während des vegetativen Wachstums, sowie während der asexuellen und sexuellen Entwicklung ausbildet. Aufgrund dessen kann er gut als Modell zur Untersuchung zellbiologischer Prozesse und der Entwicklung in Eukaryoten verwendet werden. Des Weiteren ist er leicht zu kultivieren, vollzieht die gesamte Entwicklung in einem kurzen Zeitraum und kann sich sowohl asexuell und als auch sexuell fortpflanzen.

Die im asexuellen Zyklus, in dem sich der Pilz in seiner haploiden Phase befindet, gebildeten Konidiosporen können ideal für Mutagenese-Versuche verwendet werden (Morris & Enos, 1992). Im sexuellen Zyklus können unterschiedliche Individuen miteinander gekreuzt werden, so dass klassische genetische Analysen und Gen-Kartierungen möglich sind (Casselton & Zolan, 2002).

### 2.2 Regulierung der Entwicklung in *A. nidulans*

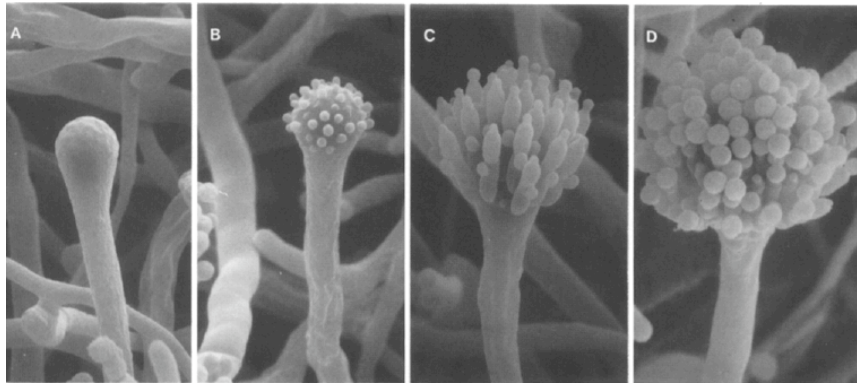
*A. nidulans* ist ein Pilz, welcher in der Lage ist, sich in einem sexuellen und in einem asexuellen Weg zu vermehren. Die Entscheidung ob der asexuelle oder sexuelle Zyklus eingeleitet wird, hängt von verschiedenen äußeren Bedingungen ab (Adams et al, 1998; Rodriguez-Romero et al, 2010). Der sexuelle Zyklus wird vor allem in Dunkelheit und bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration ausgelöst, wenn sich der Pilz noch im Boden befindet (Abb. 1). Sobald sich die Bedingungen in der Umgebung verändern, beispielsweise die Sauerstoff-Konzentration ansteigt oder das Myzel dem Licht ausgesetzt ist, wird die asexuelle Entwicklung eingeleitet (Rodriguez-Romero et al, 2010).



**Abbildung 1: Bedingungen, welche für die Entscheidung über die Einleitung der asexuellen oder sexuellen Entwicklung ausschlaggebend sind.** In der asexuellen Entwicklung werden Konidiophoren gebildet. Die asexuelle Entwicklung wird vor allem durch eine erhöhte Sauerstoffkonzentration und durch Licht initiiert. Die sexuelle Entwicklung wird durch eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration und in Dunkelheit gestartet, wobei Kleistothezien gebildet werden (Rodríguez-Romero et al, 2010).

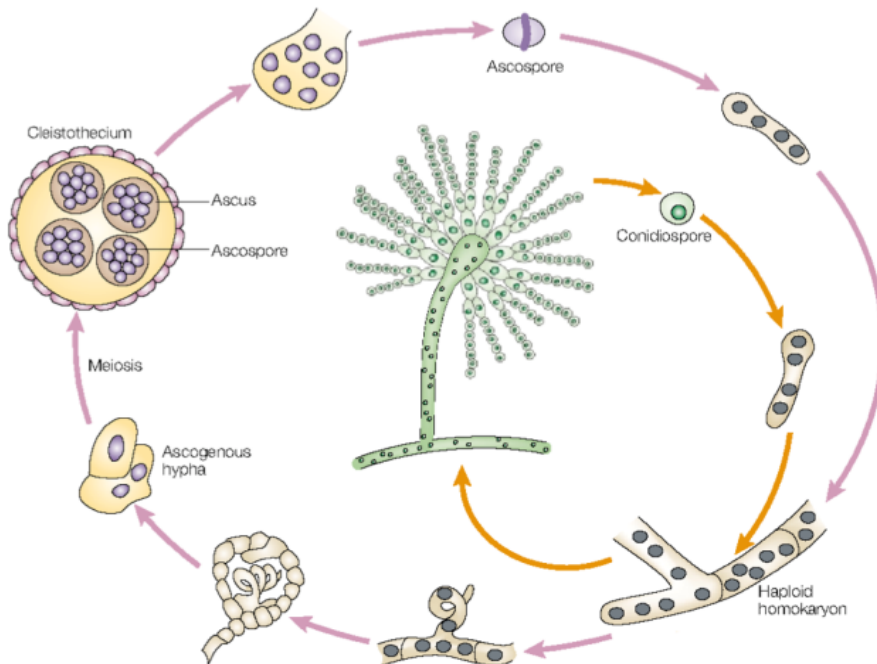
### 2.2.1 Ablauf der asexuellen und sexuellen Entwicklung in *A. nidulans*

Die asexuelle Entwicklung beinhaltet die Ausbildung der Konidiophoren (Abb. 2). Um die asexuelle Entwicklung einzuleiten, müssen die Hyphen zuvor ihre Entwicklungskompetenz erreicht haben. Dies geschieht normalerweise 16 h nach der Sporenskeimung (Axelrod *et al*, 1973). Nach dem die Hyphen ausreichend lange vegetativ gewachsen sind, werden Lufthyphen gebildet, in dem zuerst das Stielchen und am Ende davon das Vesikel (Abb. 2 a) gebildet wird. Danach werden pro Vesikel etwa 60 Metulae ausgebildet, in welche je ein Kern einwandert (Abb. 2 b). Die Metulae teilen sich zweimal, wodurch eine Schicht aus Phialiden entsteht (Abb. 2 c). Durch mitotische Teilung der Kerne in den Phialiden wird die Bildung von Konidiosporen ausgelöst. Nach der Mitose verbleibt immer ein Kern in der Phialide und der neugebildete Kern wandert an die Phialidenspitze, wo durch Teilung eine neue Spore abgespalten wird (Abb. 2 d). Dadurch entstehen Ketten von einkernigen Sporen, welche der schnellen Verbreitung in der Umwelt dienen (Adams *et al*, 1998; Boylan *et al*, 1987; Sewall *et al*, 1990).



**Abbildung 2: Ausbildung von Konidiophoren während der asexuellen Entwicklung.** (A) Zu Beginn der asexuellen Entwicklung entsteht aus der Fußzelle ein Stiel, welcher während des weiteren Wachstums ein Vesikel ausbildet. (B) Durch Teilung entstehen die Metulae und danach die Phialiden (C). Am Ende werden die Sporen gebildet (D), welche einkernig sind und die asexuelle Entwicklung abschließen (Fischer & Timberlake, 1995).

Dem Start der sexuellen Entwicklung geht eine Fusion von vegetativ wachsenden Hyphen voraus (Abb. 3). Daraus entstehen die sexuellen Fruchtkörper, die Kleistothezien. Die Reifung der Kleistothezien beinhaltet auch die Karyogamie mit anschließender Meiose in den ascogenen Hyphen. Die Kleistothezien enthalten die Asci mit je acht haploiden Ascosporen, welche wieder freigesetzt werden können, um erneut auszukeimen und vegetativ wachsende Hyphen auszubilden.

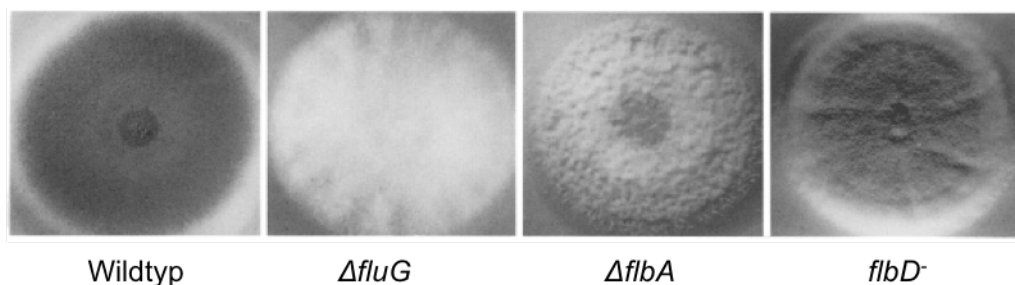


**Abbildung 3: Ablauf der sexuellen und asexuellen Entwicklung in *Aspergillus nidulans*.** In der sexuellen Entwicklung (lila Pfeile) werden Kleistothezien mit Asci und die darin enthaltenen haploiden Ascosporen gebildet. Während der asexuellen Entwicklung (orangefarbene Pfeile) werden die Konidiophore gebildet. Diese bestehen aus verschiedenen Zelltypen, beginnend mit den am Vesikel gebildeten Metulae, danach die Phialiden und am Ende die Sporen (Casselton & Zolan, 2002).



### 2.2.2 Die asexuelle Entwicklung wird durch die Aktivierung einer Genkaskade kontrolliert

Die asexuelle Entwicklung wird durch die Expression verschiedener Gene in den unterschiedlichen Entwicklungsphasen reguliert. Um die asexuelle Entwicklung und somit die Bildung der Konidiophoren zu induzieren, werden zuerst die „*fluffy*“ Gene benötigt (Adams et al, 1998; Etxebeste et al, 2010; Wieser et al, 1994). Zu den *fluffy* Genen gehören *fluG* und *flbA-E*. Die Deletion der einzelnen *fluffy* Gene führt immer zur Ausbildung des gleichen Phänotyps, weshalb die verschiedenen Gene einer Gen-Gruppe zugeordnet werden können. Die *fluffy* Gene werden für die Entscheidung zum Start der Konidiophoren Entstehung benötigt. Durch den Verlust der *fluffy* Gene entstehen Mutanten, welche nicht in der Lage sind vom undifferenzierten Hyphenwachstum zur Bildung von Konidiophoren zu wechseln. Dadurch können die Mutanten nur vegetative Hyphen bilden, wodurch Kolonien entstehen die ein baumwollartiges Wachstum aufweisen (Abb. 4). Zum Start der Konidiophorenentwicklung wird zuerst *fluG* benötigt, da es als erstes beim Übertritt der Hyphe in die Luftphase gebildet wird (Kwon et al, 2010; Wieser et al, 1994). *FluG* wird für die Synthese diffundierender Faktoren benötigt, welche von der Hyphe nach außen abgegeben werden und dort als extrazelluläres Signal zur Induzierung der asexuellen Entwicklung verwendet werden. Durch dieses extrazelluläre Signal kann ein Wildtyp, welcher in der Nähe einer *fluG* Mutanten wächst, den *fluffy*-Phänotyp der *fluG* Deletion verhindern (Wieser et al, 1994). Weiterhin kann durch Überexpression von *fluG* die asexuelle Entwicklung auch in Flüssigmedium induziert werden, obwohl unter diesen Bedingungen normalerweise nur vegetatives Hyphenwachstum stattfindet. Das *fluG* Gen ist weiterhin wichtig für die Aktivierung der *flb* Gene und für die Expression, des Hauptregulators der asexuellen Entwicklung, *briA* (Adams et al, 1992). Die *flb* Gene können durch die Entstehung von verschiedenen Abwandlungen im *fluffy*-Phänotyp in *flbA* und *flbB-E* aufgeteilt werden. Bei einer *flbA* Mutante beginnt nach einiger Zeit des Wachstums eine Autolyse der Zellen von der Mitte der Kolonie heraus. Bei den *flbB-flbE* Mutanten findet keine Autolyse statt, sondern es entstehen nach einer längeren Inkubationszeit Konidiophoren in der Mitte der Kolonie, wohingegen der Rand der Kolonie den *fluffy* Phänotyp beibehält (Etxebeste et al, 2010; Garzia et al, 2010; Lee & Adams, 1996). Die Überexpression von verschiedenen *flb* Genen induziert, wie auch die Überexpression von *fluG*, die asexuelle Entwicklung in einer Flüssigkultur (Wieser & Adams, 1995).

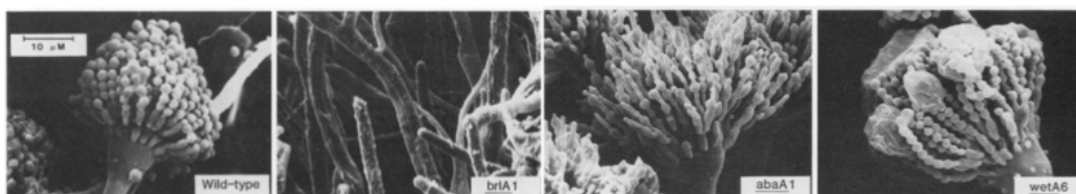


**Abbildung 4: Phänotyp verschiedener fluffy Mutanten.** Der Wildtyp bildet Konidiophoren und weist eine grüne Farbe auf, die durch die Ausbildung von Sporen entsteht. Die *fluG* Mutante bildet, im Gegensatz zum Wildtyp, ausschließlich vegetative Hyphen aus und weist die typische baumwollartige Struktur einer fluffy Mutante auf. In der Mitte der Kolonie der *flbA* Mutante ist bereits die Autolyse zu erkennen, wohingegen die *flbD* Mutante in der Mitte der Kolonie bereits neue Konidiophoren bildet und zum Rand hin nur vegetative Hyphe bildet (Wieser et al, 1994).

Die *flb* Gene sind für die Aktivierung der Transkription von *brlA* notwendig. *BrlA* ist ein Zinkfinger( $C_2H_2$ )-Transkriptionsfaktor, welcher am Ende der Verlängerung des Konidiophorenstieles aktiviert wird (Adams et al, 1988; Etxebeste et al, 2010). *BrlA* wird für die asexuelle Entwicklung, vor allem für den Übergang vom polaren Wachstum des Stieles der Konidiophoren zum nicht-polaren Wachstum des Vesikels, benötigt (Han et al, 1993). Aufgrund dessen ist eine Akkumulation von *brlA* mRNA kurz nach der Induktion der asexuellen Entwicklung nachweisbar, wohingegen in Hyphen nur eine geringe Konzentration von *brlA* mRNA vorhanden ist. Des Weiteren codiert das *brlA*-Gen für zwei verschiedene Transkripte, *brlA $\alpha$*  und *brlA $\beta$* , welche gleichzeitig bei der Entstehung des Vesikels gebildet werden (Prade & Timberlake, 1993). Durch eine Mutation der beiden *brlA*-Transkripte wird die asexuelle Entwicklung nach der Stiel-Bildung gestoppt, weshalb Kolonien entstehen, die nur aus Konidiophoren-Stielen bestehen und nicht in der Lage sind die Entwicklung fortzusetzen (Boylan et al, 1987). Dieser Phänotyp kann wieder durch das Einbringen mehrerer Kopien, eines der beiden Transkripte, behoben werden (Prade & Timberlake, 1993). Der Stopp in der Entwicklung, welcher durch eine *brlA*-Mutation entsteht, kann durch die Notwendigkeit von *brlA* für die Aktivierung weiterer entwicklungsspezifischer Gene erklärt werden. *BrlA* wird benötigt, um die Expression von *abaA* und *wetA* zu induzieren (Adams et al, 1998). Diese Funktion von *brlA* wird durch das Vorhandensein von Bindestellen für *BrlA* in den Promotorbereichen von *abaA* und *wetA* bestätigt. Diese Bereiche werden als Bristle Response Elemente (BRE) bezeichnet und besitzen die Konsensussequenz (C/A)(G/A)AGGG(G/A) (Chang & Timberlake, 1993). Des Weiteren wird *brlA*, sowie *abaA* für die Aktivierung sogenannter Klasse A Gene benötigt, welche für die frühe Entwicklung wichtig sind (Marshall & Timberlake, 1991).

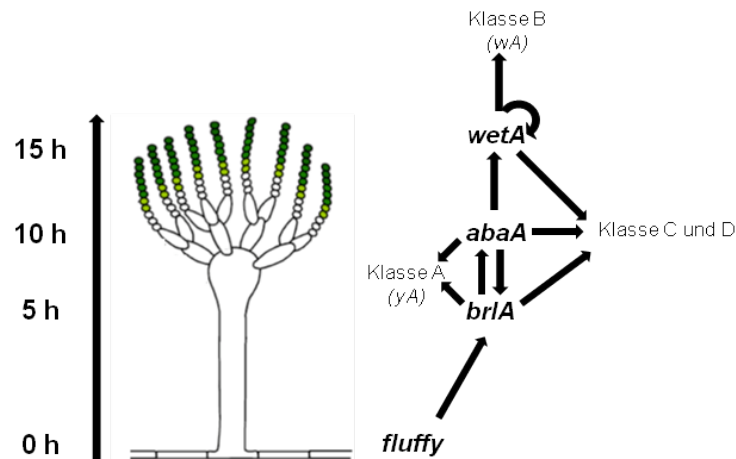
*AbaA* wird für die Ausbildung der Phialiden benötigt. Eine *abaA* Mutante bildet Konidiophoren aus, ist jedoch nicht in der Lage Sporen zu bilden (Sewall et al, 1990). Stattdessen werden weitere Phialiden produziert. Somit wird *abaA* für die Aktivierung von Genen benötigt, welche die Sporulation regulieren. Aufgrund dessen wird unter anderem *abaA* für die Expression von Klasse C und D Genen benötigt, sowie für die Aktivierung der Expression von *wetA*. Neben der Aktivierung von sporulationsspezifischen Genen, wirkt *abaA* auch auf die Expression von *brlA*. *AbaA* hat gleichzeitig eine reprimierende und eine stimulierende Wirkung auf die *brlA* Expression, so steigt die *brlA* Expression in *abaA*-Mutanen unkontrolliert an (Adams et al, 1998). Für *abaA* ist, wie auch für *brlA*, eine Konsensussequenz in den Promotorbereichen verschiedenerentwicklungsspezifischer Gene bekannt, die der Bindung von *AbaA* dient. Dieses Abacus Response Element (ARE), mit der Sequenz CATTC (C/T), ist bei *brlA*, *wetA*, *rodA*, *yA* und bei *abaA* selbst zu finden (Andrianopoulos & Timberlake, 1994).

In der späteren Phase der Entwicklung wird *wetA* benötigt, dessen Expression von *brlA* und *abaA* abhängt. Es dient der Synthese von Zellwandbestandteilen und somit der Stabilisierung der gebildeten Sporen. In *wetA* Mutanten findet keine Pigmentierung statt und die Zellwand ist durchlässig, wodurch die Spore Wasser aufnehmen und eine Autolyse der Sporen eintritt (Marshall & Timberlake, 1991). Die Gene dieser Klasse werden erst spät in der Entwicklung aktiviert, wodurch die gebildete mRNA in den Konidiosporen akkumuliert. Für die Regulierung der Klasse B Gene ist *wetA* verantwortlich. Zu dieser Klasse gehört unter anderem *wA*, welches für eine Polyketidsynthase kodiert und für die Pigmentierung der Sporen verantwortlich ist (Abb. 5).



**Abbildung 5: Phänotyp der *brlA*, *abaA* und *wetA* Mutante.** Die *brlA1* Mutante ist nicht in der Lage Konidiophoren auszubilden, sondern nur vegetative Hyphen. Die *abaA1* Mutante kann keine Sporen herstellen, sondern stoppt bei der Entstehung der Phialiden. Die *wetA* Mutante ist in der Lage vollständige Konidiophoren auszubilden, jedoch kommt es anschließend zur Autolyse der Sporen (Boylan et al, 1987).

Die asexuelle Entwicklung in *Aspergillus nidulans* wird somit durch eine Genkaskade reguliert. Sobald eine Mutation in einem der Gene der Kaskade vorliegt, wird die Entwicklung gestört und kann nicht vollendet werden (Abb. 6).



**Abbildung 6: Für die asexuelle Entwicklung verantwortliche Genkaskade.** Die Ausbildung von Konidiophoren beginnt mit der Expression der *fluffy* Gene, gefolgt von der Aktivierung von *brlA*, welches für den Übergang zur Ausbildung des Vesikels benötigt wird. Im Anschluss wird das für die Phialiden-Entwicklung benötigt *abaA* und das für die Stabilität der Sporen benötigt *wetA* exprimiert.

In einem Ansatz, zur Identifizierung neuer Gene, die für die asexuelle Entwicklung nötig sind, wurde ein Mutagenesecscreen durchgeführt. Dabei wurde ein Gen entdeckt, welches für ein Zyklin kodiert. Dieses Zyklin, PclA, gehört zu den Klasse A Genen, da es durch *brlA* und *abaA* während der Konidiophorenentstehung aktiviert wird (Schier *et al*, 2001). Zyklone sind Proteine, die im Zellzyklus stadienspezifisch exprimiert werden und den Zellzyklus durch Interaktion mit Kinasen regulieren. In *A. nidulans* wurde eine Interaktion mit NimX (Cdc28 in *S. cerevisiae*), der zentralen Kinase des Zellzyklus, nachgewiesen (Schier & Fischer, 2002). Daraus wurde geschlossen, dass PclA für die Anpassung des Zellzyklus während der Entwicklung nötig ist, um die schnelle Sporenbildung zu ermöglichen. Neben PclA wurde eine weitere Kinase, PtkA, als Interaktionspartner gefunden, welche eine essentielle Rolle für das Wachstum des Pilzes hat (Bathe *et al*, 2010) und deren Funktionen während der Entwicklung, sowie der Transkriptionskontrolle in dieser Arbeit genauer untersucht wurde.

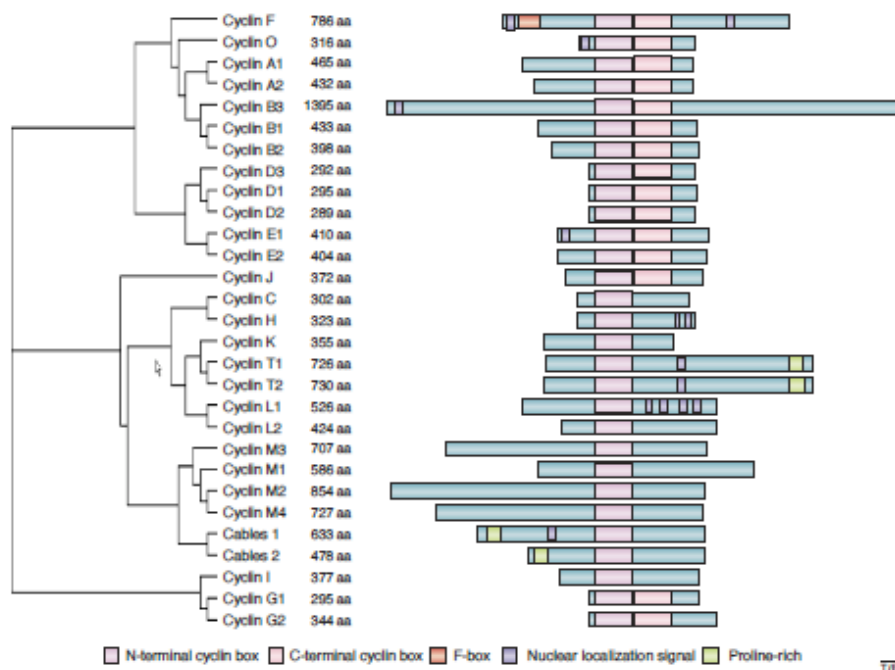
### 2.3 Zykline

Zykline gehören zu einer großen Familie von Proteinen, welche von der Hefe bis zum Menschen bekannt sind (Andrews & Measday, 1998; Malumbres & Barbacid, 2005). Die ersten Zykline wurden während der Embryonalentwicklung in Seeigeln entdeckt. Dabei wurde herausgefunden, dass verschiedene Proteine in den Eiern der Seeigel gebildet und zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus wieder abgebaut werden. Aufgrund dieses zyklischen Prozesses, wurden die Proteine als Zykline bezeichnet (Evans et al, 1983). Zykline werden durch ihre Interaktion mit Zyklin-abhängigen Kinasen charakterisiert und durch ihre Homologie in der Zyklin-Box, welche der Bindung von Zyklin-abhängigen Kinasen dient (Noble et al, 1997). Zykline sind vor allem für ihre Interaktion mit Cdk's und für ihre Funktion in der Regulation des Zellzyklus bekannt. Zusätzlich besitzen diese auch eine Funktion in verschiedenen Stoffwechselwegen und der Transkription (Kaffman & O'Shea, 1994; Waters et al, 2004).

Aus *S. cerevisiae* sind die Cln Zykline bekannt, welche zusammen mit der Kinase Cdc28 den Zellzyklus kontrollieren (Nasmyth, 1993). Neben den Zyklinen, welche abhängig vom Zellzyklus reguliert werden, gibt es auch den Cdk/Zyklin-Komplex aus Pho85/Pho80, welcher für die Expression verschiedener Phosphatase Gene verantwortlich ist (Lee et al, 2000).

In Säugetieren sind ebenfalls verschiedene Zykline bekannt (Abb. 7), die sich in ihrer Funktion unterscheiden. Die D Zykline werden während der G-Phase gebildet (Inaba et al, 1992; Sherr, 1995), die E Zykline in der späteren G<sub>1</sub>-Phase (Botz et al, 1996), die A Zykline werden beim Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase (Elledge et al, 1992) und das Zyklin B1 wird in der G<sub>2</sub>-Phase beim Übergang zur Mitose gebildet. Neben den Zellzyklus abhängigen Zyklinen gibt es auch in Säugetieren Zykline, die eine Rolle in der Kontrolle der Transkription spielen. Dazu gehören die K und T Zykline zusammen mit Cdk9 (Fu et al, 1999; Garriga & Grana, 2004; Peng et al, 1998b).

Ein weiteres Kennzeichen von Zyklinen ist ihre Instabilität. Da die Zykline nur zu einem bestimmten Zeitpunkt benötigt werden, werden diese nach Beendigung ihrer Aufgabe durch Ubiquitinierung für den Abbau gekennzeichnet und durch die Proteasomen abgebaut (Yu et al, 1996a). Eine wichtige Erkennungssequenz für die Ubiquitinierung ist die PEST-Sequenz (Glotzer et al, 1991; Rechsteiner & Rogers, 1996).



**Abbildung 7: Darstellung der Verwandtschaft und der Homologie der bekannten Zyklone aus Säugetieren.** Es sind 14 verschiedene Zyklin-Gruppen bekannt, die sich alle durch das Vorhandensein einer Zyklin-Box auszeichnen (Malumbres & Barbacid, 2005).

### 2.3.1 PclA – ein Zyklin der Pcl-Familie mit unterschiedlichen Interaktionspartnern in *A. nidulans*

PclA aus *A. nidulans* gehört zur Familie der Pcl Zyklone und ist homolog zu den Pcl Zyklonen in *S. cerevisiae*. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die Pcl-Zyklone mit der Zyklin-abhängigen Kinase Pho85 interagieren (Measday et al, 1997). Diese Kinase übernimmt verschiedene Funktionen in der Zelle, in dem sie auf Veränderungen von Nährstoffen, beispielsweise einer Verringerung der Phosphat-Konzentration, reagiert. Weiterhin interagiert Pho85 mit verschiedenen Zyklonen und kontrolliert dadurch den Fortschritt des Zellzyklus (Huang et al, 2007a). In *A. nidulans* ist eine zu Pho85 homologe Kinase bekannt, PhoA (Bussink & Osmani, 1998). Ein PhoA-Deletionsstamm besitzt unter normalen Wachstumsbedingungen keinen veränderten Phänotyp, im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch reagiert dieser Stamm auf Veränderungen der Phosphatkonzentration in der Umgebung. Durch Erhöhung der Phosphatkonzentration wird die sexuelle Entwicklung gefördert, wohingegen eine Verringerung der Phosphatkonzentration zur Einstellung der asexuellen und sexuellen Entwicklung führt.

Das Gen, welches für *pclA* codiert hat eine Länge von 1263 bp und besitzt keine Introns. Das gebildete PclA (Abb. 8) besteht aus 420 Aminosäuren und besitzt

eine Zyklindomäne (42-175 aa), zwei PEST-Domänen (51-68 aa und 237-270 aa), sowie eine NLS (384-390).

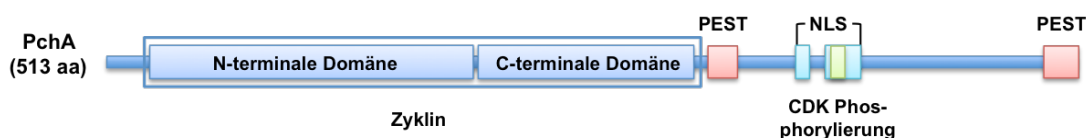


**Abbildung 8: Konservierte Domänen in PclA.** Das PclA Protein hat eine Länge von 420 Aminosäuren und besitzt eine Zyklin-Domäne (42-175 aa), zwei PEST-Domänen (51-68 aa und 237-270 aa), sowie ein Kernlokalisierungssignal (384-390 aa).

Das zu PclA homologe Protein in *S. cerevisiae* ist Pcl1. Pcl1 ist für die Regulierung des Zellzyklus verantwortlich, in dem es die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus kontrolliert (Andrews & Measday, 1998; Espinosa-Ruiz et al, 2004). PclA in *A. nidulans* ist ebenfalls für die Kontrolle des Zellzyklus notwendig, jedoch kann das *pclA* Transkript vor allem in der S-Phase nachgewiesen werden. Neben der Regulierung des Zellzyklus wird *pclA* auch für die Kontrolle der Entwicklung benötigt, da die Aktivierung von den Entwicklungsgenen *brlA* und *abaA* abhängt. Außerdem spielt *pclA* eine Rolle während der Sporenbildung, in dem es den Zellzyklus an die Teilung der Phialiden, wodurch die Sporen gebildet werden, anpasst (Schier & Fischer, 2002; Schier et al, 2001). Neben PclA wurde noch ein weiteres Zyklin als Interaktionspartner von PtkA identifiziert, das Zyklin PchA.

### 2.3.2 PchA – Identifizierung eines T Zyklins in *A. nidulans*

PchA aus *A. nidulans* ist homolog zu den aus Säugetieren bekannten T und K Zyklinen, sowie Pch1 aus *S. pombe*. Aufgrund der Homologie zu *pch1* wurde das Zyklin als *pchA* bezeichnet. PchA besteht aus 513 Aminosäuren (Abb. 9) und besitzt eine N- und eine C-terminale Zyklin-Domäne (24-170 aa und 177-208 aa). Außerdem sind zwei PEST-Domänen (295-309 aa und 488-513 aa) und zwei Kernlokalisierungssequenzen (306-313 aa und 333-350 aa) vorhanden. Zusätzlich gibt es auch eine Phosphorylierungsstelle für Cdks (341-347 aa).



**Abbildung 9: Konservierte Domänen in PchA.** Das PchA Protein hat eine Länge von 513 Aminosäuren und besitzt eine Zyklin-Domäne, welche in einen N-terminalen (24-170 aa) und in einen C-terminalen Bereich (177-280 aa) aufgeteilt ist. Des Weiteren sind zwei PEST-Domänen (295-309 aa und 488-513 aa), sowie eine konservierte Domäne für die Phosphorylierung durch eine Cdk vorhanden (341-347 aa). Im C-terminalen Bereich des Proteins sind noch zwei Kernlokalisierungssequenzen vorhanden (306-313 aa und 333-350 aa).

Das zu *pchA* aus *A. nidulans* homologe *pch1* aus *S. pombe* ist dafür bekannt, dass es mit der Zyklin-abhängigen Kinase Cdk9 interagiert (Pei et al, 2003). Dieser Komplex wird für die Phosphorylierung der CTD der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II benötigt und ist ortholog zu dem aus Säugetieren bekannten positiven-Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb).

Der P-TEFb aus Säugetieren besteht ebenfalls aus Cdk9 und verschiedenen Zyklinen. Als Interaktionspartner von Cdk9 in Säugetieren sind die Zykline der T Familie (Peng et al, 1998b) bekannt (T1, T2a und T2b), sowie das K Zyklin (Fu et al, 1999). Sowohl das K, als auch das T Zyklin weisen zu PchA homologe Bereiche auf (Abb. 10).

In *A. nidulans* konnte bereits eine Interaktion von Cdk9 mit PchA nachgewiesen werden (Bathe et al, 2010). In Säugetierzellen wurde eine unterschiedliche Expression der T Zykline in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen. Das Zyklin T1 wird in geringen Mengen in Monozyten exprimiert und wird zu Beginn der Differenzierung von Makrophagen hochreguliert. Das Zyklin T2 wird dagegen stark in Monozyten exprimiert und das Expressionslevel bleibt auch während der Differenzierung der Makrophagen konstant (Liou et al, 2006).

|                                |              |             |            |             |             |              |     |
|--------------------------------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|--------------|-----|
| PchA ( <i>A. nidulans</i> )    | SNPVLAAQK    | QWLFTEELT   | RSPSQLSGMT | VENENLHRSK  | GVNFIQVGI   | MLKLPQPTLA   | 74  |
| Pch1 ( <i>S. pombe</i> )       | QNT-----S    | QWII SKDQLV | FTPSALDGIP | LDQEEIQRSK  | GCNFI INVGL | RLKLPQTALA   | 66  |
| Cyclin K ( <i>H. sapiens</i> ) | TSANLDHTKP   | CWYWDKDKLA  | HTPSQLEGLD | PATEARYRRE  | GARFIFDVTG  | RLGLHYDTLA   | 72  |
| Cyclin T ( <i>H. sapiens</i> ) | -----NNK     | RWYFTREQL   | NSPSRRFGVD | PKELSYRQQ   | AANLLQDMGQ  | RLNVSQLTIN   | 60  |
| PchA ( <i>A. nidulans</i> )    | TAAYVLRHFF   | MRYA IADKPE | RPGIHPYPIA | ATSLFLATKV  | EENVRRMKEL  | VI APCRVAQK  | 134 |
| Pch1 ( <i>S. pombe</i> )       | TAN IYFHRFY  | LRFLSKN---  | ---YHYEVA  | ATC IFLATKV | EDSVRKL RDI | V INCAKVAQK  | 120 |
| Cyclin K ( <i>H. sapiens</i> ) | TG I IYFHRFY | MFHSFKQFPR  | -----YVTG  | ACCLFLAGKV  | EETPKKCKDI  | I - - -KTAR  | 121 |
| Cyclin T ( <i>H. sapiens</i> ) | TA I VYMHREY | MIQSFTQFPG  | N-----SVA  | PAALFLAAKV  | EEQPKKL-EH  | V I KVAHTCLH | 113 |
| PchA ( <i>A. nidulans</i> )    | KPDLVVDQGS   | KEFWKW-RDT  | ILHHEDILLE | ALCFDLQLEQ  | PYRTLYDFTC  | FFRVNDNK--   | 191 |
| Pch1 ( <i>S. pombe</i> )       | NSNVLVDEQT   | KEYWRW-RDV  | ILYTEEVLLE | ALCFDFITVEH | PYPYVLSFIK  | KF-VADDK--   | 176 |
| Cyclin K ( <i>H. sapiens</i> ) | --SLLNDVQF   | QGFDDPKKE   | VMVLERILLQ | TIKFDLQVEH  | PYQFLLYAK   | QLKGDKNKIQ   | 179 |
| Cyclin T ( <i>H. sapiens</i> ) | PQESLPDTRS   | EAYLQQVQDL  | VI-LESILLQ | TLGFELTIDH  | PHTHVVKCTQ  | LVRASKD--    | 169 |
| PchA ( <i>A. nidulans</i> )    | HIRNSSWAFI   | NDSMY-TVLC  | LQFPARVIAA | AAFYAAASHC  | DIGFED--DE  | FGRS-WWEQI   | 247 |
| Pch1 ( <i>S. pombe</i> )       | NVTKVAWTYI   | NDSR-SIAC   | LLYSPKTIAA | AAFQFALEKN  | EINLST--TT  | DGLPVWMEES   | 233 |
| Cyclin K ( <i>H. sapiens</i> ) | KLVMQAWTFV   | NDSLCTTSL   | LQWEPEIIAV | AVMYLAGRLC  | KFEIQEWTSK  | PMYRRWWEQF   | 238 |
| Cyclin T ( <i>H. sapiens</i> ) | -LAQTSYFMA   | TNSLHLTTF   | LQYTPPVVAC | VCIHLACKWS  | NWEIPVSTDG  | ---KHWWYV    | 225 |
| PchA ( <i>A. nidulans</i> )    | --DVDIAQVR   | RACTRMAELY  | ES-----    | -----       | -----       | -----N       | 268 |
| Pch1 ( <i>S. pombe</i> )       | --QYSYEDVK   | GVLTLIDSLY  | KK-----    | -----       | -----       | -----IN      | 255 |
| Cyclin K ( <i>H. sapiens</i> ) | VQDV PVDVLE  | DICHQILDLY  | SQ-----    | -----       | -----       | -----GK      | 262 |
| Cyclin T ( <i>H. sapiens</i> ) | DATV TLELLD  | ELTHEFLQIL  | EKTPNRLKRI | WNWRACEAAK  | KTKADDRGTD  | EKTSEQTILN   | 285 |
| PchA ( <i>A. nidulans</i> )    | -SQHRHSQ--   | -----YY--   | -----PPVPL | AWKEGAEKTR  | IPR-PGGS-L  | DAPPD-PSS    | 308 |
| Pch1 ( <i>S. pombe</i> )       | PSKQ-----    | -----       | -----ALPI  | DQKNGSHASS  | VA--PGTP-S  | SLASV-STQA   | 289 |
| Cyclin K ( <i>H. sapiens</i> ) | QQMPHHTP--   | -----HQLQQ  | PPSLQPTPVQ | PQVQQSQPSQ  | SSE-PSQP-Q  | QKDPQQAQQ    | 313 |
| Cyclin T ( <i>H. sapiens</i> ) | MISQSSSDTT   | IAGLMSMSTS  | TTSAPVSLPV | SEESSNLTS   | VEMLPGKRWL  | SSQPSFKLEP   | 345 |

**Abbildung 10: Alignment von PchA aus *A. nidulans* mit den homologen Proteinen Pch1 aus *S. pombe*, sowie Zyklin K und Zyklin T aus *Homo sapiens*.** Da die Sequenz von Zyklinen nur schlecht konserviert ist, können homologe Bereiche hauptsächlich in der Region der Zyklin-Domäne nachgewiesen werden, hier vor allem in der N-terminalen Zyklin-Domäne. Die N-terminale Zyklin-Domäne von PchA ist durch einen blauen Rahmen gekennzeichnet und die C-terminale Domäne ist von einem schwarzen Rahmen umgeben.



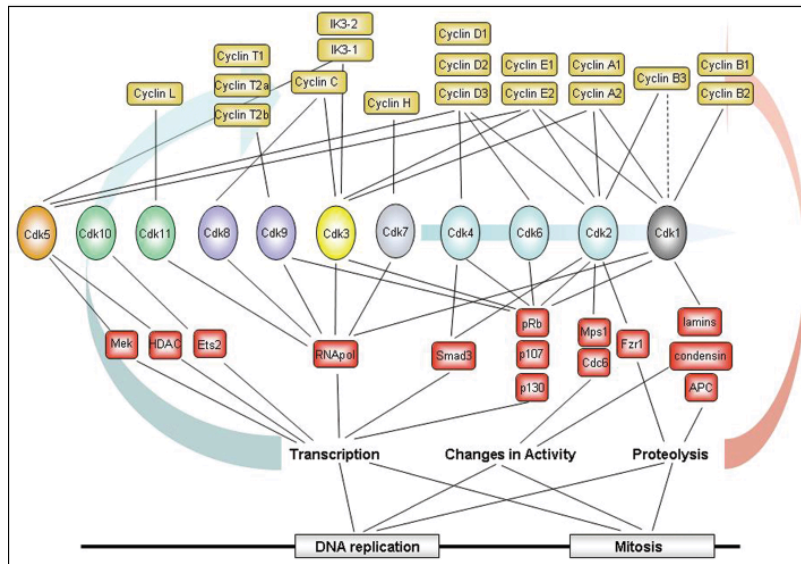
## 2.4 Zyklin-abhängige Kinasen mit unterschiedlichen Funktionen

Proteinkinasen sind wichtige Enzyme, welche in verschiedenen Prozessen in der Zelle involviert sind. Kinasen haben eine Rolle in der Weiterleitung von Signalen, der Kontrolle der Transkription, des Zellzyklus und verschiedener Stoffwechselwege (Goldsmith & Cobb, 1994; Kaffman & O'Shea, 1994). Des Weiteren sind die meisten Mitglieder der Kinase-Familie gut konserviert, wodurch der Vergleich von Kinasen aus verschiedenen Organismen erleichtert wird (Manning et al, 2002). Eine Gemeinsamkeit von Kinasen ist die Weiterleitung von Informationen durch Übertragung von Phosphat-Resten aus ATP auf verschiedene Substrate, wodurch der Zelle ermöglicht wird auf äußere Signal zu reagieren (Dickman & Yarden, 1999). Gleichzeitig werden Phosphatasen benötigt, welche den Prozess umkehren können und somit den Prozess in Gang halten.

Die Kinasen können in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden, wobei die Einteilung von der Phosphorylierungsstelle am Substrat abhängt. Es gibt wirkliche Histidin-Kinasen, welche den Phosphat-Rest direkt auf ein Histidin übertragen und es gibt Histidin-Kinasen, welche Histidin nur als Intermediat verwenden und dann den Phosphat-Rest auf Aspartat weiterleiten. Außerdem gibt es Serin/Threonin- oder Tyrosin-Kinasen und MAPKK, welche Serin, Threonin oder Tyrosin phosphorylieren können (Dickman & Yarden, 1999).

Die Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk: Cyclin-dependent kinase) benötigen für ihre Aktivität immer ein Zyklin als Partner (Arellano & Moreno, 1997; Morgan, 1995) und die Phosphorylierung eines konservierten Threonins innerhalb der Kinase (Morgan, 1995). Die erste Zyklin-abhängige Kinase wurde in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, in dem Mutanten mit einem Defekt in der Regulierung des Zellzyklus untersucht wurden (Draetta et al, 1987; Russell & Nurse, 1986). Diese Kinase wird als Cdc28 in *S. cerevisiae* und Cdc2 in *Schizosaccharomyces pombe* bezeichnet und stellt die einzige Kinase dar, welche den Zellzyklus in Hefe reguliert (Simon et al, 2001). Diese Kinase wird somit für den Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase und von der G<sub>2</sub>-Phase zur Mitose benötigt (Nurse, 2000). In höheren Eukaryoten konnten Homologe zu Cdc2 gefunden werden, aber auch noch weitere Cdk's mit anderen Funktionen (Abb. 11). In *S. cerevisiae* wurden ebenfalls weitere Kinasen gefunden, die keine Funktion im Zellzyklus haben. Dazu gehört der Kinase-Komplex Pho85/Pho80, welcher eine Rolle im Phosphatstoffwechsel hat (Espinoza et al, 1994; Kaffman & O'Shea, 1994).

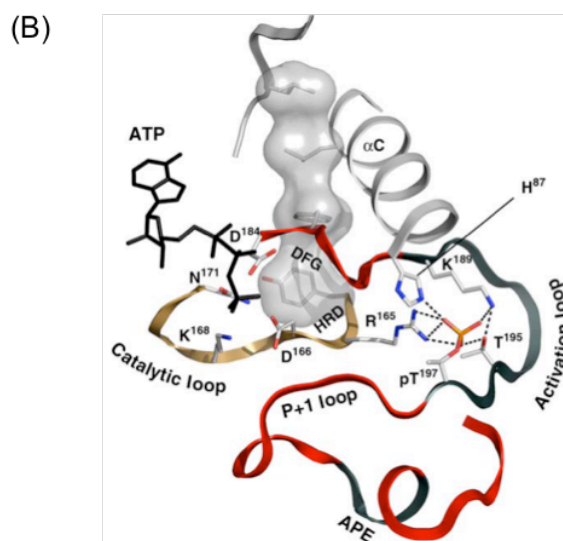
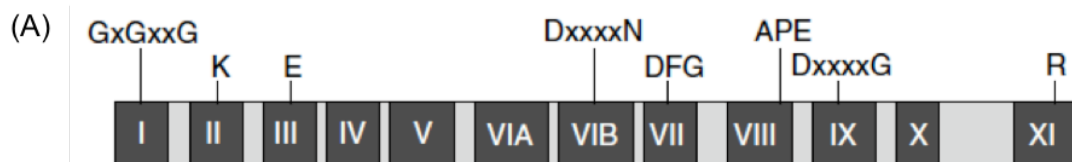
Die bekannten Zyklin-abhängigen Kinasen in höheren Eukaryoten besitzen nicht nur eine Funktion in der Kontrolle des Zellzyklus, sondern nehmen meistens auch andere Funktionen ein. Es ist bekannt, dass die Mitglieder der Cdk1-6 hauptsächlich in der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, wohingegen die Cdk7-11 eher eine Funktion bei der Kontrolle der Transkription spielen (Romano & Giordano, 2008) (Abb. 11).



**Abbildung 11: Bekannte Cdk's in höheren Eukaryoten und deren Funktionen.** Die Zyklin-abhängigen Kinasen 1-11 besitzen verschiedene Funktionen in der Zelle, welche durch die Interaktion mit unterschiedlichen Cyclinen erfüllt werden (Malumbres, 2005).

Die Mitglieder der Cdk-Familie weisen starke Homologien auf, welche auch Organismen übergreifend vorliegen. Die Cdk's besitzen verschiedene konservierte Domänen, welche für die Aktivität der Kinase verantwortlich sind (Abb. 12). Für die Aktivierung einer Kinase wird ein Zyklin benötigt, sowie eine CDK-aktivierende Kinase (CAK), welche für die Phosphorylierung eines konservierten Threonins in der Aktivierungsdomäne benötigt wird (Fisher & Morgan, 1994). Die Phosphorylierung dient der Stabilisierung des Cdk-Zyklin-Komplexes und induziert eine Konformationsänderung, wodurch andere Substrate binden können (Lees, 1995). Die Glyzin-reiche Region im aminoterminalen Bereich der Kinase (G-X-G-X-X-G), dient der Bindung von ATP und gleichzeitig der Stabilisierung der Bindung. Diese Region ermöglicht die richtige Anordnung des  $\gamma$ -Phosphats von ATP für die Katalyse. Mutationen in den konservierten Glyzin-Resten haben nicht automatisch eine letale Wirkung, können aber zu einer Verminderung (Odawara et al, 1989) oder Erhöhung der Kinase-Aktivität führen. Das konservierte Lysin (K) in Domäne II und das konservierte Glutamat (E) in der Domäne III, werden für die Bindung des Adeninrings von ATP benötigt. Diese Reste sind über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden

und stellen einen Teil des stabilen Kern-Komplexes dar, dessen Position nicht variabel ist. Diese Verbindung ist in allen Kinasen konserviert und ist ein Kennzeichen für die Aktivität der Kinase. Ein Austausch des konservierten Lysins gegen ein Arginin beeinflusst nicht die ATP-Bindung, jedoch verringert sich die Aktivität der Kinase (Carrera et al, 1993). Das Aspartat in der D-X-X-X-X-N Domäne dient der richtigen Positionierung der Hydroxyl-Gruppe der Kinase und erleichtert die Freilassung des Substrats nach der Übertragung des Phosphats. Das Asparagin (N) der Domäne dient der Stabilisierung des gesamten Loops. Das nächste Aspartat in der DFG-Region bindet das Magnesium des Mg-ATP und hilft bei der Übertragung des Phosphats (Taylor et al, 1992). In Hefe hat der Austausch des Aspartats gegen ein Alanin eine letale Wirkung (Gibbs & Zoller, 1991). Die APE Region ist nur in Serin/ Threonin-Kinasen konserviert und nicht in Tyrosin-Kinasen, wodurch diese beiden Gruppen unterschieden werden können (Hanks, 1987).



**Abbildung 12: Konservierte Domänen innerhalb der Familie der Zyklin-abhängigen Kinasen. (A)** Es sind 12 verschiedene konservierte Subdomänen bekannt, wobei Domäne I-V dem aminoterminalen Teil mit ATP-Binde Funktion entspricht und Domäne V-XI dem carboxyterminalen Teil für die Peptid-Bindung und für den Phosphattransfer. In den unterschiedlichen Domänen befinden sich auch konservierte Aminosäuren, welche verschiedene Funktionen erfüllen (Hanks, 2003b; Hanks *et al*, 1988b). **(B)** Räumliche Darstellung der konservierten Domänen. Der Teil, welcher für die Aktivierung benötigt wird, enthält das T<sup>197</sup>, welches für die Phosphorylierung benötigt wird. Die APE-Domäne dient der Stabilisierung des aktivierten Komplexes. Die richtige Anordnung der DFG-Domäne garantiert eine effiziente katalytische Aktivität (Taylor & Kornev, 2011).

In *A. nidulans* sind ebenfalls mehrere Zyklin-abhängige Kinasen bekannt. Die Kinase NimX wurde aufgrund der Homologie zur Kinase Cdc2 aus *S. pombe* entdeckt und ist der Hauptzellzyklusregulator in *A. nidulans*. Mit Hilfe von degenerierten Primern, die auf der Grundlage von homologen *cdc2* aus anderen Organismen erstellt wurden, konnte *nimX* aus *A. nidulans* isoliert werden (Osmani *et al*, 1994). Um weitere

Kinasen in *A. nidulans* zu identifizieren wurde eine BLASTp Analyse mit NimX durchgeführt, wodurch eine andere Cdc2-ähnliche Kinase identifiziert werden konnte. Dies war die Serin/Threonin-Kinase PtkA, welche in dieser Arbeit näher untersucht wurde. Diese Kinase besitzt eine konservierte Zyklinbindedomäne, das PITALRE-Motiv, weshalb sie als PtkA (PITALRE-like-kinase) bezeichnet wurde (Bathe *et al*, 2010; Schier & Fischer, 2002).

Zyklin-abhängige Kinasen benötigen für ihre Aktivität ein Zyklin als Interaktionspartner. Als interagierendes Zyklin von NimX und PtkA wurde, wie bereits erwähnt, PclA identifiziert.

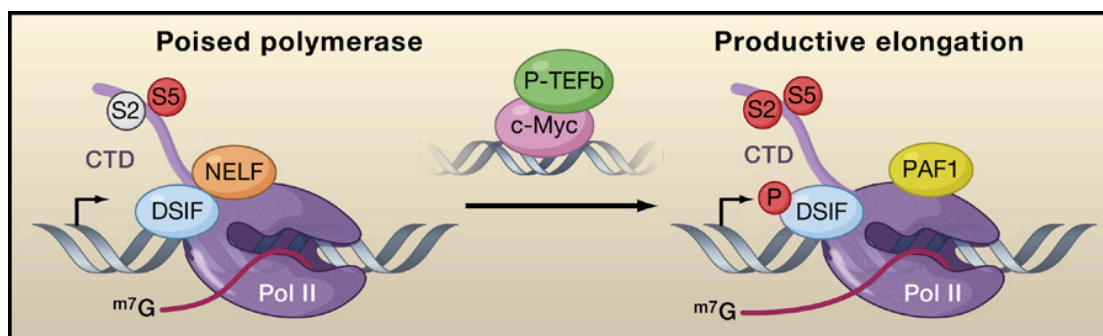
## 2.5 Cdk9 – konserviert von der Hefe bis zum Menschen

Cdk9 Kinasen sind in vielen verschiedenen Organismen als Serin/Threonin-Kinasen bekannt. Im Menschen wurde Cdk9 durch ein cDNA-Library Screening entdeckt, bei dem weitere Mitglieder der Cdc2-Familie gesucht wurden (Garriga *et al*, 1996; Grana *et al*, 1994). Diese Zyklin-abhängigen Kinasen wurden zuerst als PITALRE-Kinasen bezeichnet, da diese Familie durch die konservierte PITALRE-Aminosäuresequenz gekennzeichnet ist. Dieses Motiv ist bekannt für seine Funktion als Zyklin-Bindedomäne und wird aufgrund der guten Konservierung in den verschiedenen Cdk9 zur Einordnung von Zyklin-abhängigen Kinasen verwendet, bei denen noch kein Zyklin als Interaktionspartner identifiziert werden konnte. Nach der Entdeckung der ersten Zykline als Interaktionspartner, wurden die PITALRE-Kinasen in Cdk9 Kinasen umbenannt (Peng *et al*, 1998a; Peng *et al*, 1998b). In menschlichen Zellen sind außerdem zwei verschiedene Isoformen von Cdk9 bekannt, Cdk9<sub>42</sub> und Cdk9<sub>55</sub> (Shore *et al*, 2003). Die Expression der unterschiedlichen Cdk9 Isoformen ist abhängig vom Zelltyp und verändert sich beim Übergang in den Zellzyklus (Liu & Herrmann, 2005; Shore *et al*, 2005).

Als Interaktionspartner wurden zuerst Zykline der T-Familie entdeckt (Peng *et al*, 1998a; Peng *et al*, 1998b), welche in die T1 und T2a, sowie T2b Zykline unterteilt werden können. Des Weiteren wurden K Zykline als Interaktionspartner identifiziert (Lin *et al*, 2002). Cdk9 benötigt ein Zyklin als Interaktionspartner, um aktiv zu sein und um seine Stabilität zu erhöhen. Cdk9 ohne einen Interaktionspartner ist sehr instabil und wird schnell abgebaut, wohingegen der Cdk9/T Zyklin Komplex sehr stabil ist (O'Keeffe *et al*, 2000).

Durch Aufreinigung des positiven Transkriptions-Elongations-Faktors b (PTEFb) aus *Drosophila melanogaster* wurde herausgefunden, dass der Komplex aus

Cdk9 und dem T Zyklin eine Untereinheit des P-TEFb bildet (Zhu et al, 1997). Diese Einordnung von Cdk9 und dem T Zyklin konnte auch in Säugetierzellen gefunden werden (Peng et al, 1998b). Der P-TEFb wird für die Phosphorylierung der carboxy-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II benötigt (Abb. 13) und aktiviert dadurch die Elongation während der Transkription (Marshall et al, 1996). Die CTD ist ein Teil der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II, welche aus mehreren Wiederholungen besteht, mit der Sequenz Y-S<sub>2</sub>-P-T-S<sub>5</sub>-P-S<sub>7</sub>. Die Anzahl an Wiederholungen variiert in verschiedenen Organismen, aber die Sequenz ist stark konserviert (Zehring et al, 1988). Zur Initiierung der Transkription wird die Zyklin-abhängige Kinase 7 benötigt, welche zum TFIIF gehört. Die Cdk7 phosphoryliert das S<sub>5</sub> in der CTD, der an einen Promotor gebundenen RNA-Polymerase II. Nach der Initiierung der Transkription kommt es zur Pausierung der RNA-Polymerase II. Für den Übergang zur Elongation (Abb. 13) wird die Phosphorylierung des S<sub>2</sub> der CTD, durch den P-TEFb, benötigt (Palancade & Bensaude, 2003). Des Weiteren phosphoryliert der P-TEFb auch DSIF (DRB sensitivity inducing factor) und NELF (Negative elongation factor), welche den Übergang von der Initiierung zur Elongation verhindern (Garriga & Grana, 2004; Prelich, 2002).



**Abbildung 13: Kontrolle der Elongation während der Transkription.** Nach der Initiierung der Transkription durch die Phosphorylierung von S<sub>2</sub> der CTD, wird die Transkription pausiert. Dies wird durch die negativen Regulatoren der Transkription, NELF und DSIF, verursacht. Um die Elongation zu starten wird der P-TEFb benötigt, welcher DSIF und Ser<sub>5</sub> der CTD phosphoryliert. C-Myc ist ein Faktor, welcher für die Funktion verschiedener Gene in der embryonalen Entwicklung von Stammzellen der Maus benötigt wird (Price, 2010).

Diese durch den P-TEFb verursachte Kontrolle der Transkription ist ein sehr allgemeiner Prozess, was darauf schließen lässt, dass Cdk9 für die Transkription von vielen Genen verantwortlich ist. Dies wurde durch Experimente unter Verwendung des Cdk Inhibitors Flavopiridol (Chao & Price, 2001) und durch siRNA Experimente zur Herunterregulierung von Cdk9 bestätigt (Shim et al, 2002). Es gibt zwei verschiedene Cdk9 Isoforme, welche mit vier verschiedenen Zyklinen (T1, T2a, T2b und K) interagieren und den P-TEFb bilden. Aufgrund dessen kann davon ausge-

gangen werden, dass die verschiedenen Komplexe für die Transkription von Genen verwendet werden, abhängig vom Zustand der Zelle (Garriga et al, 2010).

### 2.5.1 *A. nidulans* PtkA – ein neues Mitglied der Cdk9 Familie

PtkA (AN8865) ist eine Serin/Threonin Kinase aus *A. nidulans*, welche zur Familie der Cdk9 gezählt werden kann. In der Aminosäure-Sequenz von PtkA (Abb. 14) sind die verschiedenen konservierten Domänen, welche eine Kinase charakterisieren, vorhanden. Außerdem besitzt PtkA eine Zyklin-Bindedomäne mit der Aminosäuresequenz PITALRE, wodurch diese den Kinasen der Cdk9 Familie zugeordnet werden kann.

|                               |             |              |              |             |            |             |     |
|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|------------|-------------|-----|
| PtkA ( <i>A. nidulans</i> )   | MG-----     | -----        | --- -- IASLE | RDTKGGTRFT  | -----      | -GCTS I---- | 22  |
| Sgv1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | MSDNGSPAVL  | PKTEFNKYKI   | GKVKSTPAIQ   | RDAKTNLTYI  | KLRKRSSEKV | YGCTVFQNHY  | 60  |
| Cdk9 ( <i>H. sapiens</i> )    | MA-----     | -----        | --- KQYDSVE  | ---         | ---        | --CP-FCDEV  | 16  |
| PtkA ( <i>A. nidulans</i> )   | REFEFLGKLG  | EGTFGEVYKA   | RAKRDSG I VA | LKKILMHNER  | DGFPITALRE | IKLLKMLSHST | 82  |
| Sgv1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | REDE-- -KLG | QGTFGEVYKGG  | IHLETQRQVA   | MKKIIVSVEK  | DLFPITAQRE | ITILKRLNHHK | 117 |
| Cdk9 ( <i>H. sapiens</i> )    | SKYEKLAKIG  | QGTFGEVYKA   | RHRKTGQKVA   | LKKVLMENEK  | EGFPITALRE | IKILQLLKHKE | 76  |
| PtkA ( <i>A. nidulans</i> )   | NIMQLREMAV  | ERSK-----G   | EGRKKPSMYM   | VFPYMEHDLS  | GLLENPEVHF | SEAQIKCYMI  | 137 |
| Sgv1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | NI IKLIEMVY | DHSPDI TNA A | SSNLHKS FYM  | ILPYMVADLS  | GVLHNPRINL | EMCDIKNMML  | 177 |
| Cdk9 ( <i>H. sapiens</i> )    | NVVNLI EICR | TKASPY----   | -NRCKGSIYL   | VDFDFCEHDLA | GLLSNVLVKF | TLSEIKRVMQ  | 131 |
| PtkA ( <i>A. nidulans</i> )   | QLLEGLKYLH  | GNCILHRDMK   | AANL LISNQG  | ILQIADFGLA  | RPFDEAPPQ- | --PGKGAGEA  | 194 |
| Sgv1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | QILEGLNYIH  | CAKFMHRDIK   | TANILIDHNG   | VLKLADFGLA  | RLYYGCPPNL | KYPG-GAGSG  | 236 |
| Cdk9 ( <i>H. sapiens</i> )    | MLLNGLYYIH  | RNKILHRDMK   | AANVLI TRDG  | VLKLADFGLA  | RAF-----   | --SLAKNSQ   | 181 |
| PtkA ( <i>A. nidulans</i> )   | KRDYTTLVVT  | RWYRPPPELLL  | QLRRYTS AID  | MWGVGCVFGE  | MFKGKPILAG | NSDLNQAQLI  | 254 |
| Sgv1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | AK-YTSVVVT  | RWYRAPELVL   | GDKQYTTAVD   | IWGVGCVFAE  | FFEKKPILQG | KTDIDQGHVI  | 295 |
| Cdk9 ( <i>H. sapiens</i> )    | PNRYTNRVVT  | LWYRPPPELLL  | GERDYGPPID   | LWGAGC IMAE | MWTRSPIMQG | NTEQHQLALI  | 241 |
| PtkA ( <i>A. nidulans</i> )   | FSLVGTPTEE  | NMPGWSSLPG   | CEGVKHFGNR   | PGNLAEVF-K  | DQ-GPMAISL | LTELLKLDWR  | 312 |
| Sgv1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | FKLLGTPTEE  | DWAVARYLPG   | AELTTT--NY   | KPTLRERFGK  | YL-SETGLDF | LGQLLALDPY  | 352 |
| Cdk9 ( <i>H. sapiens</i> )    | SQLCGSI TPE | VWPNVDNYEL   | YEKLELVKGG   | KRKVKDRLKA  | YVRDPYALDL | IDKLLVLDPA  | 301 |
| PtkA ( <i>A. nidulans</i> )   | KRVNAIDALK  | HPYFSTPPLP   | ARPGDLPSFE   | DSHELDRRRF  | RGQR-----A | AMPPAPAG--  | 365 |
| Sgv1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | KRLTAMSAKH  | HPWFKEDPLP   | SEKITLPT-E   | ESHEADIKRY  | KEEMHQLSLQ | RVPTAPRGHI  | 411 |
| Cdk9 ( <i>H. sapiens</i> )    | QRIDSDDALN  | HDFWSDPMP    | S---DLKGM    | STHLTSMFEY  | L-----     | --AP--      | 341 |

**Abbildung 14: Alignment von PtkA mit Sgv1 aus *S. cerevisiae* und Cdk9 aus *H. sapiens*.** PtkA besitzt die verschiedenen Domänen, welche bereits als Kinase-spezifisch definiert wurden. Die ATP-Bindedomänen G-X-G-X-X-G (gelber Rahmen), D-X-X-X-X-N (blauer Rahmen) und DFG (pinkfarbener Rahmen), sowie die Zyklin-Binde-Domäne PITALRE (roter Rahmen). Des Weiteren das unveränderliche Lysin in der ALK Domäne (grüner Rahmen) für den Phosphattransfer und andere konservierte Aminosäuren (schwarzer Rahmen). Die APE-Domäne (orangener Rahmen) ist charakteristisch für Serin/Threonin Kinasen und kommt nicht in Tyrosin-Kinasen vor.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass PtkA in *A. nidulans* eine essentielle Rolle einnimmt, da die Deletion von *ptkA* letal ist. Des Weiteren sind zwei verschiedene Zykline, PclA und PchA, als Interaktionspartner bekannt. PclA ist ein außergewöhnlicher Partner, da es zu der Familie der Pcl Zykline gehört, welche für ihre Funktion in der Kontrolle des Zellzyklus bekannt sind (Huang et al, 2007b). Als weiterer Interaktionspartner wurde PchA identifiziert, welches zu den Zyklinen der T-Familie gehört und somit ein typischer Interaktionspartner von Cdk9 ist. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass PtkA vor allem im Zellkern lokalisiert. Da PtkA kein Kernlokalisi-

sierungssignal (NLS: nuclear localisation signal) besitzt, wird vermutet, dass die Bindung eines Zyklin für die Lokalisierung benötigt wird.

Da Mitglieder der Cdk9 Familie für ihre Funktion in der Regulierung der Transkription bekannt sind, wird auch für PtkA eine Funktion in der Transkriptionskontrolle angenommen. Da PtkA außerdem mit Zyklinen interagiert, welche einen Effekt auf die asexuelle Entwicklung haben, wird angenommen, dass PtkA die Transkription bestimmter Gene entwicklungsabhängig kontrolliert (Bathe et al, 2010).

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Interaktionspartner der Zyklin-abhängigen Kinase PtkA in *A. nidulans*. Dabei sollte die Charakterisierung der gefundenen Partner, durch Lokalisierungs- und Expressionsstudien, Aufschluß über die Funktion von PtkA zusammen mit seinen Interaktionspartnern während der Entwicklung geben. Da zu PtkA homologe Proteine in anderen Organismen für die Kontrolle der Transkription benötigt werden, wurde eine ähnliche Aufgabe von PtkA in *A. nidulans* vermutet, was eine neue Ebene der Entwicklungsregulation bedeuten würde.

### 3. Ergebnisse

In einem genetischen Screen wurde in *A. nidulans* PclA als Zyklin entdeckt, welches für die schnelle Sporenbildung während der asexuellen Entwicklung nötig ist (Schier *et al.*, 2001). PclA spielt außerdem eine Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, da es mit dem Hauptregulator des Zellzyklus, der Kinase NimX (Cdc28) interagiert (Schier & Fischer, 2002). In einem revers-genetischen Ansatz wurde anschließend eine Cdk9 Kinase, PtkA, entdeckt, mit der PclA ebenfalls interagiert. Während das vegetative Wachstum einer *pclA* Mutante nicht beeinträchtigt wurde, war eine Deletion von *ptkA* letal (Bathe *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurden mehrere neue Interaktionspartner von PtkA mit Hilfe eines Yeast two-hybrid Versuches identifiziert. Die gefundenen Interaktionspartner, die Kinase PipA und das Zyklin PclB, wurden durch Lokalisierungs- und Expressionsstudien untersucht. Mit Hilfe der Herstellung von Deletionsmutanten sollte die Funktion von PclB und PipA in *A. nidulans* bestimmt werden.

#### 3.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner mit Hilfe eines Yeast two-hybrid Screens

Es sind bereits zwei Interaktionspartner von PtkA bekannt, die Zykline PclA und PchA. Um mögliche weitere Interaktionspartner von PtkA zu finden, wurde ein Y2H-Screen durchgeführt.

Dafür wurde eine cDNA-Bibliothek von *A. nidulans* benötigt, welche als prey für den Screen verwendet wurde. Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde zuerst RNA nach der Guanidin-Thiocyanat-Methode (Chomczynski, 1987) aus einem *A. nidulans* Wildtypstamm (TN02A3) isoliert und anschließend mit der SMART-Methode cDNA hergestellt (Zhu *et al.*, 2001). Die hergestellte cDNA wurde durch Transformation des Hefestammes Y187 in den Vektor pGADT7-Rec kloniert. Diese Klonierung wird durch die SMART III und CDS III Sequenz an der cDNA und im Vektor pGADT7-Rec ermöglicht. In der Hefe wird der linearisierte Vektor durch Rekombination der homologen Sequenzen an den Enden der cDNA und des Vektors wieder in seine zirkuläre Form zurück gebracht. Die cDNA-Bibliothek wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Da Interaktionspartner der Kinase PtkA gefunden werden sollten, wurden verschiedene PtkA-Konstrukte als bait verwendet. Anfänglich wurden Konstrukte mit



dem Überexpressionsvektor pGBKT7 hergestellt und in den Hefestamm AH109 transformiert. Jedoch hatten diese PtkA-Konstrukte eine toxisch Wirkung auf die Hefezellen, wodurch deren Wachstum verlangsamt oder verhindert wurde. Aufgrund dessen wurden in einem weiteren Schritt verschiedene PtkA-Konstrukte in einen anderen Vektor (pGBT9) kloniert. Es wurden zwei verschiedene Konstrukte für den Screen verwendet. Ein Konstrukt enthielt das Voll-Länge PtkA (PtkA\_1/545) und ein Konstrukt enthielt ein verkürztes PtkA (PtkA\_24/170). Beide Konstrukte wurden jeweils in den Hefestamm AH109 transformiert. Der Y2H-Screen wurde mittels Kreuzung der zwei Hefestämme, Y187 transformiert mit der cDNA-Bibliothek im Vektor pGADT7-Rec und AH109 transformiert mit den PtkA-Konstrukten im Vektor pGBT9, durchgeführt.

Der Vektor pGADT7-Rec besitzt als Marker zur Selektion in Hefe *leu2*, welches für das Enzym  $\beta$ -Isopropylmalat Dehydrogenase kodiert und für die Synthese von Leucin benötigt wird. Die Vektoren pGBT9, sowie pGBKT7 besitzen *trp1* als Marker, welches für die Phosphoribosyl-Anthranilate Isomerase kodiert und für die Synthese von Tryptophan benötigt wird. Zum Testen, ob die Kreuzung erfolgreich war und beide Konstrukte aufgenommen wurden, wurde auf Medium ohne Leucin und ohne Tryptophan selektiert (SD-Leu-Trp). Um eine Interaktion nachzuweisen, wurde auf Medium selektiert, dem zusätzlich Histidin fehlte (TDO). Die Vektoren pGBT9 und pGBKT7 enthalten die GAL4 DNA-Bindedomäne und der Vektor pGADT7-Rec enthält die GAL4-Aktivierungsdomäne. Durch eine Interaktion können sich die Aktivierungsdomäne und die Bindedomäne verbinden, wodurch ein vollständiger Transkriptionsfaktor gebildet wird, der die Transkription des Reportergens *his3* aktiviert. Dieses Gen kodiert für die Imidazolglyzerol-Phosphat Dehydratase, welche für die Synthese von Histidin benötigt wird.

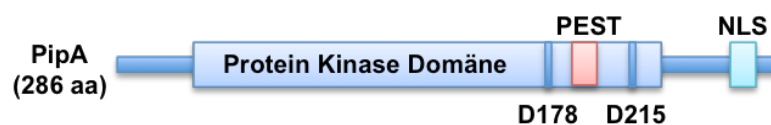
Nach dem ersten Screen (Tabelle 1) mit PtkA\_24/170 konnten etwa 450 Kolonien auf dem Selektionsmedium (TDO) wachsen. Durch erneutes ausstreichen der Kolonien auf Selektionsmedium konnte etwa die Hälfte der Kolonien wieder anwachsen, wohingegen die restlichen Kolonien nicht mehr fähig waren zuwachsen und somit als falsch-positive Interaktionspartner aussortiert wurden. Von den restlichen Kolonien wurden die Plasmide isoliert. Auf die isolierten Plasmide wurde eine PCR durchgeführt, um festzustellen, welche Kolonien unterschiedliche Plasmide enthielten. Bei einem Teil der getesteten Kolonien konnte durch die PCR kein cDNA Insert amplifiziert werden, weshalb die entsprechenden Kolonien ebenfalls verworfen wurden. Die restlichen PCR-Produkte wurden mit *HaeIII* verdaut und auf ein Gel aufgetragen. Die PCR-Produkte, welche durch den Verdau verschiedene Bandenmuster

aufwiesen, wurden zum sequenzieren geschickt, um die Sequenz des Interaktionspartners zu erfahren. Mit Hilfe der erhaltenen Sequenzen und einer Suche mit BLAST, konnten die in Tabelle 1 aufgeführten Gene identifiziert werden. Für die weitere Untersuchung wurde, aufgrund seiner starken Interaktion im Y2H-Screen und der bekannten Funktion in anderen Organismen, ein Kandidat ausgewählt. Dies war das Gen mit der Identifizierungsnummer AN2513.2 (Broad Institute). Es wurde *pipA* genannt, was für PtkA-interacting protein A steht.

**Tabelle 1: Identifizierte Klone des Y2H-Screens mit dem N-terminus von PtkA (pGBT9-PtkA\_24/170) als bait**

| Identifizierungsnr. BROAD Institute | Anzahl gefundener Klone | Konservierte Domänen                  | Funktion in anderen Organismen   |
|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--|
| AN9297.2                            | 12                      | Myosin cross-reactive antigene        | Mitglieder dieser Familie haben die gleichen strukturellen Eigenschaften wie die beta-chain der Klasse II Antigene sowie Myosin                |
| AN9297.2                            | 1                       | methionine aminopeptidase 2B          | Diese Familie enthält Metallopeptidasen.   |
| AN0451.2                            | 6                       | C-8 sterol isomerase                  | Katalysiert eine Reaktion in der Ergosterol Biosynthese, wodurch ein ungesättigtes C-7 im B-Ring des Sterols entsteht                          |
| AN03223.1                           | 4                       | 6-Phosphofruktokinase alpha-subunit   | Katalysiert die Phosphorylierung von Fruktose-6-Phosphate zu Fruktose-1,6- biphosphate. Ein Schlüsselschritt im glykolytischem Stoffwechselweg |
| AN7044.2                            | 1                       | Histidinol phosphatase                | Besitzt eine PHP (Polymerase und Histidinol Phosphatase) Domäne, welche eine mögliche Phosphoesterase Domäne ist                               |
| AN3847.2                            | 1                       | Oxidoreductase                        | ---  |
| AN3586.2                            | 1                       | Ubiquinone biosynthesis monooxygenase | ---  |
| AN7432.2                            | 1                       | Ornithine decarboxylase antizyme      | ---  |
| AN4202.1                            | 1                       | Ribosomale protein L16a               | Ribosomales Protein von der großen ribosomalen Untereinheit  |
| AN2513.2 (PipA)                     | 1                       | Serine/Threonine-Protein Kinase Bud32 | Bud32 ist eine Untereinheit vom EKC/KEOPS Komplex, welcher eine Rolle in der Transkription und der Erhaltung der Telomere spielt.              |

PipA ist eine Serin/Threonin Kinase aus *A. nidulans*, welche aus 286 Aminosäuren besteht. Das dafür kodierende Gen hat eine Länge von 858 bp und besitzt keine Introns. PipA ist eine Proteinkinase, was durch das Vorhandensein einer Proteinkinasedomäne (26-239 aa) bestätigt wird (Abb. 15). Des Weiteren besitzt das Protein zwei konservierte Aspartat-Reste (D178 und D215), was darauf schließen lässt, dass seine Aktivität mit Hilfe der Änderung des Phosphorylierungszustandes reguliert wird. Außerdem ist eine PEST-Domäne (188-200 aa) vorhanden, welche ein Zeichen für ein relativ instabiles Protein ist, welches leicht abgebaut werden kann. Eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) ist ebenfalls vorhanden (269-283 aa). Diese Sequenz lässt auf eine Lokalisierung des Proteins im Zellkern schließen.



**Abbildung 15: Konservierte Domänen in PipA.** Das PipA Protein hat eine Länge von 286 Aminosäuren und besitzt eine Protein Kinase Domäne (26-239 aa). Des Weiteren sind zwei konservierte Aspartat (D178 und D215) vorhanden, sowie eine PEST-Domäne (188-200 aa) und ein Kernlokalisierungssignal, die NLS (269-283 aa). Ermittlung der Domänen mit Hilfe von PFAM, ELM und EMBOSS epefind.

Zu PipA homologe Proteine sind auch in anderen filamentösen Pilzen, wie *Aspergillus fumigatus* oder *Penicillium marneffeii* vorhanden (Abb. 16). Die Funktion dieser Proteine in diesen Organismen ist nicht bekannt. Das zu PipA homologe Protein in *S. cerevisiae* oder *S. pombe* ist im Gegensatz dazu schon näher beschrieben und wird als Bud32 bezeichnet. Bud32 aus *S. cerevisiae* ist ebenfalls eine Serin/Threonin Kinase, die jedoch nicht zu den typischen Vertretern dieser Familie gehört (Briza et al, 2002; Facchin et al, 2002b; Sartori et al, 2000). Diese Kinase ist viel kürzer als die meisten anderen bekannten Kinasen und es fehlen verschiedene konservierte Domänen (Abb. 16). Eine weitere untypische Eigenschaft ist, dass Bud32 nicht in der Lage ist Mg-ATP umzusetzen, sondern nur Mn-ATP. Trotz der abweichenden Eigenschaften und des Fehlens verschiedener konservierter Domänen, konnte durch den Austausch der vorhandenen Domänen nachgewiesen werden, dass Bud32 alle wichtigen Eigenschaften einer Kinase besitzt (Facchin et al, 2002a). Außerdem konnte herausgefunden werden, dass Bud32 eine wichtige Funktion in der Zelle einnimmt, da die Deletion das Wachstum verlangsamt, die Überlebensfähigkeit in der stationären Phase verringert, die Sporulation von homozygoten Diploiden verhindert und keine meiotischen Teilungen möglich sind. Darüber hinaus verursacht die Deletion eine Veränderung der Zellwand (de Groot et al, 2001).

|                       |            |             |             |            |            |             |             |            |    |
|-----------------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|----|
| A. fumigatus          | MASTDPYTPP | P-----      | LSPSFTNT    | --         | -TPPPQLLTQ | GAEAHLYKTV  | FLSPSTPAA   | 47         |    |
| PipA (A. nidulans)    | MPPTN--RPP | PFSTILSSAS  | LPS-YSSSTDE | LTP----    | IYQ        | GAEAHLYKTT  | FLSPSQPAA   | 52         |    |
| P. mameffei           | M--NTEYTPP | P-----      | LPPFFAHS    | --         | -TPPPTLAQ  | GAEARLYKAT  | FLTPDTPAA   | 45         |    |
| Bud32 (S. pombe)      | MSEKPDLRQ- | -----R      | CSDIYREIKE  | KKL--      | TVVKQ      | GAEAITIKTE  | FY-PGEVCL   | 46         |    |
| Bud32 (S. cerevisiae) | MTQE-----  | -----FIDK   | VSSYLTPD    | V          | IAP----    | ISQ         | GAEIVFTTT   | -THPYLPRAK | 43 |
| A. fumigatus          | -----LKV   | RPSKPYRHP   | LDLRLTRQRI  | LQEARCLV   | KL         | VR-EGVNVPA  | VLALDWEGQS  | 99         |    |
| PipA (A. nidulans)    | -----LKI   | RPSKPYRHP   | LDLRLTRARI  | LQEARCLQ   | KL         | VK-EGVSVPA  | LLGVDWEP    | 104        |    |
| P. mameffei           | -----LKI   | RPTKPYRHEL  | LDLRLTRQRI  | LHEARCLM   | KL         | VR-EGVSVPA  | VLALDWDPAT  | 97         |    |
| Bud32 (S. pombe)      | -----LKC   | RPAKRWRHP   | LDQKLSRRC   | LVEARLLA   | KC         | HY-VGKCPM   | LYFIDAN--   | 95         |    |
| Bud32 (S. cerevisiae) | DSHQYIKY   | RPPKRYRHP   | IDQALTKHRT  | LNESRLLA   | KL         | YLIPGLCVP   | LIACD----   | 98         |    |
| A. fumigatus          | --GEKGF    | AWLMEWIEG   | MVVR-VVLER  | WEKYMK-    | ---        | RNQAGLGAE   | LEKEEA--RV  | 149        |    |
| PipA (A. nidulans)    | --GD--GS   | SWLMEWIEG   | EPVR-VILEE  | WEAYLKG    | IER        | EKRLGLGEG   | QGSEEE--KV  | 155        |    |
| P. mameffei           | PATGERSVG- | AWLMEWIDG   | LAYK-HILER  | WEKWMK-    | ---        | -KS IATGDSN | FNKEEEEIKV  | 150        |    |
| Bud32 (S. pombe)      | --RGQ----  | -IYMEWIDG   | PCVDRYIRE   | CEC----    | ---        | -----       | ---EIEKKL   | 125        |    |
| Bud32 (S. cerevisiae) | PYNG-----  | -FIWLEFLGE  | DLPGGHGFSN  | LKNFLWM    | H          | -----       | ---QDPYSDLV | 138        |    |
| A. fumigatus          | RDLMKRIGHA | VGALHKAGVI  | HGDLTTSNLI  | LRPPTRAEQ  | Q          | PAADETN--P  | SMEGDVVLID  | 207        |    |
| PipA (A. nidulans)    | RGLMRRIGRA | VGGLHRAGVI  | HGDLTTSNLM  | LRPLGSADTT | ETIEERDQSP | SMAGEVVMID  | 215         |            |    |
| P. mameffei           | KELMKNIGRT | VGGMHKGVV   | HGDLTTSNMI  | LRPV-----  | D          | PTPTGITELP  | SMTGDIVLID  | 205        |    |
| Bud32 (S. pombe)      | IPLMKRIGSE | VAKMHKNDIV  | HGDLTTSNMM  | LE-----    | ---        | SHNNPVP     | ----IFID    | 168        |    |
| Bud32 (S. cerevisiae) | ATTLRKVGRQ | IGLLHWNDYC  | HGDLTSSNIV  | L-----     | ---        | VRDGARWTP   | H-----LID   | 182        |    |
| A. fumigatus          | FGLASQSLQD | EDRAVDLYVL  | ERAFGSTHPR  | -TEPLFTEVL | SGYKESY--- | ---KGASS--- | 258         |            |    |
| PipA (A. nidulans)    | FGLAMQSSQD | EDRAVDLYVL  | ERAFGSSHPR  | -TERFFEEVL | VGYRESY--- | ---KGAVS--- | 266         |            |    |
| P. mameffei           | FGLASMSSHE | EDRAVDLYVL  | ERAFGSTHPM  | -TEDFSEIL  | DGYAESF--- | ---KGAKL--- | 256         |            |    |
| Bud32 (S. pombe)      | FGLGSVSESE | EDKAVDIYVL  | ERALSSTLPE  | -SESLFHHVL | DSYAQSW--- | ---KQSKA--- | 219         |            |    |
| Bud32 (S. cerevisiae) | FGLGSVSNLV | EDKGVLDLYVL | ERALSTHSK   | HAEKYNWIM  | EGFEVYREQ  | GAKGAKKLKE  | 242         |            |    |
| A. fumigatus          | ALKRLEEV   | RGRKRSMIG   | 277         |            |            |             |             |            |    |
| PipA (A. nidulans)    | ALKRLEDV   | RGRKRSMIG   | 286         |            |            |             |             |            |    |
| P. mameffei           | VLKLEDV    | RGRKRSMIG   | 275         |            |            |             |             |            |    |
| Bud32 (S. pombe)      | TLRRFEEV   | RGRKRSMIG   | 238         |            |            |             |             |            |    |
| Bud32 (S. cerevisiae) | VTKRFEEV   | RGRKRSMIG   | 261         |            |            |             |             |            |    |

**Abbildung 16: Alignment von PipA aus *A. nidulans* mit den homologen Proteinen in *A. fumigatus*, *Penicillium mameffei*, Bud32 aus *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*.** PipA besitzt die verschiedenen Domänen, welche bereits als Kinase-spezifisch definiert wurden. Die ATP-Bindedomänen G-X-G-X-X-G (gelber Rahmen) mit dem unveränderlichen Glyzin, D-X-X-X-X-N (blauer Rahmen) und DFG (pinker Rahmen), sowie das unveränderliche Glutamin (roter Rahmen). Des Weiteren das unveränderliche Lysin in der ALK Domäne (grüner Rahmen) für den Phosphattransfer. Die Protein Kinase Domäne von PipA ist mit einem blauen Rahmen gekennzeichnet.

Bud32 ist aus *S. cerevisiae* als ein Bestandteil des KEOPS/EKC Komplexes (Hecker et al, 2008; Srinivasan et al, 2011) bekannt. KEOPS steht für Kinase, Endopeptidase and other proteins of small size. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Komplex eine Funktion während der Transkription hat und auch für die Erhaltung der Telomere, sowie für die Aufteilung von Chromosomen benötigt wird.

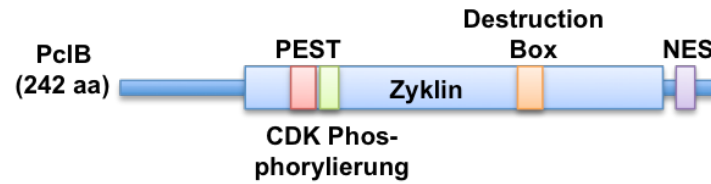
In einem zweiten Screen (Tabelle 2) mit PtkA\_1/545 konnten 120 Kolonien auf dem verwendeten Selektionsmedium (TDO) anwachsen. Die Kolonien, wurden wie bei dem ersten Screen, erneut auf Selektionsmedium ausgestrichen, wodurch etwa 100 Kolonien erneut wachsen konnten. Die Kolonien, welche nicht wieder angewachsen sind, wurden als falsch-positive Kolonien verworfen. Die restlichen Kolonien wurden, wie bereits für den ersten Screen beschrieben, getestet. Von den identifizierten möglichen Interaktionspartnern wurde erneut ein Kandidat für weitere Untersuchungen ausgewählt. Das Gen mit der Identifizierungsnummer AN10741.1 wurde wegen seiner starken Interaktion im Y2H-Screen und der bekannten Funktion in anderen Organismen ausgesucht. Der Interaktionspartner AN10741.1 wurde, aufgrund seiner

Homologie zu dem Zyklin Pcl7 aus *S. cerevisiae* und da es bereits ein Pcl-Zyklin (PclA) in *A. nidulans* gibt, als PclB bezeichnet. Pcl7 aus *S. cerevisiae* gehört zu den Pho85 Zyklinen und nimmt eine Rolle im Zellzyklus und in der Entwicklung von *S. cerevisiae* ein (Measday et al, 1997).

**Tabelle 2: Y2H-Screen mit pGBT9-PtkA\_1/545 als bait**

| Identifizierungsnr. BROAD Institute | Anzahl gefundener Klone | Konservierte Domänen                              | Funktion in anderen Organismen  |
|-------------------------------------|-------------------------|---|---|
| AN6605.2                            | 5                       | FAD dependent oxidoreductase                      | Katalysiert die Oxidation von neutralen und basischen D-Aminosäuren in die entsprechende Ketosäure.   |
| AN6827. 1                           | 1                       | ssDNA binding protein Ssb3                        | Rolle im Nukleinsäuren Metabolismus (Replikation, Rekombination, DNA Reparatur, Erhaltung der Telomere).  |
| AN5438.2                            | 3                       | TPR repeat protein                                | Proteine mit einer Rolle im Zellzyklus, der Transkription und der Proteinfaltung.   |
| AN6600.2                            | 1                       | Mis6 domain-containing protein                    | Verantwortlich für die Orientierung der Schwester-Zentromeren in der Metaphase.   |
| AN10741.1 (PclB)                    | 1                       | Cyclin-dependent protein kinase complex component | Gehört zu einer Familie, deren Mitglieder das G1/S-spezifische Zyklin Pas1 ( <i>S. pombe</i> ) und das Pho85 Zyklin Pcl7 ( <i>S. cerevisiae</i> ) beinhaltet. |
| AN11303.1                           | 1                       | ATP synthase e chain                              | Komponente der CF (0) Untereinheit (ATPase).  |
| AN4730.2                            | 1                       | 37S ribosomal Protein S12                         | Ein Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit (S12 in Bakterien und S23 in Eukaryoten).  |
| AN11317.1                           | 4                       | hypothetisches Protein                            | ---   |
| AN7249.2                            | 3                       | hypothetisches Protein                            | ---   |

Das *pcB* Gen hat eine Länge von 726 bp und codiert für ein Protein mit einer Länge von 242 Aminosäuren (Abb. 17). Es besitzt eine PEST-Domäne (82-92 aa), sowie eine Destruction Box (169-177 aa). Des Weiteren ist eine Stelle zur Phosphorylierung durch eine Zyklin-abhängige Kinase bekannt (87-93 aa) und ein Kernexportsignal (NES: 208-223 aa).



**Abbildung 17: Konservierte Domänen in PclB.** Das PclB Protein hat eine Länge von 242 Aminosäuren und besitzt eine Zyklin-Domäne (49-219 aa), eine PEST-Domäne (82-92 aa), sowie eine Destruction Box (169-177 aa). Außerdem ist eine konservierte Domäne für die Phosphorylierung einer Cdk (87-93 aa) vorhanden und ein Kernexportsignal (NES: 208-223 aa).

Es sind zu PclB homologe Proteine auch aus anderen filamentösen Pilzen bekannt, jedoch sind diese dort auch noch nicht beschrieben. Außerdem gibt es ein Homolog von PclB in *S. cerevisiae*, Pcl7 (Abb. 18). Die am besten konservierte Region befindet sich in der Region der Zyklin-Box. Im Gegensatz zu Pcl1 wird Pcl7 nicht während der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus exprimiert, sondern während der S-Phase (Lee et al, 2000). Pcl7 interagiert ebenfalls mit Pho85. Dieser Komplex wird durch den Inhibitor Pho81 reguliert, in Abhängigkeit vom Phosphat-Gehalt der Umgebung.

|                               |             |            |             |            |             |            |     |
|-------------------------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-----|
| PclB ( <i>A. nidulans</i> )   | MNSGVG      | -----EG    | EGEP--SLDA  | TN--AQQV-- | LGLLPLPKEV  | KYDPNFH--- | 39  |
| <i>A. fumigatus</i>           | MMNGCRT     | -----HG    | EGDQ--VTPD  | SN--AQTD-- | SNLSKGEDEM  | GFS---H--- | 37  |
| <i>P. mamefei</i>             | MTVQTEH     | -----DG    | DAKEHTVSPS  | QH--ANVP-- | SGVPPIDERD  | AL-----    | 37  |
| Pcl7 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | MELSSPSKKT  | TTSPINIPGG | NRDNLIIIGPH | SHSFKTDPFS | SNNSSLLSKI  | STNPSLESPP | 60  |
| PclB ( <i>A. nidulans</i> )   | -RPHISAIRP  | ENAMELLCIA | VDMLLAMSTT  | RAL----SG  | DAS---ESGV  | RNE-V--SSG | 87  |
| <i>A. fumigatus</i>           | -VSEVFDILP  | ATALELLCVN | VEFLARPSVG  | KVVEPVLAAG | STP---ATMA  | RSDSL--SSG | 91  |
| <i>P. mamefei</i>             | ----VFQIPP  | IDALKAMTAH | LTELAHVTDG  | VPATPYAQQQ | PQN---SEDS  | NQDLI--AEK | 88  |
| Pcl7 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | SSKSLDLCSP  | VQAVK----- | -----       | -----      | ---KSLESEA  | KTHSLDEETN | 92  |
| PclB ( <i>A. nidulans</i> )   | ENTPTRVEEL  | -----R     | FHP----HGH  | -----DL--- | -----       | -----      | 106 |
| <i>A. fumigatus</i>           | EATPTRIIEL  | -----H     | CSP----ISH  | EEGARDG--- | -----       | -----      | 115 |
| <i>P. mamefei</i>             | QMPAVSITEL  | -----HG    | IND----AAA  | DSPSAGV--- | -----       | -----      | 113 |
| Pcl7 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | EQTDVKILNI  | -----      | -----A      | DFPTDELILM | ISALLNRIIT  | ANDETTDVSQ | 133 |
| PclB ( <i>A. nidulans</i> )   | -----       | -----      | ---TQQSLLC  | K--RFLSKRE | PPITLKEYLT  | RFHHYCPNST | 141 |
| <i>A. fumigatus</i>           | -----       | -----      | ---IQQLMLS  | K--RFLSKRE | PPISLRDYLL  | RLHRYCPMST | 150 |
| <i>P. mamefei</i>             | -----       | -----      | ---IQHNVLV  | K--RFYSKKA | PPISLEDYLL  | RLHKYCPMST | 148 |
| Pcl7 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | QVSD-----   | -----      | ---ETEDELLT | PI LAFYGNV | PEI AVVQYLE | RIQKYCPTTN | 175 |
| PclB ( <i>A. nidulans</i> )   | GVYIAASLYI  | TRIA-----  | -----VVDSV  | ISVNRKNMHR | LVLAGLRVAM  | KTVEDLVYPH | 190 |
| <i>A. fumigatus</i>           | AVYLATSIIYI | TRLA-----  | -----TVDRV  | ISVNGKNMHR | LVLAGLRVAM  | KALEDLSYPH | 199 |
| <i>P. mamefei</i>             | AVYLAASLYI  | TRMV-----  | -----FTEKA  | LFVTPRNVHR | LVLAAALRVAM | KALEDLSYPH | 197 |
| Pcl7 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | DIFLSLLVYF  | DRISKNYGHS | SERNGCAKQL  | FVMDSGNIHR | LLITGVTICT  | KFLSDFYSN  | 235 |
| PclB ( <i>A. nidulans</i> )   | SRVAKVGGVT  | ERELTRLEIS | FCFLADFDLR  | VDEQTLDNQA | GILHWYME--  | -----      | 238 |
| <i>A. fumigatus</i>           | SRVAKVGGVS  | ERELSRLEIS | FCFLTDFELR  | VDAQMLADQA | QSLRSSMDL-  | -----      | 248 |
| <i>P. mamefei</i>             | ARFARVGGVA  | ERELTRLEIT | FCFLTDFDLR  | VDAHALLCHN | NLLNGTPEPT  | ENSND----- | 252 |
| Pcl7 ( <i>S. cerevisiae</i> ) | SRYAKVGGIS  | LQELNHLELQ | FLILCDFKLL  | VSVEEMQKYA | NLLYKFWN--  | -----      | 283 |

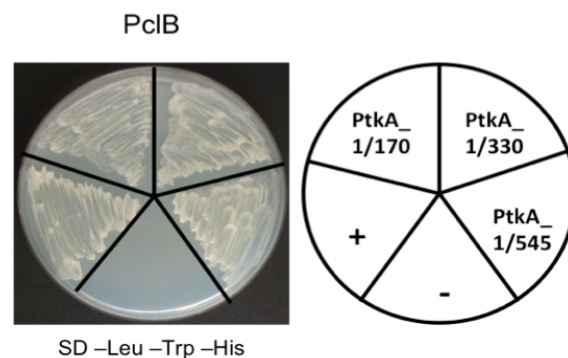
**Abbildung 18: Alignment von PclB aus *A. nidulans* mit den homologen Proteinen in *A. fumigatus*, *P. mamefei* und Pcl7 aus *S. cerevisiae*.** Da die Sequenz von Zyklinen nur schlecht konserviert ist, können homologe Bereiche hauptsächlich in der Region der Zyklin-Domäne (blauer Rahmen) nachgewiesen werden.

### 3.2 Bestätigung der gefundenen Interaktionen aus dem Y2H-Screen

Die Interaktion von PtkA, mit den im Y2H-Screen gefundenen Interaktionspartnern PipA und PclB, wurde mit Hilfe von bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) und einem direkten Y2H-Test bestätigt.

#### 3.2.1 Bestätigung der Interaktion von PtkA mit PclB durch Y2H und BiFC

Zur Bestätigung der Interaktion von PtkA mit PclB wurde ein Y2H-Test mit Hilfe von verschiedenen PtkA-Konstrukten durchgeführt. Für den Y2H wurde als prey der Stamm AH109, transformiert mit pGADT7-PclB, verwendet. Als bait wurde der Stamm Y187, transformiert mit verschiedenen pGBT9-PtkA-Konstrukten, benutzt. Es wurden ein Voll-Länge PtkA-Konstrukt (PtkA\_1/545) und zwei verkürzte PtkA-Konstrukte (PtkA\_1/170 und PtkA\_1/330) verwendet. Mit Hilfe der unterschiedlichen PtkA-Konstrukte konnte die im Y2H-Screen gefundene Interaktion mit PclB bestätigt werden (Abb. 19).

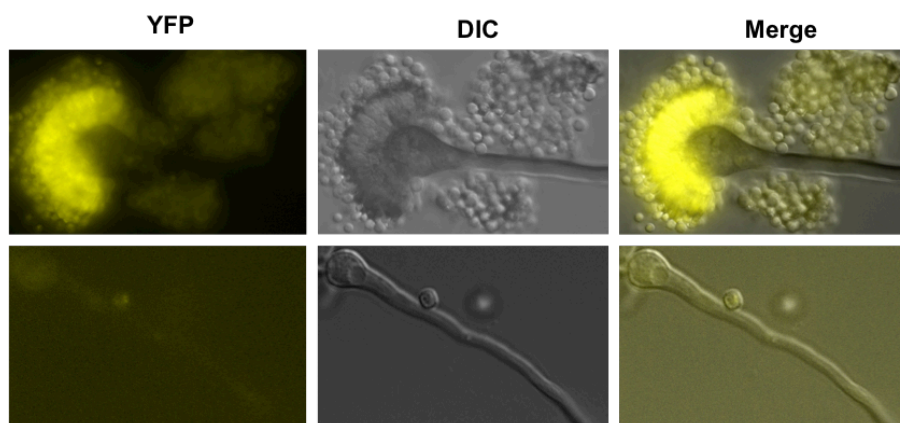


**Abbildung 19: Bestätigung der Interaktion von PtkA mit PclB durch einen Y2H-Versuch.** Durchführung eines Y2H-Tests zum direkten Nachweis der Interaktion zwischen PclB und verschiedenen PtkA-Konstrukten. Es konnte mit den drei verschiedenen PtkA-Konstrukten (PtkA\_1/170, PtkA\_1/330 und PtkA\_1/545) die Interaktion mit PclB bestätigt werden. Als Positivkontrolle wurde eine Kreuzung zwischen dem Stamm AH109, transformiert mit pGADT7-RecT und dem Stamm Y187, transformiert mit pGBKT7-53, durchgeführt. Die Negativkontrolle besteht aus einer Kreuzung zwischen AH109 transformiert mit pGADT7-RecT und Y187 transformiert mit pGBKT7-Lam (Kontrollen aus Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit).

Zur weiteren Bestätigung der Interaktion und zur Überprüfung wo in *A. nidulans* die beiden Proteine miteinander interagieren, wurden BiFC Analysen durchgeführt. Mit dieser Methode werden Proteine jeweils mit dem N- oder mit dem C-terminalen Teil des gelbfluoreszierenden Proteins YFP fusioniert. Findet eine Interaktion zwischen den Proteinen statt, verbindet sich der N- und der C-terminale Teil, wodurch ein funktionsfähiges YFP entsteht. Dies führt zur Ausbildung eines gelben Fluoreszenzsignals. Findet keine Interaktion statt, bleiben die YFP-Hälften getrennt, wodurch keine Fluoreszenz entsteht.

PtkA wurde mit dem C-terminalen Teil von YFP fusioniert und PclB mit dem N-terminalen Teil. Dafür wurden Vektoren verwendet, die jeweils nur einen Teil von YFP besitzen. Des Weiteren enthalten die Vektoren den induzierbaren Promotor der Alkoholdehydrogenase (*alcA*), wodurch die Expression der Fusionsproteine mit Hilfe unterschiedlicher Kohlenstoff-Quellen im verwendeten Medium kontrolliert werden kann. Durch Glukose im Medium wird der Promotor reprimiert, durch Threonin induziert und durch Glycerin dereprimiert. Durch eine Kotransformation der Konstrukte in den Wildtypstamm GR5 wurde der Stamm SKC20 erzeugt. Die Transformation wurde durch das Ausbringen auf Selektionsmedium und durch Überprüfung der erhaltenen Kolonien mittels PCR kontrolliert. Die Kolonien, welche beide Konstrukte enthielten, wurden für weitere mikroskopische Untersuchungen verwendet. Für die Mikroskopie von Konidiophoren wurden entweder direkt von der Platte Konidiophoren abgekratzt oder es wurden mit Glycerin-Medium überschichtete Objektträger verwendet. Die Objektträger wurden mit einer Sporensuspension beimpft und zwei Tage bei 37 °C inkubiert, um die asexuelle Entwicklung und somit die Entstehung von Konidiophoren zu ermöglichen.

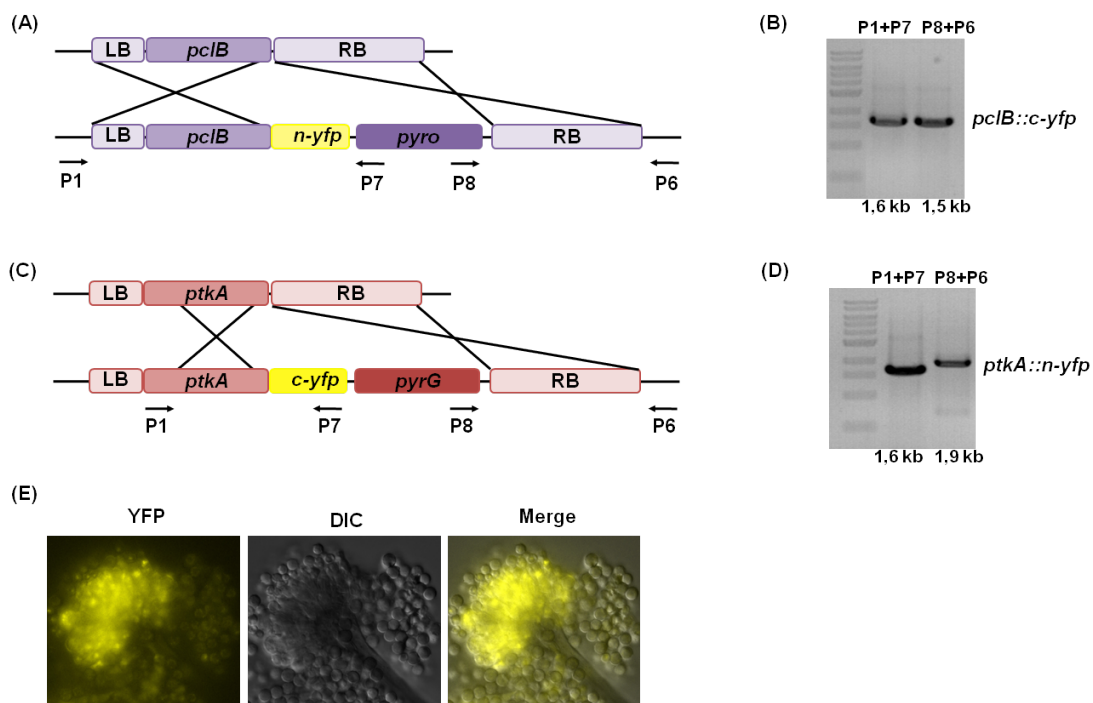
Durch die Verwendung von BiFC konnte eine Interaktion von PclB mit PtkA auch in *A. nidulans* nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnte eine Interaktion nur in den Metulae und den Phialiden der Konidiophoren gezeigt werden. In den Hyphen wurde kein Fluoreszenzsignal festgestellt. Somit ist die Interaktion spezifisch auf die spätere Phase der asexuellen Entwicklung beschränkt (Abb. 20). In *pclA* Mutanten prägt sich der Phänotyp in diesem Entwicklungsstadium durch eine verringerte Sporenbildungsrate aus.



**Abbildung 20: Nachweis der Interaktion von PclB mit PtkA in den Konidiophoren durch Split-YFP.** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC20 (*alcA(p)::c-yfp::ptkA, alcA(p)::n-yfp::pclB*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium mit 2 % Glycerin gewachsen ist. Es konnte nur in den Konidiophoren eine Interaktion nachgewiesen werden. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im YFP-Kanal, DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).



Um die Interaktion und Lokalisierung auch unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen, wurden mit Hilfe der Fusion-PCR-Methode (Szewczyk et al, 2006) Konstrukte hergestellt, mit denen PclB und PtkA jeweils C-terminal mit einem Teil von YFP markiert wurden. Die erzeugten Konstrukte bestehen aus der *yfp*-Sequenz, welche von Bereichen des *pclB*- oder *ptkA*-Gens, sowie von genomischen Sequenzen stromabwärts oder –aufwärts der jeweiligen Gene flankiert werden (Abb. 21 a und 21 c). Die erhaltenen Konstrukte wurden durch PCR hergestellt und direkt in den *nkuA*-Deletionsstamm TN02A3 transformiert, wodurch der Stamm SKC30 hergestellt wurde. Dem Stamm TN02A3 fehlt das *nkuA*-Gen, welches homolog zum humanen *ku70*-Gen ist. Die Wahrscheinlichkeit für eine homologe Rekombination wird erhöht, wodurch zielgerichtet DNA in das Genom von *A. nidulans* eingebaut werden kann. Findet eine homologe Rekombination mit dem transformierten Konstrukt statt, dann wird das YFP an den natürlichen Genort integriert. Somit entstehen C-terminal markierte Fusionsproteine, welche unter der Kontrolle des natürlichen Promotors stehen. Die richtige Integration in den erhaltenen Transformanten wurde durch PCR nachgewiesen (Abb. 21 b und 21 d). Des Weiteren wurden die Transformanten mikroskopisch untersucht, wobei die Lokalisierung der Interaktion erneut nur in den Konidiophoren nachgewiesen werden konnte (Abb. 21 e).

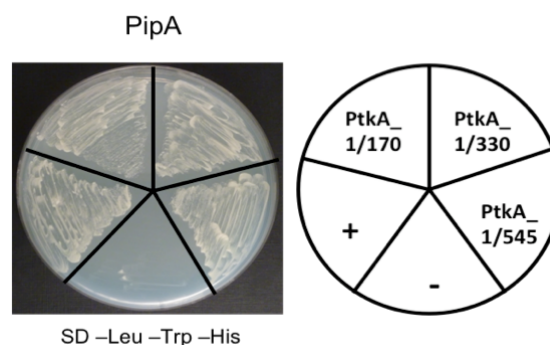


**Abbildung 21: Nachweis der Interaktion von PclB mit PtkA durch BiFC, unter der Kontrolle des natürlichen Promotors, in den Konidiophoren. (A)** Schematische Darstellung der Lokalisierung von *pclB* im Genom und des transformierten PCR Produkts von *pclB::nyfp::pyro*, sowie des Ortes der homologen Rekombination. Die Pfeile mit der Nummerierung P1,P6, P7 und P8 geben die Primer an, welche für die Überprüfung der homologen

Rekombination verwendet wurden. **(B)** PCR zum Nachweis der homologen Integration. Als Marker wurde der 1 kb DNA Ladder (NewEngland Biolabs) verwendet. Der Primer P1 bindet in einer stromaufwärts von *pcIB* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. P7 bindet am Anfang von *pyro*. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P1 und P7 ist 1,6 kb groß. P8 bindet am Ende von *pyro*. Der Primer P6 bindet in einer stromabwärts von *pcIB* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P8 und P6 ist 1,5 kb groß. **(C)** Schematische Darstellung der Lokalisierung von *ptkA* im Genom und des transformierten PCR Produkts von *ptkA::cyfp::pyrG*, sowie des Ortes der homologen Rekombination. Die Pfeile mit der Nummerierung P1, P6, P7 und P8 geben die Primer an, welche für die Überprüfung der homologen Rekombination verwendet wurden. **(D)** PCR zum Nachweis der homologen Integration. Als Marker wurde der 1 kb DNA Ladder (NewEngland Biolabs) verwendet. Der Primer P1 bindet in einer stromaufwärts von *ptkA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. P7 bindet am Ende von *c-yfp*. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P1 und P7 ist 1,6 kb groß. P8 bindet am Ende von *pyrG*. Der Primer P6 bindet in einer stromabwärts von *ptkA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P8 und P6 ist 1,9 kb groß. **(E)** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC30 (*ptkA(p)::c-yfp::ptkA*, *pcIB(p)::n-yfp::pcIB*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium mit Glukose gewachsen ist. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im YFP-Kanal, DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).

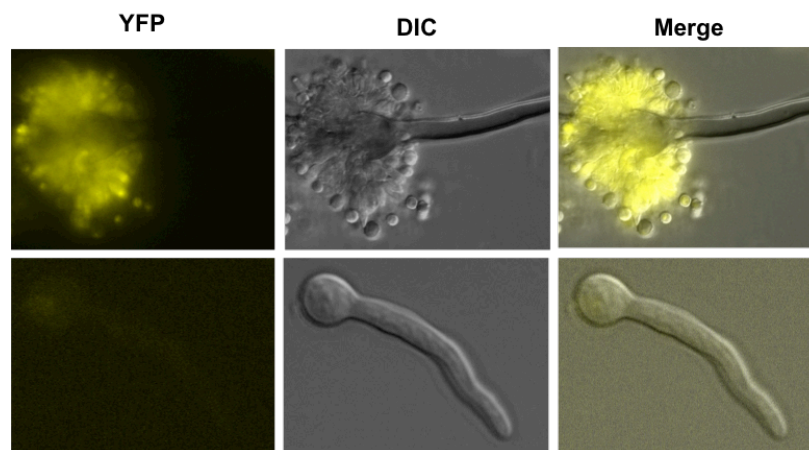
### 3.2.2 Bestätigung der Interaktion von PtkA mit PipA durch Y2H und BiFC

Zum Nachweis der Interaktion von PtkA mit PipA wurde ebenfalls ein Y2H-Test mit Hilfe von verschiedenen PtkA-Stämmen durchgeführt. Für den Y2H wurde als prey der Stamm AH109 transformiert mit pGADT7-PipA verwendet und als bait der Stamm Y187 transformiert mit verschiedenen pGBT9-PtkA-Konstrukten. Es wurde ein Voll-Länge PtkA-Konstrukt (PtkA\_1/545) und zwei verkürzte PtkA-Konstrukte (PtkA\_1/170 und PtkA\_1/330) verwendet. Mit den unterschiedlichen verwendeten PtkA-Konstrukten konnte die im Y2H-Screen gefundene Interaktion mit PipA bestätigt werden (Abb. 22).



**Abbildung 22: Bestätigung der Interaktion von PtkA mit PipA mit Hilfe eines Y2H-Versuch.** Durchführung eines Y2H-Tests zur direkten Überprüfung der Interaktion zwischen PipA und PtkA. Es konnte mit drei verschiedenen PtkA-Konstrukten (PtkA\_1/170, PtkA\_1/330 und PtkA\_1/545) die Interaktion mit PipA bestätigt werden. Als Positivkontrolle wurde eine Kreuzung zwischen dem Stamm AH109, transformiert mit pGADT7-RecT und dem Stamm Y187, transformiert mit pGBKT7-53, durchgeführt. Die Negativkontrolle besteht aus einer Kreuzung zwischen AH109 transformiert mit pGADT7-RecT und Y187 transformiert mit pGBKT7-Lam (Kontrollen aus Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit).

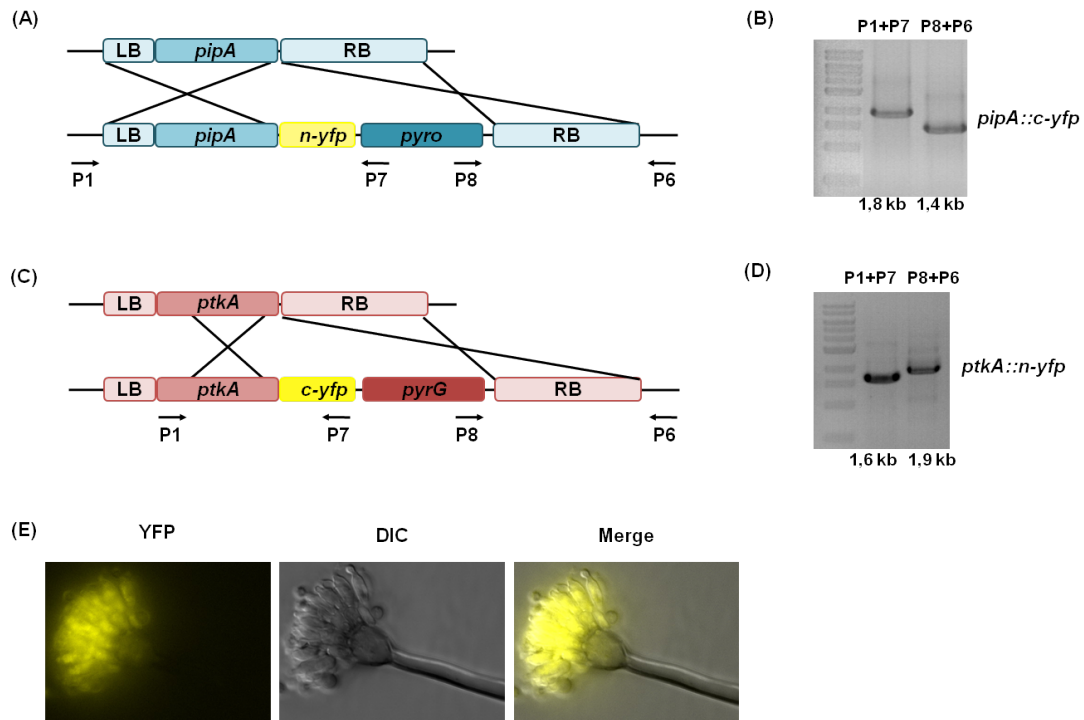
Zur weiteren Bestätigung der Interaktion und zur Überprüfung, wo in *A. nidulans* die beiden Proteine miteinander interagieren, wurden auch mit PtkA und PipA BiFC Analysen durchgeführt. PtkA wurde mit dem C-terminalen Teil von YFP fusioniert und PipA mit dem N-terminalen Teil. Dafür wurden die gleichen Vektoren verwendet, welche auch für die Split-YFP Analysen von PclB benutzt wurden. Durch eine Ko-transformation der beiden Konstrukte in den Wildtypstamm GR5 wurde der Stamm SKC19 erzeugt. Die Transformation wurde durch das Ausbringen auf Selektionsmedium und durch Überprüfung der erhaltenen Kolonien mittels PCR kontrolliert. Die Kolonien, welche beide Konstrukte enthielten, wurden für weitere mikroskopische Untersuchungen verwendet. Es konnte erneut gezeigt werden, dass PipA mit PtkA interagiert. Überraschenderweise konnte eine Interaktion wieder nur in den Metulae und den Phialiden der Konidiophoren nachgewiesen werden. In den Hyphen konnte kein Fluoreszenzsignal festgestellt werden. Somit ist diese Interaktion, genauso wie die Interaktion zwischen PclB und PtkA, spezifisch für die spätere Phase der asexuellen Entwicklung (Abb. 23).



**Abbildung 23: Nachweis der Interaktion von PipA mit PtkA in den Konidiophoren mit Split-YFP.** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC19 (*alcA(p)::c-yfp::ptkA*, *alcA(p)::n-yfp::pipA*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium mit 2 % Glycerin gewachsen ist. Es ist nur eine Interaktion in den Konidiophoren nachweisbar. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im YFP-Kanal, DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).

Um die Interaktion und Lokalisierung auch unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen, wurden auch in diesem Fall mit Hilfe von Fusion-PCR (Szewczyk et al, 2006) Konstrukte hergestellt, durch welche PipA und PtkA jeweils C-terminal mit einem Teil von YFP markiert wurden. Die erzeugten Konstrukte bestehen aus der *yfp*-Sequenz, welche von Bereichen des *pipA*- oder *ptkA*-Gens, sowie von genomischen Sequenzen stromabwärts oder –aufwärts der jeweiligen Gene flankiert werden (Abb. 24 a und 24 c). Die erhaltenen Konstrukte wurden durch PCR hergestellt

und direkt in den *nkuA*-Deletionsstamm TN02A3 transformiert, wodurch der Stamm SKC29 hergestellt wurde. Die richtige Integration in den erhaltenen Transformanten wurde durch PCR nachgewiesen (Abb 24 b und 24 d). Des Weiteren wurden die Transformanten mikroskopisch untersucht, wobei die Lokalisierung der Interaktion erneut auf die Konidiophoren beschränkt war (Abb. 24 e).



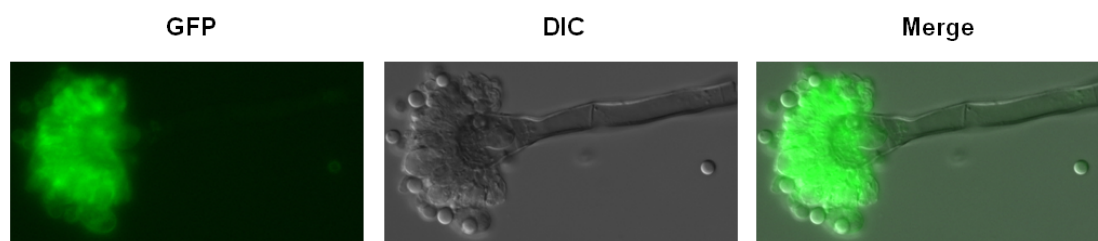
**Abbildung 24: Nachweis der Interaktion von PipA mit PtkA durch BiFC in den Konidiophoren unter der Kontrolle des natürlichen Promotors. (A)** Schematische Darstellung der Lokalisierung von *pipA* im Genom und des transformierten PCR Produkts von *pipA::nyfp::pyro*, sowie des Ortes der homologen Rekombination. Die Pfeile mit der Nummerierung P1, P6, P7 und P8 geben die Primer an, welche für die Überprüfung der homologen Rekombination verwendet wurden. **(B)** PCR zum Nachweis der homologen Integration. Als Marker wurde der 1 kb DNA Ladder (NewEngland Biolabs) verwendet. Der Primer P1 bindet in einer stromaufwärts von *pipA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. P7 bindet am Anfang von *pyro*. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P1 und P7 ist 1,8 kb groß. P8 bindet am Ende von *pyro*. Der Primer P6 bindet in einer stromabwärts von *pipA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P8 und P6 ist 1,4 kb groß. **(C)** Schematische Darstellung der Lokalisierung von *ptkA* im Genom und des transformierten PCR Produkts von *ptkA::c-yfp::pyrG*, sowie des Ortes der homologen Rekombination. Die Pfeile mit der Nummerierung P1, P6, P7 und P8 geben die Primer an, welche für die Überprüfung der homologen Rekombination verwendet wurden. **(D)** PCR zum Nachweis der homologen Integration. Als Marker wurde der 1 kb DNA Ladder (NewEngland Biolabs) verwendet. Der Primer P1 bindet in einer stromaufwärts von *ptkA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. P7 bindet am Ende von *c-yfp*. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P1 und P7 ist 1,6 kb groß. P8 bindet am Ende von *pyrG*. Der Primer P6 bindet in einer stromabwärts von *ptkA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P8 und P6 ist 1,9 kb groß. **(E)** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC29 (*ptkA(p)::c-yfp::ptkA*, *pipA(p)::n-yfp::pipA*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium mit Glukose gewachsen ist. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im YFP-Kanal, DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).

### 3.3 Lokalisierung der Interaktionspartner in *A. nidulans*

Nachdem die Interaktion von PtkA mit den beiden neuen Interaktionspartnern PclB und PipA durch die zwei unabhängigen Methoden Y2H und BiFC bestätigt wurden, sollte die Lokalisierung der Proteine überprüft werden. Durch das Split-YFP konnte gezeigt werden, dass die Interaktion nur in den während der asexuellen Entwicklung gebildeten Konidiophoren vorkommt. Nun sollte untersucht werden, ob sich die Expression ebenfalls auf die Konidiophoren beschränkt oder ob die Proteine auch in den Hyphen vorkommen. Dafür wurde PipA und PclB mit GFP getaggt. Dadurch sollte die subzelluläre Lokalisierung näher bestimmt werden.

#### 3.3.1 Lokalisierung von PclB

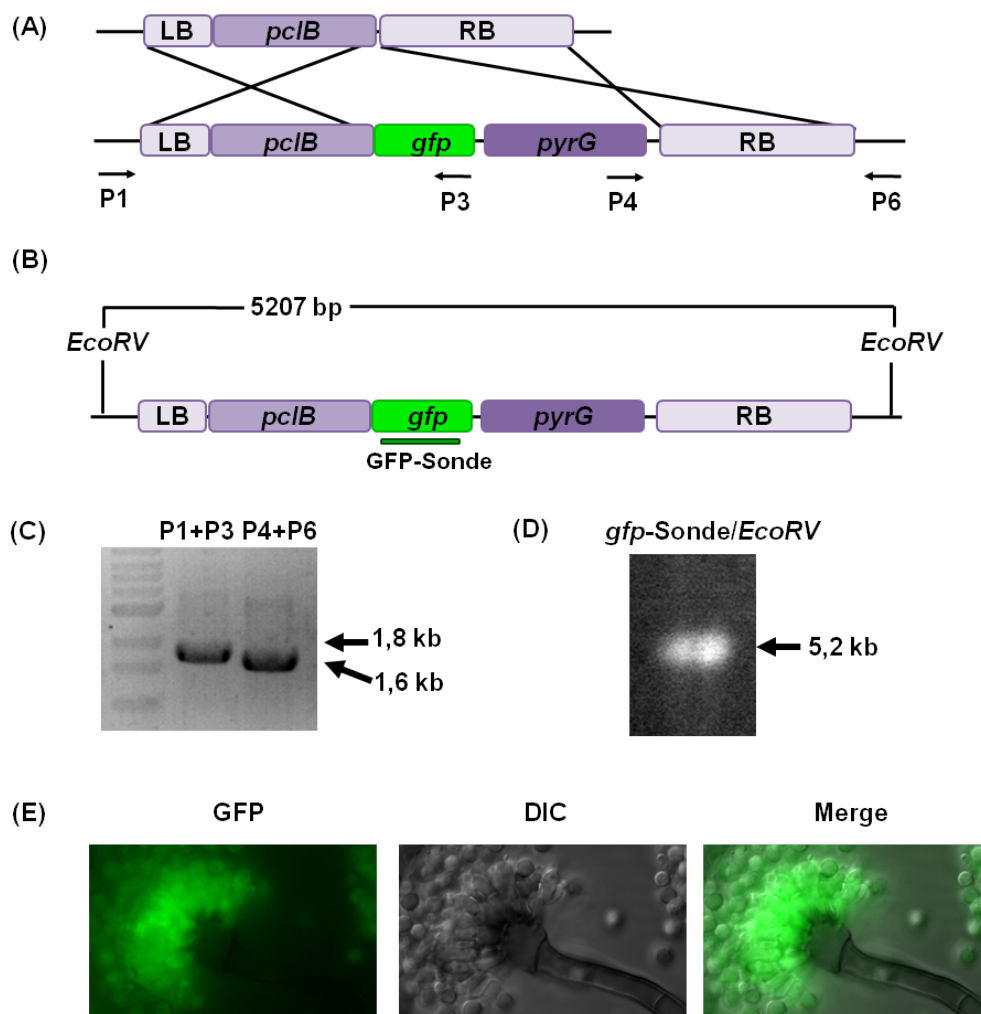
Es wurde ein *gfp-pclB* Konstrukt unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors hergestellt. Dafür wurde ein Vektor (pMCBapx) verwendet, welcher den Promotor der Alkoholdehydrogenase (*alcA*) enthält, sowie *gfp*. Das *pclB* Gen wurde mit den passenden Schnittstellen in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors kloniert, wodurch das Gen unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors steht und N-terminal mit *gfp* fusioniert wurde. Dieses Konstrukt wurde in den Wildtypstamm GR5 transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden durch PCR überprüft und im Anschluss mikroskopiert. Das mit GFP fusionierte PclB wurde in den Konidiophoren, vor allem in den Metulae und Phialiden, nachgewiesen (Abb. 25).



**Abbildung 25: Lokalisierung von PclB unter der Kontrolle des induzier-baren *alcA* Promotors.** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC18 (*alcA(p)::gfp::pclB*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium mit 2 % Glyzerin gewachsen ist. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal, DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).

Um die Lokalisierung auch unter der Kontrolle des natürlichen Promotors zu untersuchen, wurden mittels Fusion-PCR Konstrukte hergestellt. Dafür wurde eine *gfp-pyrG*-Kassette verwendet, welche von Bereichen des *pclB* Gens und von stromaufwärts und -abwärts gelegenen genomischen Sequenzen von *pclB* flankiert wurde (Abb. 26 a und 26 b). Der Stamm TN02A3 wurde mit dem hergestellten PCR-

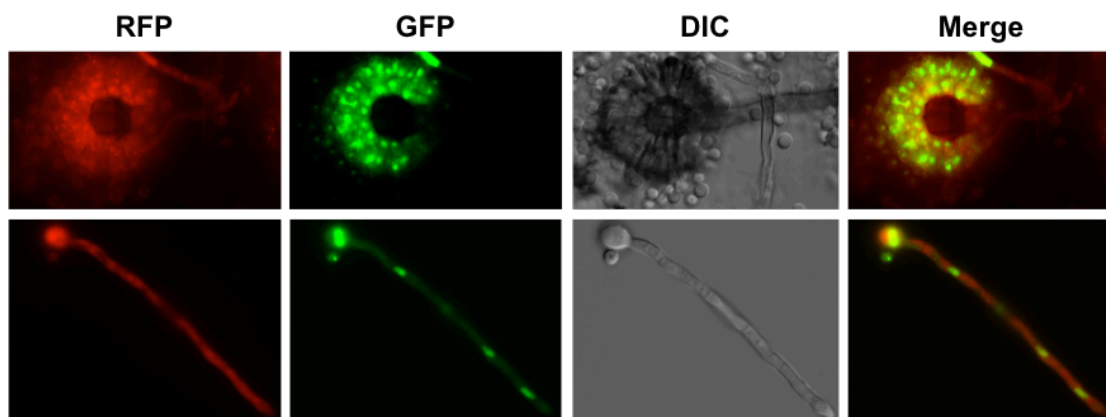
Produkt transformiert, wodurch der Stamm SKC28 erzeugt wurde. Durch homologe Rekombination des hergestellten Konstruktes, konnte ein Stamm mit einem C-terminal mit *gfp* getaggten *pciB*, unter der Kontrolle des natürlichen Promotors, hergestellt werden. Zum selektieren der Transformanten wurde Medium ohne Uracil und Uridin verwendet. Für die Transformation wurde ein Konstrukt verwendet, welches das *pyrG* Gen als Marker enthielt. Das *pyrG* Gen wird für die Pyrimidin-Biosynthese benötigt, wodurch die positiven Transformanten keine Auxotrophie mehr aufweisen sollten. Die homologe Integration des PCR-Produkts wurde durch PCR (Abb. 26 c) und einen Southern-Blot bestätigt (Abb. 26 d). Die erhaltenen Kolonien wurden weiterhin mikroskopisch untersucht (Abb. 26 e).



**Abbildung 26: Lokalisierung von PciB unter der Kontrolle des natürlichen Promotors.** (A) Schematische Darstellung der Lokalisierung von *pciB* im Genom und des transformierten PCR Produkts von *pciB::gfp::pyrG*, sowie des Ortes der homologen Rekombination. Die Pfeile mit der Nummerierung P1-P6 geben die Primer an, welche für die Überprüfung der homologen Rekombination verwendet wurden. (B) Schema des *pciB* Genorts nach homologer Integration des transformierten PCR-Konstrukts. Schnittstellen des verwendeten Enzyms *EcoRV* und Bindestelle der verwendeten *gfp*-Sonde zum Nachweis der Integration mit Hilfe eines Southern-Blots. (C) PCR zum Nachweis der homologen Integration. Als Marker wurde

der 1 kb DNA Ladder (NewEngland Biolabs) verwendet. Der Primer P1 bindet in einer stromaufwärts von *pipA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. P3 bindet am Anfang von *pyrG*. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P1 und P3 ist 1,8 kb groß. P4 bindet am Ende von *pyrG*. Der Primer P6 bindet in einer stromabwärts von *pipA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P4 und P6 ist 1,6 kb groß. **(D)** Southern-Blot zum Nachweis der homologen Integration. Für den Southern-Blot wurde genomische DNA des Transformanten mit *EcoRV* verdaut, über ein Gel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Zum Nachweis der richtigen Integration wurde eine mit DIG markierte *gfp*-Sonde verwendet. Durch den Erhalt einer Bande mit einer Größe von 5,2 kb wurde die richtige Integration des transformierten Konstrukts bestätigt. **(E)** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC28 (*pclB(p)::pclB::gfp*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium gewachsen ist. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal, DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).

Da nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob PclB nur im Zytoplasma oder auch in den Zellkernen vorkommt, wurde ein Stamm hergestellt, welcher neben dem mit mRFP markierten PclB, GFP markiertes PtkA besitzt (SKC27). Dafür wurde GR5 mit dem *alcA::mrp::pclB* Konstrukt und einem *alcA::gfp::ptkA* Plasmid transformiert. Dadurch standen beide Konstrukte unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors, wobei PclB N-terminal mit mRFP getaggt und PtkA N-terminal mit GFP getaggt wurde. Da PtkA im Zellkern der Hyphen und der Konidiophoren vorkommt, sollte mit Hilfe einer Kotransformation von PtkA und PclB in den gleichen Stamm nachgewiesen werden, ob PclB auch im Kern vorkommt. Der hergestellte Stamm wurde mit Hilfe von PCR und durch Mikroskopie von Konidiophoren und Hyphen untersucht (Abb. 27).



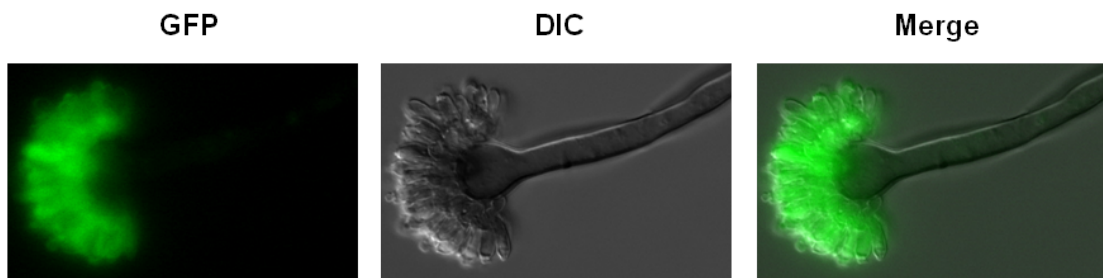
**Abbildung 27: Lokalisierung von PclB in den Konidiophoren und Hyphen.** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC27 (*alcA(p)::mrp::pclB; alcA(p)::gfp::ptkA*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium mit 2 % Glycerin gewachsen ist. Für die Mikroskopie von Hyphen, wurden Deckgläser mit flüssigem Minimalmedium mit 2 % Glycerin beschichtet und mit Sporen beimpft. Die Proben wurden etwa 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im mRFP-Kanal, im GFP-Kanal und im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen.

Es wurde gezeigt, dass PclB in den Hyphen und in den Konidiophoren vor allem im Zytoplasma vorkommt. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass PclB

auch im Zellkern vorliegt, da keine Aussparung der Zellkerne zu erkennen ist (Abb. 27).

### 3.3.2 Lokalisierung von PipA

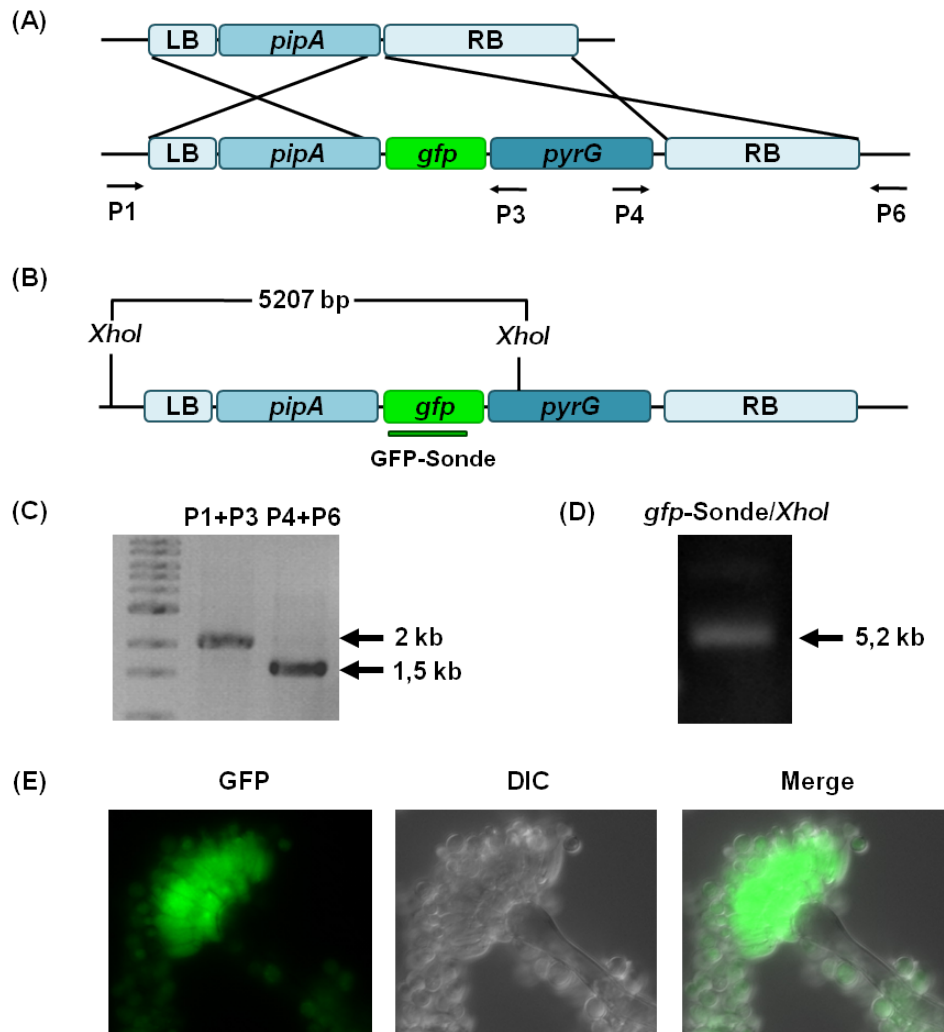
Zum Überprüfen der Lokalisierung von PipA wurde, wie schon für PclB beschrieben, ein *gfp-pipA* Konstrukt unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors hergestellt. Dieses Konstrukt wurde in den Wildtypstamm GR5 transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden durch PCR überprüft und im Anschluss mikroskopiert. Dadurch konnte die Lokalisierung von PipA in den Metulae und Phialiden der Konidiophoren gezeigt werden (Abb. 28).



**Abbildung 28: Lokalisierung von PipA in den Metulae und Phialiden der Konidiophoren.** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC17 (*alcA(p)::gfp::pipA*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium mit 2 % Glycerin gewachsen war. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal, DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).

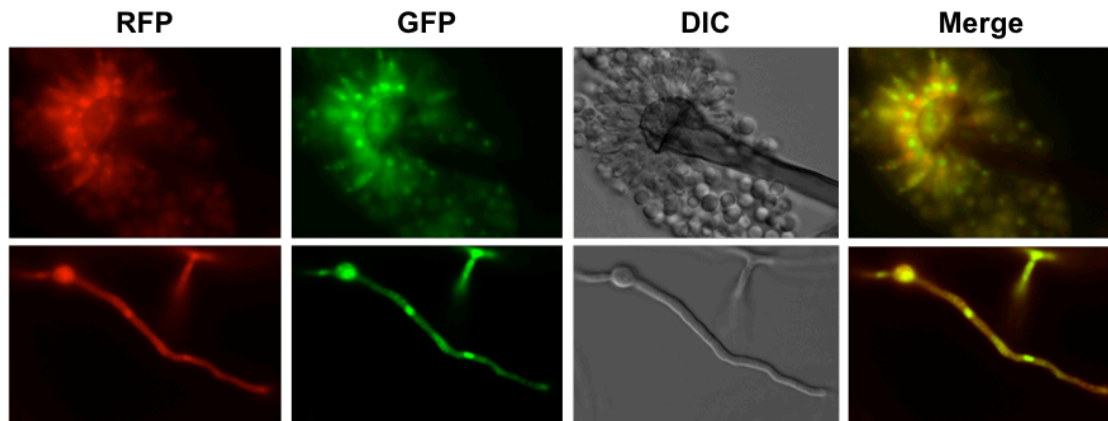
Wie zuvor mit PclB sollte die Lokalisierung von PipA auch unter der Kontrolle des natürlichen Promotors untersucht werden. Dafür wurde ebenfalls mit Hilfe von Fusion-PCR ein Konstrukt, bestehend aus der *gfp-pyrG*-Kassette, hergestellt, welches von stromaufwärts und -abwärts gelegenen genomischen Sequenzen von *pipA* umgeben war (Abb. 29 a und 29 b). Der Stamm TN02A3 wurde mit dem hergestellten PCR-Produkt transformiert um SKC27 zu erhalten. Durch homologe Rekombination des Konstruktes wurde ein Stamm hergestellt, welcher ein C-terminal mit *gfp* getaggt *pipA*, unter der Kontrolle des natürlichen Promotors, besitzt. Zum Selektieren der Transformanten wurde Medium ohne Uracil und Uridin verwendet, da die positiven Transformanten keine Auxotrophie mehr aufweisen sollten. Die homologe Integration des PCR-Produkts wurde durch PCR (Abb. 29 c) und einen Southern-Blot bestätigt. Die erhaltenen Kolonien wurden mikroskopisch untersucht (Abb. 29 d).





**Abbildung 29: Lokalisierung von PipA unter der Kontrolle des natürlichen Promotors.** (A) Schematische Darstellung der Lokalisierung von *pipA* im Genom und des transformierten PCR Produkts von *pipA::gfp::pyrG*, sowie des Ortes der homologen Rekombination. Die Pfeile mit der Nummerierung P1-P6 geben die Primer an, welche für die Überprüfung der homologen Rekombination verwendet wurden. (B) Schema des *pipA* Genorts nach homologer Rekombination des transformierten PCR-Konstrukts, sowie Angabe der Schnittstellen des verwendeten Enzyms (*XhoI*) und Bindestelle der verwendeten *gfp*-Sonde zum Nachweis der Integration. (C) PCR zum Nachweis der homologen Rekombination. Als Marker wurde der 1 kb DNA Ladder (NewEngland Biolabs) verwendet. Der Primer P1 bindet in einer stromaufwärts von *pipA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. P3 bindet am Anfang von *pyrG*. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P1 und P3 ist 2 kb groß. P4 bindet am Ende von *pyrG*. Der Primer P6 bindet in einer stromabwärts von *pipA* gelegenen Region des Genoms und außerhalb des transformierten Konstrukts. Das amplifizierte PCR-Produkt mit P4 und P6 ist 1,5 kb groß. (D) Southern-Blot zum Nachweis der homologen Integration. Für den Southern-Blot wurde genomische DNA des Transformanten mit *XhoI* verdaut, über ein Gel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Zum Nachweis der richtigen Integration wurde eine mit DIG markierte *gfp*-Sonde verwendet. Durch den Erhalt einer Bande mit einer Größe von 5,2 kb wurde die richtige Integration des transformierten Konstrukts bestätigt. (E) Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC27 (*pipA(p)::pipA::gfp*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium gewachsen war. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal, DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).

Da die Lokalisierung von PipA durch eine GFP-Fusion, nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurde ebenfalls ein Stamm hergestellt, welcher neben dem mit mRFP markierten PipA, GFP markiertes PtkA besitzt (SKC73). Dafür wurde der Stamm GR5 mit dem *alcA::mrfp::pipA* Konstrukt und einem *alcA::gfp::ptkA* Plasmid transformiert. Der hergestellte Stamm wurde mit Hilfe von PCR und durch Mikroskopie von Konidiophoren und Hyphen untersucht (Abb. 30).



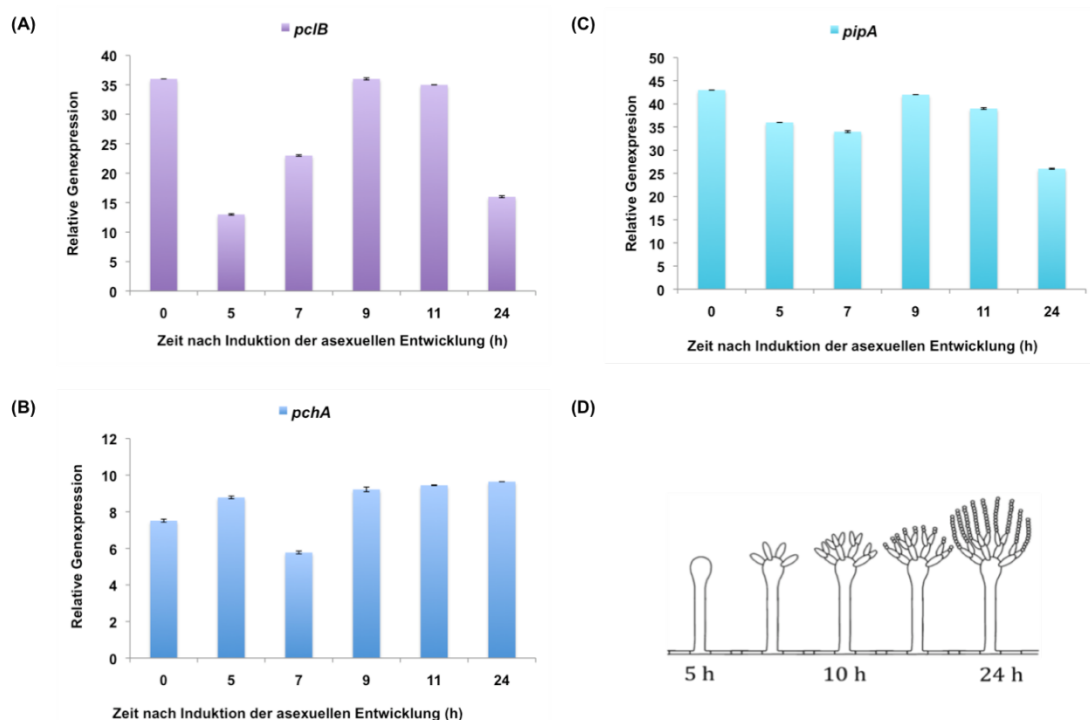
**Abbildung 30: Lokalisierung von PipA im Zytoplasma und in den Zellkernen der Hyphen und der Konidiophoren.** Mikroskopie von Konidiophoren des Stammes SKC73 (*alcA(p)::mrfp::pipA; alcA(p)::gfp::ptkA*), welcher zwei Tage bei 37 °C auf Minimalmedium mit 2 % Glycerin gewachsen war. Für die Mikroskopie von Hyphen, wurden Deckgläser mit flüssigem Minimalmedium mit 2 % Glycerin beschichtet und mit Sporen beimpft. Die Proben wurden etwa 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im mRFP-Kanal, im GFP-Kanal, im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen (Merge).

Es konnte gezeigt werden, dass PipA vor allem im Zytoplasma der Hyphen auftritt, aber das auch eine Lokalisierung in den Zellkernen zu erkennen ist. In den Konidiophoren kommt PipA ebenfalls vor allem im Zytoplasma vor, jedoch gibt es auch einzelne Überlagerungen des GFP-PtkA Signals in den Zellkernen mit dem mRFP Signal von PipA (Abb. 30).

#### 3.4 Transkriptionelle Regulation der Expression von *pipA* und den Zyklinen *pclB*, sowie *pchA*

Um die Expression von *pipA*, *pclB* und *pchA* während der Entwicklung zu untersuchen wurde eine quantitative Real-time PCR durchgeführt. Durch die mikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass PipA und PclB vor allem in den asexuellen Strukturen, den Konidiophoren, auftreten, aber auch in den Hyphen. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Dafür

wurde RNA aus den verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. nidulans* isoliert (Abb. 31 d). Es wurde eine Flüssigkultur mit dem Wildtypstamm FGSCA4 angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. In einer Flüssigkultur wird die Ausbildung der Konidiophoren unterdrückt und es werden nur die vegetativ wachsenden Hyphen gebildet. Die Isolierung von RNA direkt aus den in Flüssigkultur gewachsenen Hyphen, entspricht dem Zeitpunkt 0 h, da die asexuelle Entwicklung noch nicht begonnen hat. Der Rest des gewachsenen Myzels wurde auf mit Zellophan überschichtete Agarplatten übertragen. Da das Myzel nun nicht mehr in einer Flüssigkeit ist, sondern Kontakt zur Luft hat, wird die asexuelle Entwicklung induziert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde RNA aus dem auf Agarplatten gewachsenen Kolonien isoliert, um die verschiedenen Entwicklungszeitpunkte zu erfassen. Nach etwa 5 h Wachstum entsteht der Stiel mit dem Vesikel, nach 7 h wachsen die ersten Metulae, nach 10 h werden Phialiden gebildet, danach die Sporen und nach etwa 16 h ist die Konidiophorenbildung abgeschlossen. Die isolierte RNA wurde direkt für die quantitative Real-time PCR verwendet (Abb. 31 a-c). Es wurden jeweils zwei biologische Replikate eingesetzt und als Haushaltsgen wurde *benA* verwendet, welches für  $\beta$ -Tubulin codiert.



**Abbildung 31: Analyse der Expression von *pcIB* und *pipA* während der asexuellen Entwicklung.** (A) *PcIB* wird schon während des vegetativen Wachstums exprimiert. Zu Beginn der asexuellen Entwicklung ist die Expression sehr schwach, steigt dann bis zum Zeitpunkt 9 h nach Induktion der asexuellen Entwicklung an und fällt dann wieder ab. (B) Die Expression von *pchA* bleibt während der gesamten Entwicklung relativ konstant. Nur zum Zeitpunkt 7 h nach Induktion der asexuellen Entwicklung ist eine Verminderung der Expres-

sion zu erkennen. **(C)** Die Expression von *pipA* bleibt ebenfalls relativ konstant während der Entwicklung mit nur geringen Schwankungen. Das Expressionsmuster ist ähnlich zu dem von *pclB*, jedoch verändern sich die Intensitäten nicht so extrem. Es wurden zwei biologische Replikate für die qRT-PCR verwendet. Als Haushaltsgen wurde *benA* benutzt. Mit Hilfe der erhaltenen Werte wurde der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet, die Standardabweichung und damit der Fehler. **(D)** Darstellung der asexuellen Entwicklung von *A. nidulans*. Während der asexuellen Entwicklung wird zuerst ein Stiel mit Vesikel (5 h) gebildet, danach die Metulae und die Phialiden (10 h). Im Anschluss entstehen die Sporen. Nach etwa 16 h Wachstum ist die asexuelle Entwicklung abgeschlossen.

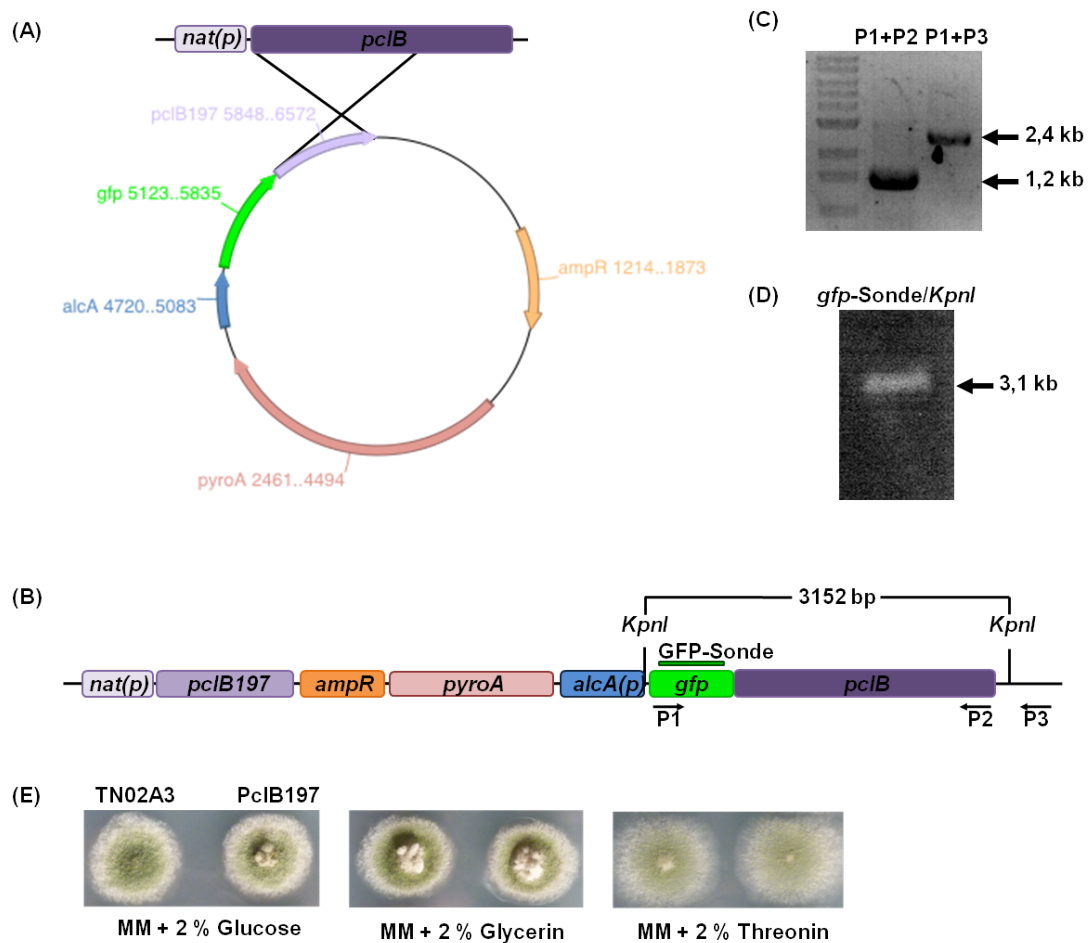
Durch die qRT-PCR wurde gezeigt, dass sich vor allem die *pclB* Expression, während der asexuellen Entwicklung verändert. Das Expressionsmuster ist zwar bei *pclB* und *pipA* in etwa gleich, aber die Intensitäten unterscheiden sich stark. Beide Transkripte werden schon während des vegetativen Wachstums gebildet. Zu Beginn der asexuellen Entwicklung und der Entstehung des Stiels mit Vesikel nimmt die Expression von *pclB* wieder ab, steigt in der weiteren Entwicklung aber erneut an und erreicht ein Plateau nach 9 h, dem Zeitpunkt der Metulae und Phialiden Entstehung. Danach sinkt die Expression wieder ab, wobei nach 24 h Wachstum etwa das Expressionslevel, wie nach 5 h asexueller Entwicklung erreicht ist. Diese Ergebnisse bestätigen die mikroskopischen Untersuchungen, wonach PipA und PclB schon in der Hyphe nachzuweisen sind, aber vor allem in den Metulae und Phialiden vorkommen. Die Expression von *pchA* bleibt dagegen während der gesamten Entwicklung relativ konstant. Nur zum Zeitpunkt 7 h nach Induktion der asexuellen Entwicklung ist eine leichte Abnahme der Expression zu erkennen.

### 3.5 Überexpression von PipA hemmt die asexuelle Sporenbildung

Um herauszufinden, welche Funktion PipA und PclB in *A. nidulans* einnehmen, wurde die Expression verändert. Es wurden verkürzte Konstrukte hergestellt (Abb. 32 a und 33 a), welche nicht mehr ihre eigentliche Funktion erfüllen können. Diese verkürzten und inaktiven Konstrukte wurden in ein Plasmid mit induzierbarem *alcA*-Promotor kloniert. Die hergestellten Plasmide wurden in den Stamm TN02A3 transformiert. Durch homologe Rekombination der verkürzten Konstrukte ins Genom, gelangen die verkürzten Varianten der Gene unter die Kontrolle des jeweiligen natürlichen Promotors. Gleichzeitig gelangt das vollständige Gene unter die Kontrolle des *alcA*-Promotors (Abb. 32 b und 33 b). Die homologe Integration wurde durch PCR oder Southern-Blot bestätigt (Abb. 32 c und 33 d). Durch Verwendung von Glukose im Medium wird der *alcA*-Promotor reprimiert, durch Glycerin dereprimiert und durch Threonin induziert. Somit wird durch Verwendung von Glukose verhindert, dass das

vollständige Gen abgelesen wird, wodurch nur das verkürzte Gen unter der Kontrolle des natürlichen Promotors berücksichtigt wird. Da das verkürzte Gen nicht mehr funktionsfähig ist, kann untersucht werden, ob es eine Funktion in der Entwicklung einnimmt. Mit Glycerin im Medium wird der *alcA*-Promotor reprimiert, wodurch das ganze Gen unter nahezu natürlichen Bedingungen abgelesen werden kann. Unter diesen Bedingungen ist kein Effekt auf das Wachstum der Kolonie zu erwarten. Durch Threonin wird der Promotor induziert, was zu einer Überexpression des Gens führt und somit auch einen Effekt auf das Wachstum haben kann (Abb. 32 e und 33 d).

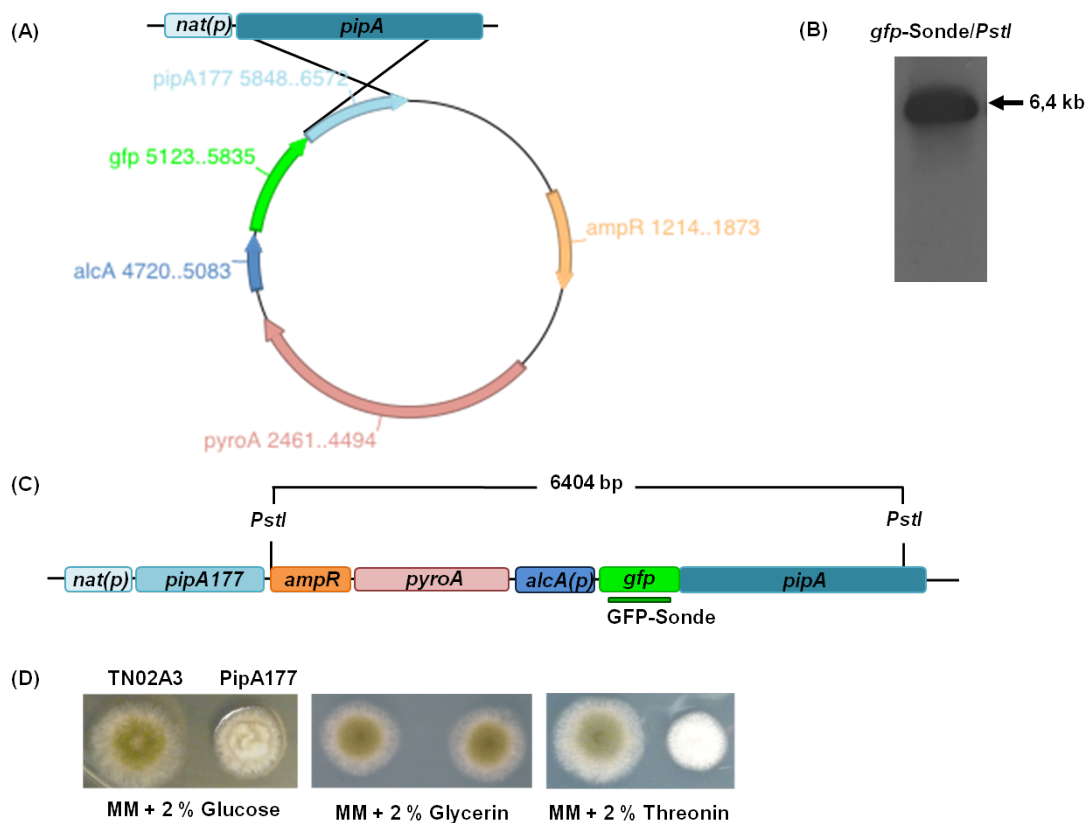
Zuerst wurde die Auswirkung der veränderten Expression von *pcIB* getestet (Abb. 32). PclB hat eine Größe von 241 Aminosäuren und wurde für diesen Versuch auf 197 Aminosäuren verkürzt (Abb. 32 a). Durch die Transformation des hergestellten Plasmids und dessen homologer Integration in das Genom, wurde der Stamm SKC15 erzeugt (Abb. 32 b). Die Integration an den richtigen Genort wurde durch PCR (Abb. 32 c) und durch einen Southern-Blot mit einer DIG-markierten Sonde gegen *gfp* bestätigt (Abb. 32 d). Der hergestellte Stamm wurde zusammen mit dem Wildtyp-Stamm auf Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen überimpft (Abb. 32 e). Es wurde kein Unterschied im Wachstum festgestellt. Der Stamm mit dem verkürzten *pcIB* hatte den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp, unabhängig davon, ob die Expression durch Glukose reprimiert oder durch Threonin induziert wurde.



**Abbildung 32: Auswirkungen veränderter Expression von *pclB* auf den Phänotyp von *A. nidulans*.** (A) Verwendeter Vektor und Ort der homologen Rekombination. Herstellung einer verkürzten Variante von PclB, welche nur 197 Aminosäuren groß ist, anstatt 241 Aminosäuren. Das verkürzte Gen wurde in einen Vektor ligiert, welcher den induzierbaren *alcA*-Promotor besitzt. Durch Transformation in einen Wildtyp-Stamm findet homologe Rekombination zwischen der im Vektor enthaltenen verkürzten Sequenz und der im Genom vorhandenen Sequenz statt. (B) Integration des Plasmids ins Genom. Durch homologe Integration wird das verkürzte *pclB* hinter dem natürlichen Promotor integriert, wodurch das ganze Gen unter die Kontrolle des *alcA*-Promoters gelangt. (C) Nachweis der homologen Integration durch PCR. Durch eine PCR mit Primern, welche in *gfp* und im vollständigen *pclB* binden, entsteht eine Bande von 1,2 kb. Verwendet man Primer, welche in *gfp* und in der stromabwärts von *pclB* gelegenen Region binden, entsteht nach homologer Integration eine Bande von 2,4 kb. (D) Nachweis der homologen Rekombination durch Southern-Blot. Für den Southern-Blot wurde genomische DNA mit *KpnI* verdaut, was nach dem *alcA*-Promotor und in der stromaufwärts gelegenen Region von *pclB* schneidet. Zum Nachweis wurde eine DIG-markierte Sonde gegen *gfp* verwendet, wodurch die homologe Integration durch eine Bande von 3,2 kb nachgewiesen wurde. (E) Wachstum der Transformanten auf Medium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle und somit auch von der Expressionsintensität, ist kein Unterschied im Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen einer veränderten Expression von PipA getestet (Abb. 33). PipA hat eine Größe von 285 Aminosäuren und wurde für diesen Versuch auf 177 Aminosäuren verkürzt (Abb. 33 a). Durch die Transformation des hergestellten Plasmids und dessen homologer Integration in das Genom wurde der

Stamm SKC13 erzeugt. Die Integration an den richtigen Genort wurde durch einen Southern-Blot mit einer DIG-markierten Sonde gegen *gfp* bestätigt (Abb. 33 c). Der hergestellte Stamm wurde zusammen mit dem Wildtyp-Stamm auf Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen überimpft (Abb. 33 d). Der Stamm mit dem verkürzten *pipA* zeigt eine verringerte Sporenbildung, im Vergleich zum Wildtyp bei Wachstum auf glukosehaltigem Medium. Die Überexpression von *pipA*, bei Wachstum auf Threonin, verursacht eine Hemmung der Sporenbildung und Förderung der Hyphenproduktion.

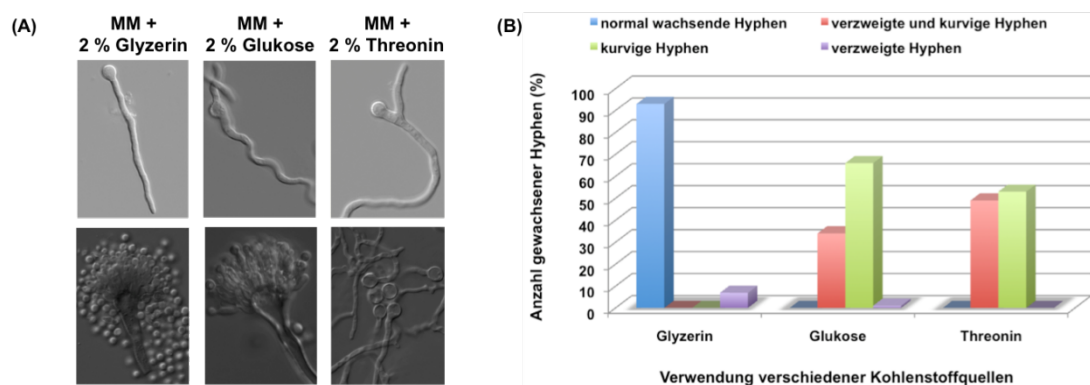


**Abbildung 33: Auswirkungen veränderter Expression von *pipA* auf den Phänotyp von *A. nidulans*.** (A) Verwendeter Vektor und Ort der homologen Rekombination. Herstellung einer verkürzten Variante von PipA, welche nur 177 Aminosäuren groß ist, anstatt 285 Aminosäuren. Das verkürzte Gen wurde in einen Vektor ligiert, welcher den induzierbaren *alcA*-Promotor besitzt. Durch Transformation in einen Wildtyp-Stamm findet homologe Rekombination zwischen der im Vektor enthaltenen verkürzten Sequenz und der im Genom vorhandenen Sequenz statt. (B) Integration des Plasmids ins Genom. Durch homologe Integration wird das verkürzte *pipA* hinter dem natürlichen Promotor integriert, wodurch das ganze Gen unter die Kontrolle des *alcA*-Promoters gerät. (C) Nachweis der homologen Rekombination durch Southern-Blot. Für den Southern-Blot wurde genomische DNA mit *PstI* verdaut, welches vor der Ampicillin-Cassette und am Ende von *pipA* schneidet. Zum Nachweis wurde eine DIG-markierte Sonde gegen *gfp* verwendet und die erhaltene Bande nach homologer Integration hat eine Größe von etwa 6,4 kb. (D) Wachstum der Transformanten auf Medium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Durch die Reprimierung der *pipA*-Expression auf Glukose-Medium wird die Sporenbildung vermindert und durch Überexpression auf Threonin wird die Bildung von Luftmycel gefördert.

Da die Veränderung der *pipA* Expression einen Phänotyp verursachte, wurde die Ausbildung von Konidiophoren und das Hyphenwachstum unter verschiedenen Wachstumsbedingungen getestet (Abb. 34).

Durch Wachstum auf Medium mit Glukose und somit durch die Reprimierung der *pipA* Expression wurden weiterhin Konidiophoren gebildet, jedoch war die Sporenproduktion vermindert. Durch Wachstum auf threoninhaltigem Medium wurde *pipA* überexprimiert. Dadurch wurde die Bildung von Konidiophoren und somit die asexuelle Entwicklung verhindert. Es wurden nur noch vegetativ wachsende Hyphen gebildet. Die Konidiophoren-Bildung auf Glycerin Medium entsprach dem Wildtyp (Abb. 34 a).

Durch Wachstum der Hyphen in Glukose und Threonin Medium veränderte sich der Phänotyp. Durch Glukose wuchs der Großteil der Hyphen kurvig (66 %) oder zeigte zusätzlich zum kurvigen Wachstum eine erhöhte Anzahl an Verzweigungen (34 %). Threonin verursachte einen ähnlichen Phänotyp, wobei das Verhältnis zwischen nur kurvig wachsenden Hyphen (53 %) und kurvigen Hyphen mit erhöhter Anzahl an Verzweigungen (49 %) relativ ausgeglichen ist. In Glycerin Medium wuchsen die meisten Hyphen gerade (93 %) und nur ein geringer Anteil zeigte Verzweigungen (7 %) beim Wachstum (Abb. 34 b).

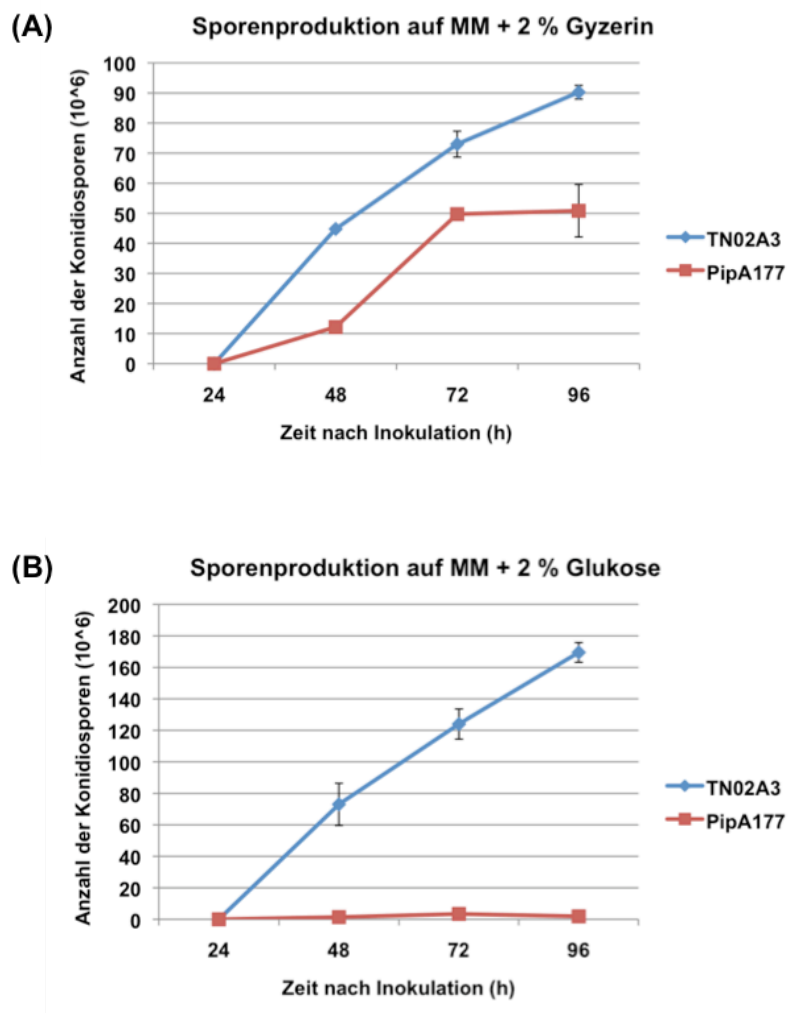


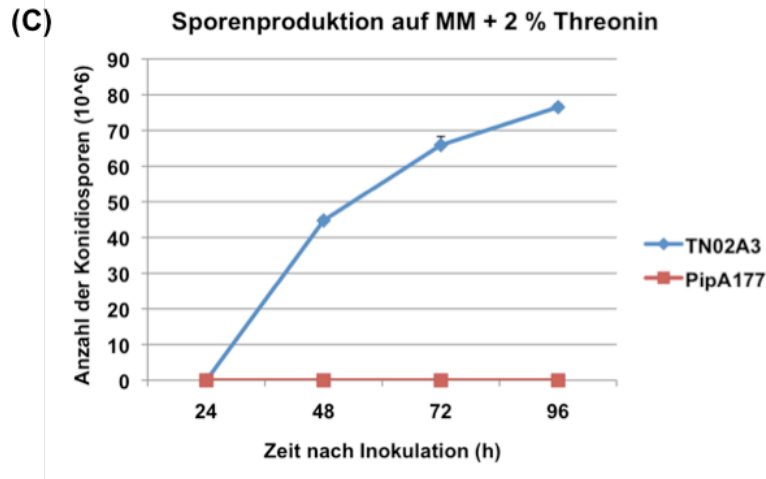
**Abbildung 34: Auswirkungen veränderter Expression von *pipA* auf den Phänotyp.** (A) Mikroskopische Untersuchung des Konidiophoren und Hyphen Wachstums. Mit Glycerin im Medium werden dem Wildtyp entsprechende Konidiophoren gebildet und die Hyphen zeigen einen normalen Wachstumsphänotyp. Durch Wachstum auf Glukose werden Konidiophoren mit weniger Sporen gebildet und die Hyphen wachsen kurviger. Durch Threonin werden keine Konidiophoren ausgebildet und die Hyphen bilden Kurven, sowie vermehrt Verzweigungen. (B) Quantifizierung phänotypischer Effekte durch veränderte *pipA* Expression. In Glycerin-Medium zeigen die meisten Hyphen ein normales Wachstum wie im Wildtyp. Durch Wachstum in Medium mit Glukose wachsen die meisten Hyphen kurvig und die übrigen Hyphen zeigen zusätzlich eine verstärkte Ausbildung von Verzweigungen. Durch Threonin zeigen etwa gleich viele Hyphen ein kurvig Wachstum als auch gleichzeitig kurvig und verzweigtes Wachstum.

Es ist bereits durch eine Beobachtung der Kolonien mit veränderter *pipA*-Expression zu erkennen, dass *pipA* für die asexuelle Entwicklung benötigt wird. Durch mikro-



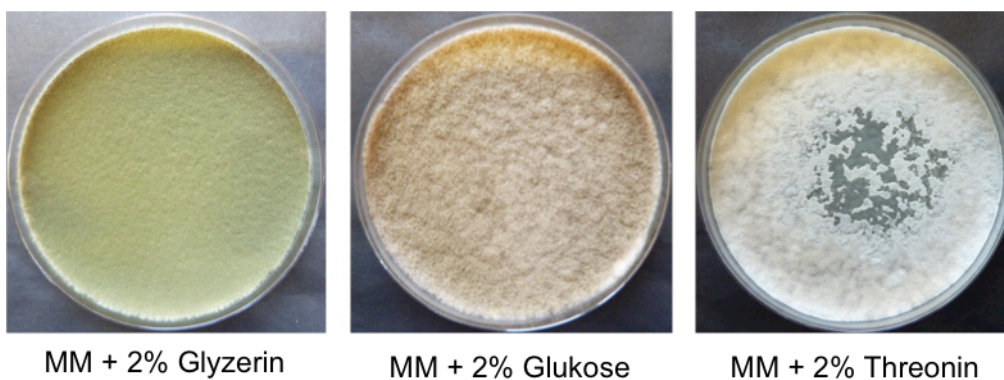
skopische Untersuchungen konnte dies weiter bestätigt werden, da eine verminderte Sporenproduktion durch Reprimierung der *pipA* Expression zu erkennen ist und die Überexpression von *pipA* zu einem Verlust der Ausbildung von Konidiophoren führt. Um die Sporenproduktion weiter zu untersuchen, wurden Sporensuspensionen des Stammes mit dem inaktivem *pipA* unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors hergestellt. Es wurden jeweils  $1 \cdot 10^6$  Sporen auf Medium mit Glycerin, Glukose oder Threonin ausplattiert. Nach 48, 72 und 96 Stunden Wachstum bei 37 °C wurde die Anzahl der gebildeten Sporen bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass durch die Reprimierung von *pipA* (Abb. 35 b) die Produktion von Sporen, im Vergleich zu dem auf Glycerin (Abb. 35 a) gewachsenen Stamm (dereprimierende Bedingungen), fast vollständig eingestellt wurde. Durch die Überexpression von *pipA* wurde die Produktion von Sporen vollständig eingestellt (Abb. 35 c).





**Abbildung 35: Auswirkung der veränderten Expression von *pipA* auf die Sporenproduktion.** Bestimmung der Sporenproduktion während der Entwicklung von dem Wildtyp TN02A3 (blau) und von PipA177 (rot). **(A)** Auf Glycerin-Medium (dereprimierende Bedingungen) bildet der Stamm PipA177 fast genauso viele Sporen wie der Wildtyp TN02A3. **(B)** Auf Glukose-Medium (reprimierend Bedingungen) bildet der Stamm PipA177 fast keine Sporen, im Vergleich zum Wildtyp TN02A3. **(C)** Auf Threonin-Medium (induzierende Bedingungen) bildet der Stamm PipA177 keine Sporen mehr, im Gegensatz zum Wildtyp TN02A3.

Neben der Einstellung der Sporenbildung durch die Überexpression von *pipA* wurde weiterhin festgestellt, dass eine Autolyse der Hyphen stattfindet. Es konnte festgestellt werden, dass mit zunehmendem Alter der Kolonien, eine Auflösung des gebildeten Myzels stattfindet (Abb. 36). Vor allem in der Mitte ist zu erkennen, dass sich das Myzel aufgelöst hat, währenddessen am Rand noch Myzel zu erkennen ist.



**Abbildung 36: Veränderter Phänotyp durch Änderung der Expression von *pipA*, sowie Autolyse der Hyphen durch Überexpression.** Wachstum auf Glycerin-Medium (links) ermöglicht die Ausbildung von Sporen. Wachstum auf Glukose-Medium (Mitte) verringert die Sporenbildung erheblich. Wachstum auf Threonin-Medium (rechts) verursacht eine Einstellung der Sporenproduktion. Es wird nur Luftmyzel gebildet. Des Weiteren verursacht die Überexpression von *pipA* eine Autolyse des gebildeten Myzels

### 3.6 Deletion verschiedener Interaktionspartner

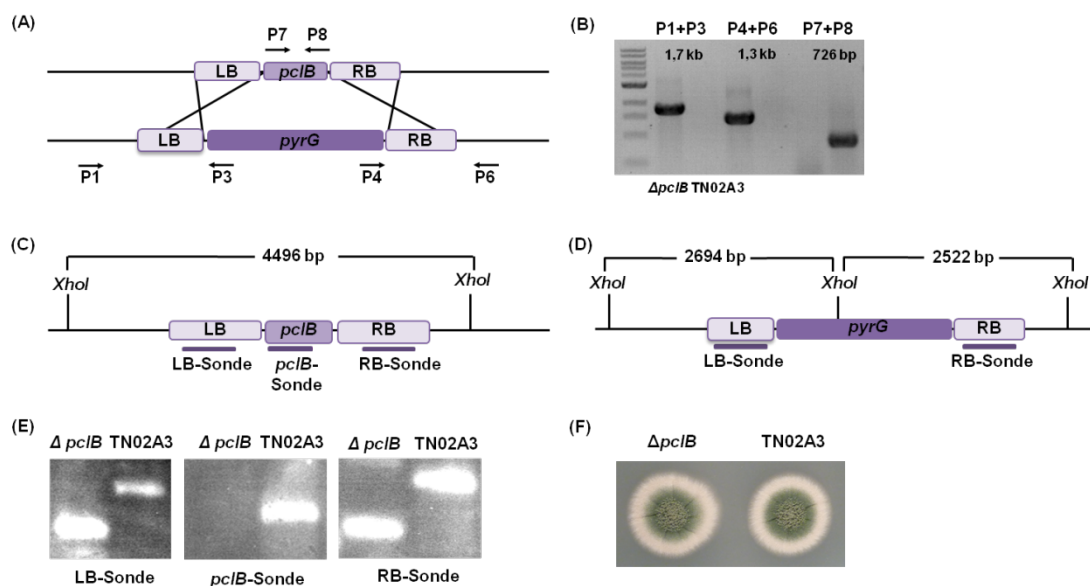
Durch die Herstellung von Stämmen mit verkürzten *pciB* und *pipA* Konstrukten, mit gleichzeitiger Kontrolle der Expression der vollständigen Gene durch den *alcA*-Promotor, konnte bereits untersucht werden, ob eine veränderte Genexpression zu einer Phänotypänderung führt.

Um die Funktion der Gene herauszufinden bzw. zu untersuchen, ob die Gene für das Wachstum essentiell sind wurden Deletionsstämme hergestellt. Es wurden sowohl die Gene *pciB* und *pipA*, welche als Interaktionspartner von PtkA im Y2H-Screen identifiziert wurden, als auch *pchA*, welches durch einen gerichteten Y2H-Versuch gefunden wurde, deletiert.

#### 3.6.1 Deletion von *pciB* hat keine Auswirkung auf das Wachstum

Für die Deletion von *pciB* wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem der Auxotrophie-marker *pyrG* (Oakley et al, 1987) durch etwa 1 kb der stromabwärts- und -aufwärts von *pciB* gelegenen Region flankiert wird. *PyrG* codiert für die Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase und wird somit für die Pyrimidinbiosynthese benötigt. Das verwendete Konstrukt wurde in den Wildtypstamm TN02A3 transformiert, welcher unter anderem eine *pyrG* Auxotrophie besitzt. Durch Transformation mit dem Deletionskonstrukt verlieren die positiven Transformanten die *pyrG* Auxotrophie, wodurch diese in der Lage sind auf Medium ohne Uracil und Uridin zu wachsen. Durch die verwendeten stromabwärts- und aufwärts gelegenen Sequenzen, welche *pyrG* flankieren, wird eine homologe Rekombination ermöglicht. Dadurch wurde das *pciB* Gen durch *pyrG* ersetzt und somit ein für *pciB* deletierter Stamm (SKC34) hergestellt (Abb. 37 a). Zur Überprüfung der richtigen Integration wurde von den Transformanten und vom Wildtyp genomische DNA hergestellt. Zuerst wurde mit den Primer P7 und P8 eine PCR auf den ORF durchgeführt, wodurch gezeigt werden konnte, dass das *pciB* Gen, mit einer Größe von 726 bp, nicht mehr vorhanden ist (Abb. 37 b). Im Anschluss wurden Primer verwendet, welche in *pyrG* und in der stromabwärts oder –aufwärts gelegenen Region, außerhalb des transformierten Konstrukts, binden. Für den Nachweis der richtigen Integration stromaufwärts (LB) von *pciB*, wurden der Primer P1 und P3 verwendet. Das erhaltene PCR-Produkt hatte eine Größe von 1,7 kb und bestätigte die homologe Rekombination. Zum Nachweis der Integration im stromabwärts (RB) gelegenen Bereich wurden die Primer P4 und P6 benutzt. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 1,3 kb (Abb. 37 b). Um die Deletion weiter zu

bestätigen wurde ein Southern-Blot durchgeführt (Abb. 37 c-e). Dafür wurde die genomische DNA über Nacht mit *Xho*I verdaut, am nächsten Tag auf ein Agarosegel aufgetragen und im Anschluss auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Zum Nachweis der homologen Integration wurden eine mit DIG markierte LB- und eine RB-Sonde, sowie eine Sonde gegen den *pcIB* ORF verwendet. Unter Verwendung der LB-Sonde entstand beim TN02A3 eine Bande mit einer Größe von 4,5 kb und beim Deletionsstamm von 2,7 kb. Durch die RB-Sonde konnte eine Bande von 4,5 kb beim Wildtyp und eine Bande von 2,5 kb bei der Deletion, die homologe Integration des Deletionskonstruktes bestätigen. Durch die *pcIB*-Sonde entstand eine Bande von 4,5 kb beim Wildtyp und keine Bande bei der Deletion, wodurch nachgewiesen wurde, dass *pcIB* nicht mehr vorhanden war (Abb. 37 e). Der erhaltene Deletionsstamm besaß keinen Phänotyp und sah somit aus wie der für die Transformation verwendete Wildtyp TN02A3 (Abb. 37 f).



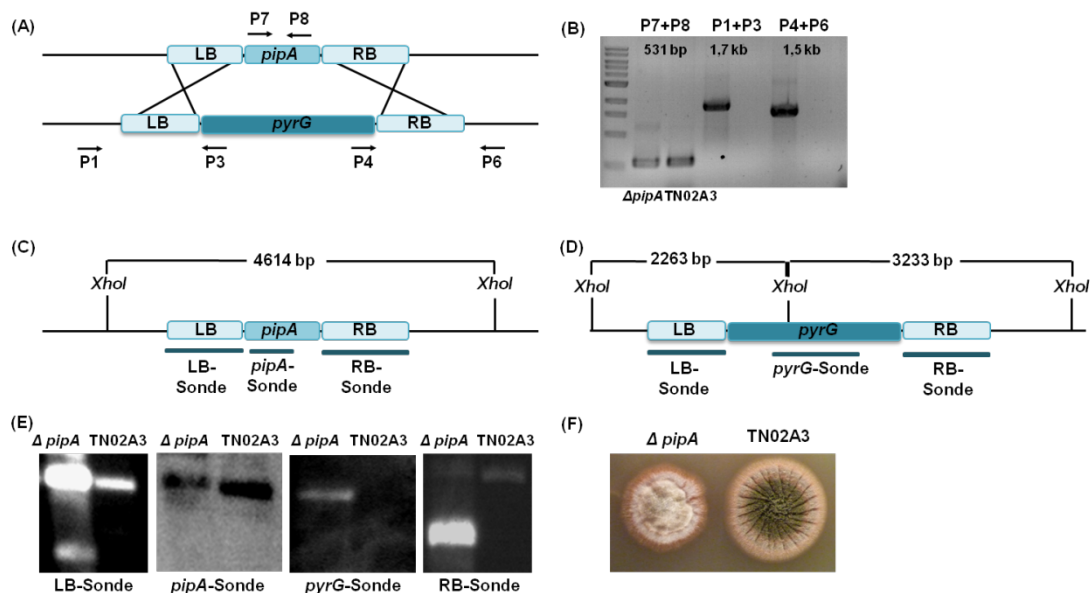
**Abbildung 37: Deletion von *pcIB* hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum und verursachte keinen Phänotyp.** (A) Deletionskonstrukt und Ort der homologen Rekombination. Das Deletionskonstrukt ersetzt durch homologe Rekombination der stromabwärts und –aufwärts gelegenen Region das *pcIB* Gen. Die dargestellten Pfeile mit P1, P3, P4 und P6-P8 zeigen die Bindestellen der verwendeten Primer, um die Deletion nachzuweisen. (B) PCR zum Nachweis der Deletion. Mit Hilfe der Primer P1 und P3 (1,7 kb) wurde die Integration stromaufwärts von *pcIB* bestätigt, mit P4 und P6 (1,3 kb) stromabwärts und mit P7 und P8 (726 bp) wurde das Fehlen des ORF bestätigt. (C) Schema zum Nachweis von *pcIB* durch einen Southern-Blot. Durch Verdau genomischer DNA des Wildtyps mit *Xho*I und unter Verwendung einer LB-, RB- und ORF-Sonde konnte *pcIB* (4,5 kb) im Southern-Blot nachgewiesen werden. (D) Schema zum Nachweis der Deletion von *pcIB* durch einen Southern-Blot. Durch Verdau genomischer DNA des Wildtyps mit *Xho*I entsteht eine Bande von etwa 2,7 kb unter Verwendung einer LB-Sonde. Durch Verwendung einer RB-Sonde entsteht eine Bande mit einer Größe von 2,5 kb. (E) Southern-Blot. Mit Hilfe der LB- und der RB-Sonde konnte nachgewiesen werden, dass das verwendete Deletionskonstrukt an der richtigen Stelle integriert worden ist. Durch die *pcIB*-Sonde konnte nachgewiesen werden, dass *pcIB* nicht mehr in der Deletionsmutante vorhanden ist, im Gegensatz zum Wildtyp. (F) Vergleich des Wild-

typs mit der Deletionsmutante. Die Deletion von *pclB* verursacht keine Veränderung im Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp.

### 3.6.2 Deletion von *pipA* könnte letal sein

Um die Funktion von *pipA* in *A. nidulans* näher zu untersuchen wurde ein Deletionsstamm hergestellt. Für die Deletion von *pipA* wurde, wie auch schon für die Deletion von *pclB*, ein Konstrukt hergestellt, bei dem der Auxotrophiemarker *pyrG* (Oakley et al, 1987) durch etwa 1 kb der stromabwärts- und -aufwärts von *pipA* gelegenen Region flankiert wurde. Das verwendete Konstrukt wurde in den Wildtypstamm TN02A3 transformiert, welcher unter anderem eine *pyrG* Auxotrophie besitzt. Durch Transformation mit dem Deletionskonstrukt konnte auf positive Transformanten selektiert werden, in dem Medium ohne Uracil und Uridin verwendet wurde. Durch die verwendeten stromabwärts- und aufwärts gelegenen Sequenzen, welche *pyrG* flankieren, wird eine homologe Rekombination ermöglicht. Dadurch sollte das *pipA* Gen durch *pyrG* ersetzt werden, um einen *pipA*-Deletionsstamm (SKC49) herzustellen (Abb. 38 a). Zur Überprüfung der richtigen Integration wurde von den Transformanten und vom Wildtyp genomische DNA hergestellt. Zuerst wurden Primer verwendet, welche in *pyrG* und in der stromabwärts oder –aufwärts gelegenen Region, außerhalb des transformierten Konstrukts, binden (Abb. 38 a). Für den Nachweis der richtigen Integration stromaufwärts (LB) von *pipA*, wurden der Primer P1 und P3 verwendet. Das erhaltene PCR-Produkt hatte eine Größe von 1,7 kb und bestätigte die homologe Rekombination. Zum Nachweis der Integration im stromabwärts (RB) gelegenen Bereich wurden die Primer P4 und P6 benutzt. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 1,3 kb (Abb. 38 b). Danach wurde mit den Primer P7 und P8 eine PCR auf den ORF durchgeführt (Abb. 38 b). Durch diese PCR konnte festgestellt werden, dass der ORF von *pipA* weiterhin vorhanden war, obwohl gleichzeitig eine richtige Integration des Deletionskonstruktes gezeigt werden konnte. Aufgrund des weiterhin vorhandenen ORF und der gleichzeitigen Integration des Deletionskonstruktes kann darauf geschlossen werden, dass durch die Deletion von *pipA* ein diploider Stamm oder ein Heterokayon ausgebildet wurde. Bei der Ausbildung eines Heterokaryons entsteht ein Pilz, welcher zwei Kerne besitzt, wobei ein Kern das Deletionskonstrukt enthält und der andere Kern das Wildtyp-Gen. Oder es entsteht ein diploider Pilz, der einen doppelten Chromosomensatz besitzt und somit das Deletionskonstrukt und den ORF von *pipA*. Aufgrund diesen Zustandes wurde weiterhin ein Southern-Blot durchgeführt (Abb. 38 c-e). Dafür wurde die genomische DNA über Nacht mit *XhoI* verdaut, am nächsten Tag auf ein Agarosegel aufgetragen und im Anschluss

auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Zum Nachweis der homologen Integration wurden eine mit DIG markierte LB- und eine RB-Sonde, sowie eine Sonde gegen den *pipA* ORF und den Auxotrophiemarker *pyrG* verwendet. Unter Verwendung der LB-Sonde entstand beim TN02A3 eine Bande mit einer Größe von 4,6 kb und beim Deletionsstamm von 2,2 kb. Durch die RB-Sonde konnte eine Bande von 4,6 kb beim Wildtyp und eine Bande von 3,2 kb bei der Deletion, die homologe Integration des Deletionskonstruktes bestätigen. Durch die *pipA*-Sonde entstand eine Bande von 4,5 kb beim Wildtyp und bei der Deletion, wodurch nachgewiesen wurde, dass *pipA* auch im eigentlichen Deletionsstamm vorhanden ist und somit ein Heterokaryon oder ein diploider Stamm vorliegen muss (Abb. 38 e). Der erhaltene Stamm besaß einen Phänotyp, welcher sich von dem Phänotyp des Wildtyps TN02A3 unterscheidet (Abb. 38 f). Der diploide Stamm wächst etwas kompakter und kleiner, außerdem bildet er vermehrt Luftmyzel und keine Sporen aus.

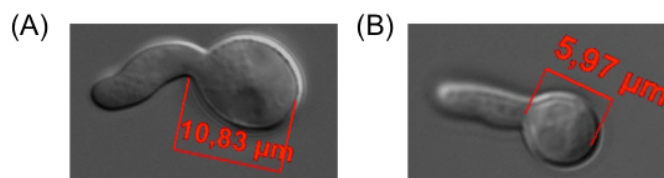


**Abbildung 38: Deletion von *pipA* führt zur Ausbildung eines diploiden Stammes.** (A) Deletionskonstrukt und Ort der homologen Rekombination. Das Deletionskonstrukt ersetzt durch homologe Rekombination der stromabwärts und –aufwärts gelegenen Region das *pipA* Gen. Die dargestellten Pfeile mit P1, P3, P4 und P6-P8 zeigen die Bindestellen der verwendeten Primer, um die Deletion nachzuweisen. (B) PCR zum Nachweis der Deletion. Mit Hilfe der Primer P1 und P3 (1,7 kb) wurde die Integration stromaufwärts von *pipA* bestätigt, mit P4 und P6 (1,5 kb) stromabwärts und mit P7 und P8 (531 bp) wurde weiterhin das Vorhandensein des ORF bestätigt. (C) Schema zum Nachweis von *pipA* durch einen Southern-Blot. Durch Verdau genomischer DNA des Wildtyps mit *XhoI* und unter Verwendung einer LB-, RB- und ORF-Sonde konnte *pipA* (4,6 kb) im Southern-Blot nachgewiesen werden. (D) Schema zum Nachweis der Deletion von *pipA* durch einen Southern-Blot. Durch Verdau genomischer DNA des Wildtyps mit *XhoI* entstand eine Bande von etwa 2,2 kb unter Verwendung einer LB-Sonde. Durch Verwendung einer RB-Sonde entstand eine Bande mit einer Größe von 3,2 kb. Mit Hilfe der *pyrG*-Sonde entstand ebenfalls eine Bande von 3,2 kb, wodurch die richtige Integration des Deletionskonstruktes bestätigt wurde. Weiterhin wurde mit Hilfe der ORF-Sonde aufgezeigt, dass *pipA* immer noch vorhanden ist. (E) Southern-Blot. Mit Hilfe der LB-, RB- und der *pyrG*-Sonde konnte nachgewiesen werden, dass das verwendete

dele Deletionskonstrukt an der richtigen Stelle integriert worden ist. Durch die *pipA*-Sonde konnte nachgewiesen werden, dass *pipA* weiterhin in der Deletionsmutante vorhanden ist, genauso wie im Wildtyp. **(F)** Vergleich des Wildtyps mit dem diploiden Stamm. Die Deletion von *pipA* verursachte eine Veränderung im Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutante wuchs langsamer und bildete weniger Sporen, sowie mehr Luftmyzel.

Zur Überprüfung, ob ein Heterokaryon oder ein diploider Stamm vorliegt, wurden verschiedene Tests durchgeführt. Für den Heterokaryon-Test (Osmani et al, 2006) wurden ausschließlich Sporen des zu testenden Stammes verwendet und auf Medium mit und ohne Selektionsmarker ausgestrichen. Liegt ein Heterokaryon vor, dann können die Sporen auf dem Medium ohne Selektionsmarker nicht wachsen, da die Sporen nur einen Kern besitzen. Das bedeutet, dass die Sporen mit der Deletion nicht wachsen können, da die Deletion letal ist und die Sporen mit dem Wildtyp-Gen können nicht wachsen, da diese keinen Selektionsmarker besitzen. Da der *pipA* Deletionsstamm in der Lage war auf den unterschiedlichen Medien zu wachsen, konnte davon ausgegangen werden, dass kein Heterokaryon vorliegt.

Somit wurde angenommen, dass der Stamm diploid ist. Diese Vermutung wurde weiter durch mikroskopische Untersuchungen der Hyphen des diploiden Stammes untermauert. Es ist bekannt, dass die Sporen von diploiden Stämmen ein größeres Volumen besitzen als Sporen von haploiden Stämmen (Clutterbuck, 1969). Dieser Größenunterschied der Sporen konnte auch beim vorliegenden Stamm nachgewiesen werden (Abb. 39).

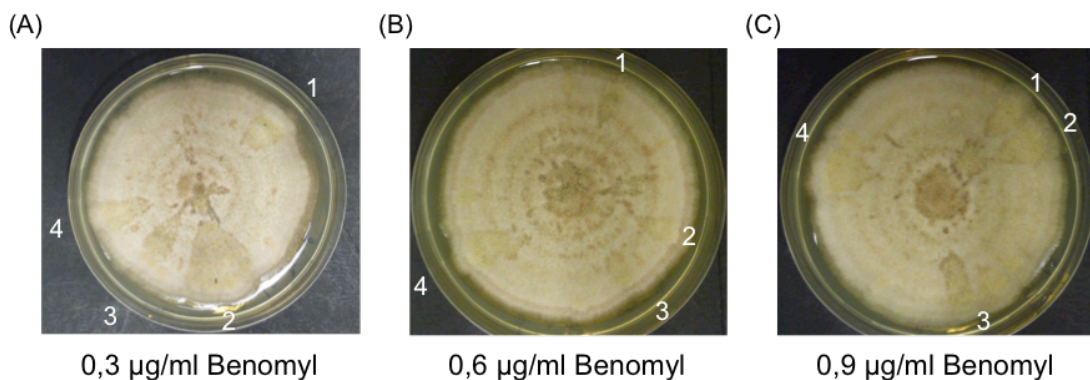


**Abbildung 39: Die Sporen des *pipA* Deletionsstammes weisen ein größeres Volumen auf als der Wildtypstamm TN02A3. (A)** Der *pipA* Deletionsstamm weist eine vergrößerte Spore, mit einer Länge von 10,83 µm, auf. **(B)** Wohingegen die Spore des Wildtyps TN02A3 nur eine Länge von 5,97 µm besitzt.

Um den Stamm zu haploidisieren und somit einen Stamm zu erhalten, welcher nur die Deletion ohne Wildtyphintergrund besitzt, wurde die sexuelle Entwicklung induziert. Der Stamm wurde für zehn Tage unter Bedingungen mit erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration und im Dunkeln auf Selektionsmedium wachsen gelassen. Unter diesen Bedingungen werden die Kleistothezien gebildet, welche die Fruchtkörper der sexuellen Entwicklung darstellen. Diese wurden isoliert, von den umgebenen Hüllzellen befreit und die enthaltenen Ascosporen durch zerquetschen der Kleistothezien

zien freigesetzt. Die Ascosporen wurden auf Selektionsmedium ausplattiert. Die erhaltenen Kolonien sollten die Deletion und somit das Deletionskonstrukt mit dem Selektionsmarker enthalten. Die Kolonien wurden mit Hilfe von PCR auf das Vorhandensein des Deletionskonstruktes und des Verlustes des ORF überprüft. Jedoch wurde keine Haploidisierung des Stammes erreicht, da weiterhin der ORF zusätzlich zum Deletionskonstrukt nachgewiesen werden konnte.

Aufgrund dessen wurde versucht den Stamm durch Wachstum auf Platten mit Benomyl zu haploidisieren. Benomyl ist ein Fungizid, welches zur Destabilisierung der Mikrotubuli führt (Rischitor et al, 2004). Es wurde je eine Kolonie des diploiden Stammes auf Selektionsmedium mit 0,3 µg/ml, 0,6 µg/ml und 0,9 µg/ml Benomyl gepickt und etwa sieben Tage bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien zeigten Sektorenbildung auf, welches ein Kennzeichen für eine Haploidisierung darstellt (Abb. 40). Von verschiedenen Sektoren wurden Sporensuspensionen hergestellt und diese auf Selektionsmedium ausplattiert. Die erhaltenen Kolonien wurden auf den Verlust des *pipA* ORF getestet.



**Abbildung 40: Haploidisierung des *pipA* Deletionsstammes auf Benomyl-Platten. (A)** Kolonie des *pipA*-Deletionsstammes auf Medium mit 0,3 µg/ml Benomyl mit ausgebildeten Sektoren. Aus den gekennzeichneten Sektoren wurden Sporen zur Überprüfung der Haploidisierung entnommen. **(B)** Kolonie des *pipA*-Deletionsstammes auf Medium mit 0,6 µg/ml Benomyl mit ausgebildeten Sektoren. Aus den gekennzeichneten Sektoren wurden Sporen zur Überprüfung der Haploidisierung entnommen. **(C)** Kolonie des *pipA*-Deletionsstammes auf Medium mit 0,9 µg/ml Benomyl mit ausgebildeten Sektoren. Aus den gekennzeichneten Sektoren wurden Sporen zur Überprüfung der Haploidisierung entnommen.

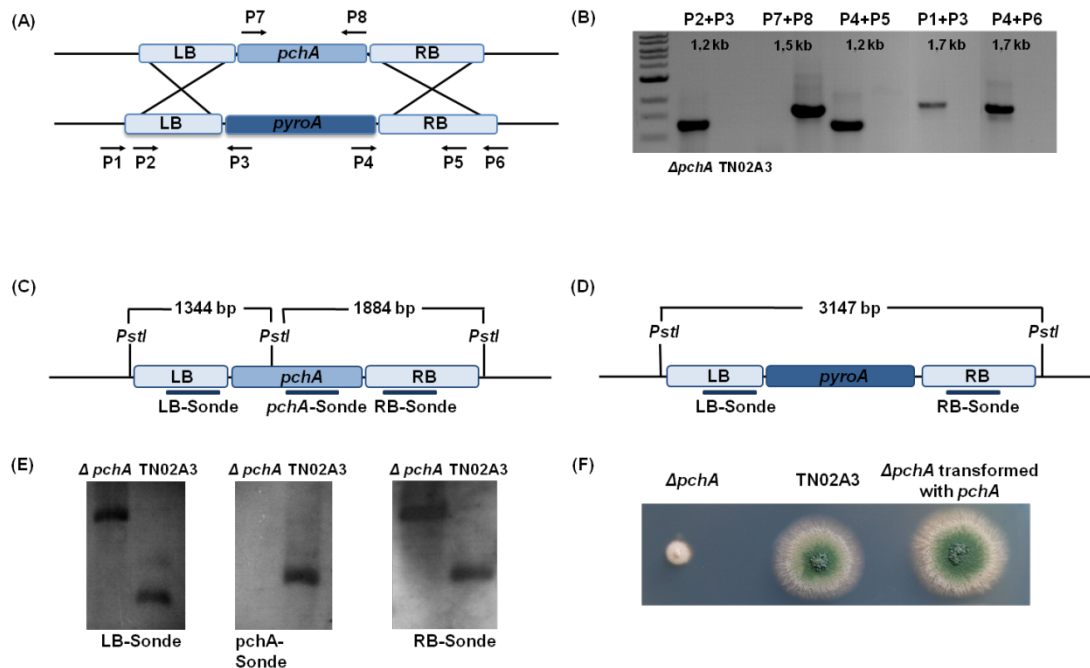
Da nach der Haploidisierung weiterhin das *pipA* Gen nachgewiesen werden konnte, ist die Deletion von *pipA* offensichtlich nicht möglich.



### 3.6.3 Deletion von *pchA* verursacht einen starken Wachstumsdefekt während der asexuellen Entwicklung

Um die Funktion von *pchA* in *A. nidulans* näher zu untersuchen, wurde ebenfalls ein Deletionsstamm hergestellt. Für die Deletion wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem der Auxotrophiemarker *pyroA* (Osmani et al, 1999) durch etwa 1 kb der stromabwärts- und -aufwärts von *pchA* gelegenen Region flankiert wird. *pyroA* codiert für ein Gen, welches für die Pyridoxinbiosynthese wichtig ist. Das verwendete Konstrukt wurde in den Wildtypstamm TN02A3 transformiert, welcher unter anderem eine *pyro* Auxotrophie besitzt. Durch Transformation mit dem Deletionskonstrukt verlieren die positiven Transformanten die *pyro*-Auxotrophie, wodurch diese in der Lage sind auf Medium ohne Pyridoxin zu wachsen. Durch die verwendeten stromabwärts- und aufwärts gelegenen Sequenzen, welche *pyroA* flankieren, wird eine homologe Rekombination ermöglicht. Dadurch wurde das *pchA* Gen durch *pyroA* ersetzt und somit ein für *pchA* deletierter Stamm (SKC9) hergestellt (Abb. 41 a). Zur Überprüfung der richtigen Integration wurde von den Transformanten und vom Wildtyp genomische DNA hergestellt. Zuerst wurde mit den Primer P7 und P8 eine PCR auf den ORF durchgeführt, wodurch gezeigt werden konnte, dass das *pchA* Gen mit einer Größe von 1,5 kb nicht mehr vorhanden ist (Abb. 41 b). Im Anschluss wurden Primer verwendet, welche in *pyroA* und in der stromabwärts oder -aufwärts gelegenen Region, außerhalb und innerhalb des transformierten Konstrukts, binden. Um die Aufnahme des Deletionskonstruktes nachzuweisen, wurden zuerst die Primer P2 und P3 verwendet, wobei eine Bande von 1,2 kb entstanden ist und die Primer P4 und P6, mit einer Bande von 1,2 kb. Für den Nachweis der richtigen Integration stromaufwärts (LB) von *pchA*, wurden der Primer P1 und P3 verwendet. Das erhaltene PCR-Produkt hatte eine Größe von 1,7 kb und bestätigte die homologe Rekombination. Zum Nachweis der Integration im stromabwärts (RB) gelegenen Bereich wurden die Primer P4 und P6 benutzt. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 1,7 kb (Abb. 41 b). Um die Deletion weiter zu bestätigen wurde ein Southern-Blot durchgeführt (Abb. 41 c-e). Dafür wurde die genomische DNA über Nacht mit *Pst*I verdaut, am nächsten Tag auf ein Agarosegel aufgetragen und im Anschluss auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Zum Nachweis der homologen Integration wurden eine mit DIG markierte LB- und eine RB-Sonde, sowie eine Sonde gegen den *pchA* ORF verwendet. Unter Verwendung der LB-Sonde entstand beim TN02A3 eine Bande mit einer Größe von 1,3 kb und beim Deletionsstamm von 3,1 kb. Durch die RB-Sonde konnte eine Bande von 1,8 kb beim Wildtyp und eine Bande von 3,1 kb bei der Deletion, die homologe Integration des Deletionskonstruktes bestätigen. Durch die *pchA*-Sonde entstand eine Bande von 1,8 kb beim Wildtyp und keine

Bande bei der Deletion, wodurch nachgewiesen wurde, dass der *pchA* ORF nicht mehr vorhanden war (Abb. 41 e). Der erhaltene Deletionsstamm zeigte einen stark veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp TN02A3 (Abb. 41 f). Die Deletion verursachte ein stark vermindertes Größenwachstum, was durch das Entstehen einer sehr kleinen Kolonie zu erkennen ist. Des Weiteren wurden keine Sporen ausgebildet. Dies wird vor allem durch das Fehlen der Grünfärbung der Kolonie, welche durch das Vorhandensein von Sporen verursacht wird, offensichtlich.

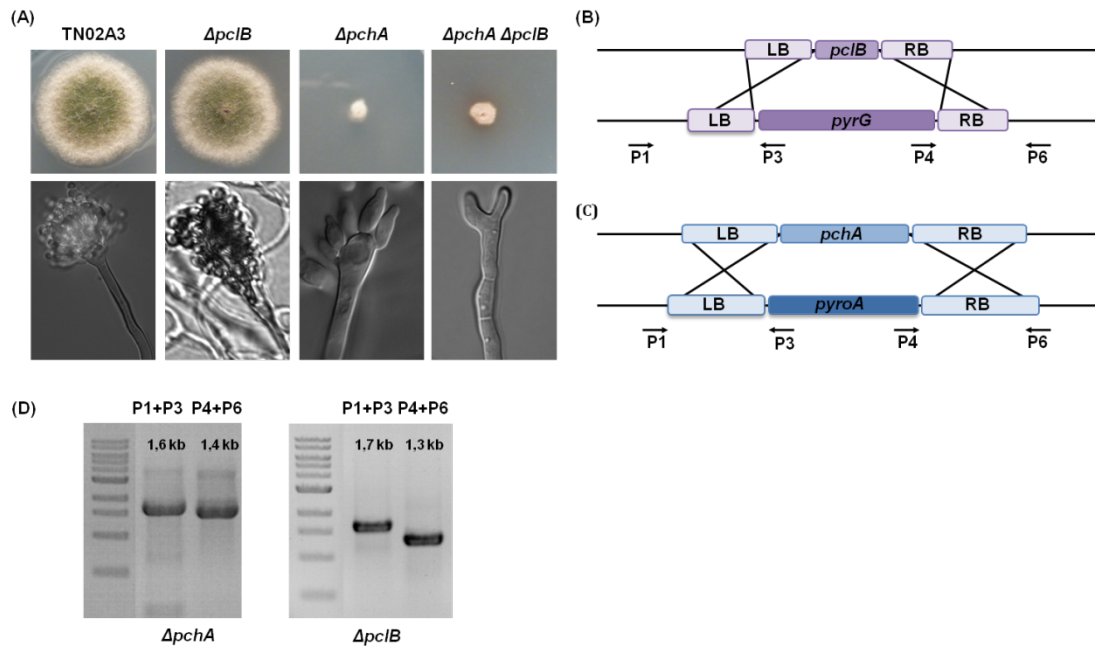


**Abbildung 41: Deletion von *pchA* verursacht eine starke Verminderung des vegetativen Wachstums und zu einer Veränderung der asexuellen Strukturen.** (A) Deletionskonstrukt und Ort der homologen Rekombination. Das Deletionskonstrukt ersetzt durch homologe Rekombination der stromabwärts und –aufwärts gelegenen Region das *pchA* Gen. Die dargestellten Pfeile mit P1-P8 zeigen die Bindestellen der verwendeten Primer, um die Deletion nachzuweisen. (B) PCR zum Nachweis der Deletion. Durch die Primer P2 und P3 (1,2 kb) und P4 und P5 (1,2 kb) konnte die Aufnahme des Deletionskonstruktes durch die Transformation gezeigt werden. Mit Hilfe der Primer P1 und P3 (1,7 kb) wurde die Integration stromaufwärts von *pchA* bestätigt, mit P4 und P6 (1,7 kb) stromabwärts und mit P7 und P8 (1,5 kb) wurde weiterhin das Vorhandensein des ORF bestätigt. (C) Schema zum Nachweis von *pchA* durch einen Southern-Blot. Durch Verdau genomischer DNA des Wildtyps mit *PstI* und unter Verwendung einer LB-Sonde (1,3 kb), sowie einer RB- und ORF-Sonde konnte *pchA* (1,8 kb) im Southern-Blot nachgewiesen werden. (D) Schema zum Nachweis der Deletion von *pchA* durch einen Southern-Blot. Durch Verdau genomischer DNA des Deletionsstammes mit *PstI* entstand eine Bande von etwa 3,1 kb unter Verwendung einer LB- und einer RB-Sonde. Weiterhin wurde mit Hilfe der ORF-Sonde aufgezeigt, dass *pchA* nicht mehr vorhanden ist. (E) Southern-Blot. Mit Hilfe der LB- und der RB-Sonde konnte nachgewiesen werden, dass das verwendete Deletionskonstrukt an der richtigen Stelle integriert worden ist. Durch die *pchA*-Sonde konnte nachgewiesen werden, dass *pchA* nicht mehr in der Deletionsmutante vorhanden ist, aber im Wildtyp. (F) Vergleich des Wildtyps mit der Deletionsmutante. Die Deletion von *pchA* verursacht eine starke Veränderung im Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletionsmutante wächst langsamer und kompakter, außerdem werden keine Sporen gebildet, aber dafür mehr Luftmyzel.

### 3.6.4 Gleichzeitige Deletion von zwei Zyklinen führt zu einer Verstärkung im Phänotyp der jeweiligen Einzeldeletionen

Durch die Herstellung einzelner Deletionen wurde bereits sichtbar, dass vor allem *pchA* eine wichtige Rolle in der Entwicklung und im Wachstum von *A. nidulans* einnimmt. Aber auch durch die Deletion des Zyklins *pclA* konnte gezeigt werden, dass es wichtig für die Sporenbildung während der asexuellen Entwicklung ist (Schier et al, 2001). Dahingegen zeigte die Deletion von *pclB* keinerlei Auswirkung auf das Wachstum von *Aspergillus*. Aufgrund dessen wurden Doppeldeletionen hergestellt, um herauszufinden, ob *pclB* möglicherweise zusammen mit den anderen gefundenen Zyklinen eine Funktion hat.

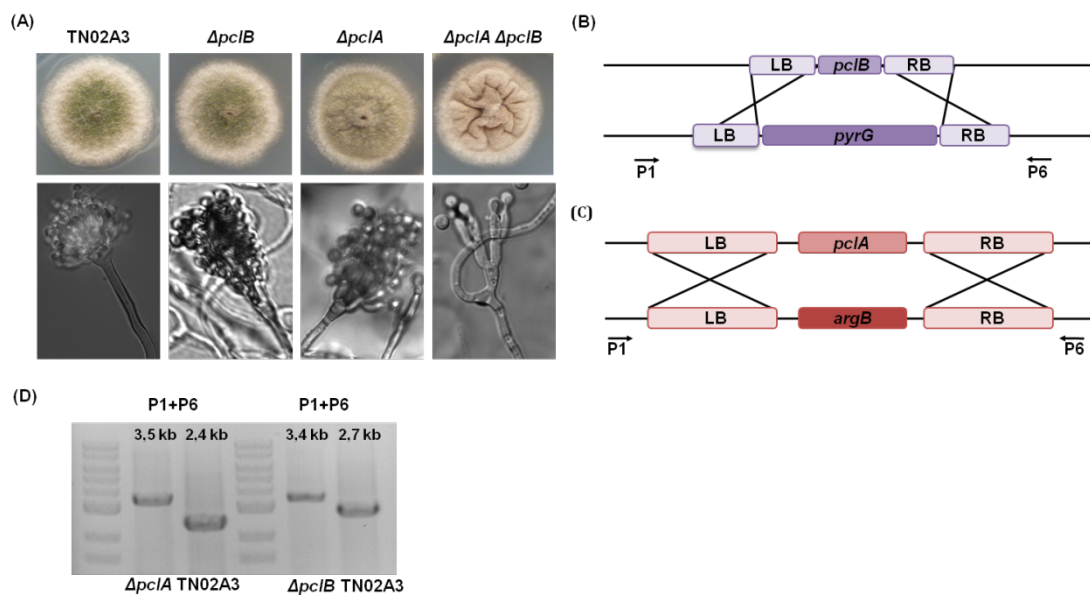
Für die Herstellung der *pclB* und *pchA* Doppelmutante wurden die einzelnen Deletionsstämme miteinander gekreuzt. Dafür wurden beide Stämme nebeneinander auf eine Platte gepickt und zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Sobald die Kolonien aufeinander zugewachsen waren, wurde ein Agarblock mit Hyphen aus der Kreuzungsstelle der beiden Mutanten ausgestochen. Dieser wurde mit der Oberseite nach unten auf eine neue Agarplatte übertragen. Das dafür verwendete Medium enthielt keine Selektionsmarker, da die verwendeten Stämme durch die Kreuzung die fehlenden Marker rekompensieren konnten und dadurch der erfolgreich gekreuzte Stamm keinerlei Marker mehr besitzen sollte. Der *pchA* Deletionsstamm hat als Auxotrophie-marker *pyrG* und der *pclB* Deletionsstamm hat *pyro*. Die Agarplatte mit dem Agarblock wurde zehn Tage bei 37 °C inkubiert, bis sich ein Heterokaryon und Kleistothecien ausgebildet hatten. Die erhaltenen Kleistothecien wurden gepickt, in ein Eppi mit Wasser überführt und zerquetscht, um die Ascosporen freizusetzen. Die Ascosporensuspension wurde auf Medium ohne Selektionsmarker ausplattiert und die erhaltenen Kolonien wurden mit Hilfe von PCR auf das Vorhandensein beider Deletionen getestet (Abb. 42 b-d). Dafür wurden Primer verwendet, welche außerhalb des transformierten Konstrukts, in der stromaufwärts oder –abwärts vom deletierten Gen gelegenen Region oder im Selektionsmarker binden. Der durch die Kreuzung hergestellte Doppeldeletionsstamm zeigte einen verstärkten  $\Delta pchA$  Phänotyp (Abb. 42 a). Der *pchA*-Deletionsstamm zeigte bereits einen sehr starken Wachstumsdefekt, aber durch die zusätzliche Deletion von *pclB* wurde der bereits vorhandene Phänotyp nochmals verstärkt. Der  $\Delta pchA$  Stamm zeigte bereits ein abnormales Wachstum der Konidiophoren. Die ausgebildeten Konidiophoren wiesen stark vergrößerte Metulae auf und keine Ausbildung von Phialiden oder Sporen. In der Doppelmutante konnten keine Konidiophoren mehr ausgebildet werden. Es fand nur noch ein verzweigtes Hyphenwachstum statt.



**Abbildung 42: Doppel-Deletion von *pchA* und *pclB* verursacht eine Verstärkung im Phänotyp von  $\Delta pchA$ .** (A) Phänotyp der Deletionsmutanten. Bereits auf der Platte ist ein deutlicher Unterschied im Wachstumsverhalten der verschiedenen Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp TN02A3 zu erkennen. Der Stamm mit beiden Deletionen zeigt etwa die gleiche Koloniegröße wie der  $\Delta pchA$  Stamm, aber er ist deutlich brauner in der Färbung, was auf ein verstärktes vegetatives Hyphenwachstum hinweist. Die Doppelmutante ist nicht mehr in der Lage Konidienstränge auszubilden. (B) Schematische Darstellung der verwendeten Primer zum Nachweis der *pclB* Deletion. Es wurden die Primer P1 und P3 zum Nachweis der richtigen Integration stromaufwärts vom *pclB* Genort verwendet und P4 mit P6 zum Nachweis der richtigen Integration stromabwärts vom Genort. (C) Schematische Darstellung der verwendeten Primer zum Nachweis der *pchA* Deletion. Es wurden die Primer P1 und P3 zum Nachweis der richtigen Integration stromaufwärts vom *pchA* Genort verwendet und P4 mit P6 zum Nachweis der richtigen Integration stromabwärts vom Genort. (D) Agarosegel mit den durchgeführten PCR-Reaktionen zum Nachweis der richtigen Integration. Die richtige Integration der *pchA*-Deletionskassette wurde mit den Primern P1 und P3 (1,6 kb), sowie P4 und P6 (1,4 kb) nachgewiesen, da die Primer entweder außerhalb des transformierten Konstrukts (P1 und P6) oder im *pyrG* Marker (P3 und P4) gebunden haben. Die Deletion von *pclB* wurde auf die gleiche Weise bestätigt, wobei durch die Primer P1 und P3 eine Bande bei 1,7 kb und mit den Primern P4 und P6 eine Bande von 1,3 kb entstanden ist.

Für die Herstellung der *pclA* und *pclB* Doppelmutante wurden die einzelnen Deletionsstämme miteinander gekreuzt. Dafür wurden beide Stämme nebeneinander auf eine Platte gepickt und zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Sobald die Kolonien aufeinander zugewachsen waren, wurde ein Agarblock mit Hyphen aus der Kreuzungsstelle der beiden Mutanten ausgestochen. Dieser wurde mit der Oberseite nach unten auf eine neue Agarplatte übertragen. Das dafür verwendete Medium enthielt keine Selektionsmarker, da die verwendeten Stämme durch die Kreuzung die fehlenden Marker rekompensieren konnten und dadurch der erfolgreich gekreuzte Stamm keinerlei Marker mehr besitzen sollte. Der *pclA* Deletionsstamm hat als Auxotrophiemarker *pyrG* und der *pclB* Deletionsstamm hat *pyro*. Die Agarplatte mit dem

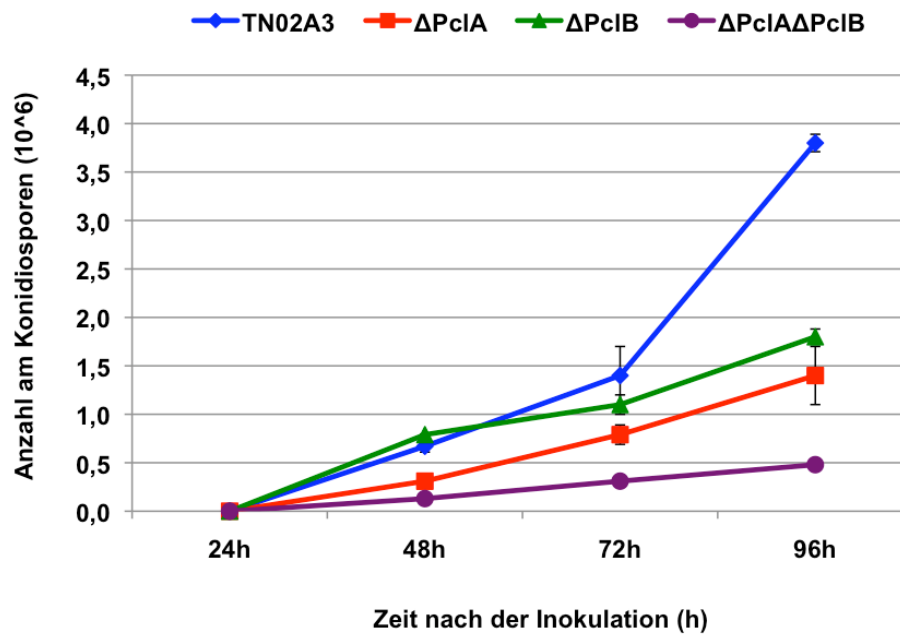
Agarblock wurde zehn Tage bei 37 °C inkubiert, bis sich ein Heterokaryon und Kleistothecien ausgebildet hatte. Die erhaltenen Kleistothecien wurden gepickt, in ein Eppi mit Wasser überführt und zerquetscht, um die Ascosporen freizusetzen. Die Ascosporensuspension wurde auf Medium ohne Selektionsmarker ausplattiert und die erhaltenen Kolonien wurden mit Hilfe von PCR auf das Vorhandensein beider Deletionen getestet (Abb. 43 b-d). Dafür wurden Primer verwendet, welche außerhalb des transformierten Konstrukts, in der stromaufwärts oder –abwärts vom deletierten Gen gelegenen Region binden. Der durch die Kreuzung hergestellte Doppeldeletionsstamm zeigte einen verstärkten  $\Delta pcIA$  Phänotyp (Abb. 43 a). Der  $pcIA$ -Deletionsstamm zeigte bereits eine verminderte Sporenbildung (Schier et al, 2001), aber durch die zusätzliche Deletion von  $pcIB$  wurde der bereits vorhandene Phänotyp nochmals verstärkt. Der  $\Delta pcIA$  Stamm war weiterhin in der Lage normale Konidiophoren herzustellen, jedoch wurden weniger Sporen im Vergleich zum Wildtyp gebildet. Die Doppelmutante zeigte einen veränderten Phänotyp der Konidiophoren. Es wurden zwar weiterhin Konidiophoren gebildet, jedoch wurden abnormal verlängerte Metulae und Phialiden gebildet. Des Weiteren wurden keine Sporenketten, sondern nur einzelne Sporen ausgebildet.



**Abbildung 43: Doppel-Deletion von  $pcIA$  und  $pcIB$  verursacht eine Verstärkung im Phänotyp von  $\Delta pcIA$ .** (A) Phänotyp der Deletionsmutanten. Bereits auf der Platte ist ein Unterschied im Wachstumsverhalten der verschiedenen Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp TN0A3 zu erkennen. Der Stamm mit beiden Deletionen zeigt ein normales Größenwachstum. Gleichzeitig weist die Kolonie eine deutlich braunere Färbung auf, was auf eine verringerte Sporenbildung hinweist. Die Doppelmutante bildet weiterhin Konidiophoren aus, jedoch entsprechen diese nicht dem Wildtyp. (B) Schematische Darstellung der verwendeten Primer zum Nachweis der  $pcIB$  Deletion. Es wurden die Primer P1 und P6 zum Nachweis der richtigen Integration des gesamten Deletionskonstrukts verwendet. Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm verwendet, welcher durch das noch vorhandene  $pcIB$  eine andere PCR-

Produkt mit einer anderen Größe erreicht. **(C)** Schematische Darstellung der verwendeten Primer zum Nachweis der *pcIA* Deletion. Es wurden die Primer P1 und P6 zum Nachweis der richtigen Integration des gesamten Deletionskonstrukts verwendet. Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm verwendet, welcher durch das noch vorhandene *pcIA* ein anderes PCR-Produkt mit einer anderen Größe erreicht. **(D)** Agarosegel mit den durchgeführten PCR-Reaktionen zum Nachweis der richtigen Integration. Durch PCR mit genomischer DNA des Wildtyps entsteht eine Bande mit einer Größe von 2,4 kb, wenn *pcIA* noch vorhanden ist und eine Bande von 2,7 kb, wenn *pcIB* noch vorhanden ist. Durch PCR mit genomischer DNA der jeweiligen Deletionsmutante, entsteht eine Bande von 3,5 kb bei der *pcIA* und 3,4 kb bei der *pcIB* Deletionsmutante.

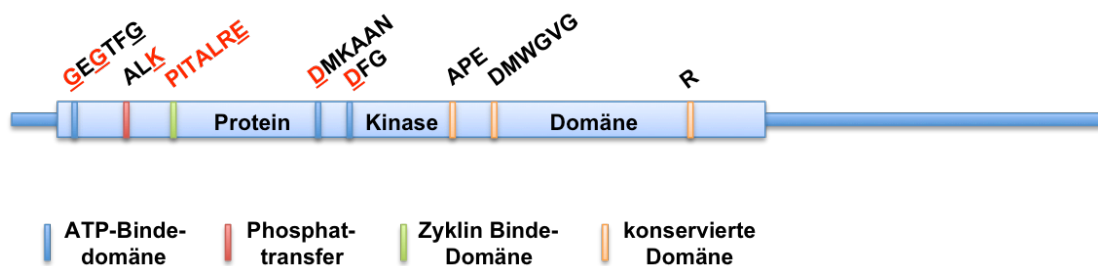
Um den Unterschied in der Sporenproduktion beim Wildtyp im Vergleich zum  $\Delta pcIA$ ,  $\Delta pcIB$  und der  $\Delta pcIA$ - $\Delta pcIB$ -Doppelmutante genauer zu bestimmen, wurden Sporen ausgezählt (Abb. 44). Dafür wurden von den verschiedenen Stämmen Sporensuspensionen hergestellt. Aus den jeweiligen Sporensuspensionen wurden  $1 \cdot 10^6$  Sporen verwendet und mit Hilfe von Glaskügelchen gleichmäßig auf Platten verteilt. Die Platten wurden 24, 48, 72 und 96 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden mit der Rückseite einer blauen Pippettenspitze vier Agarblöcke ausgestanzt. Diese wurden in Eppis mit einer Sporenwaschlösung (0,02 % Tween 80 und 0,85 % NaCl) überführt. Durch Schütteln der Proben wurden die Sporen von der Oberfläche abgelöst. Die entstandene Sporensuspension wurde zum Auszählen der Sporenanzahl weiterverwendet (Abb. 44). Die Sporenmenge stieg mit Verlängerung der Wachstumszeit an, wobei es beim Wildtyp TN02A3 einen Sprung zwischen 72 und 96 Stunden Wachstum gab, von  $1,5 \cdot 10^6$  Sporen nach 72 Stunden Wachstum zu knapp  $4 \cdot 10^6$  Sporen nach 96 Stunden. Der *pcIB*-Deletionsstamm bildete bis zu einer Wachstumsdauer von etwa 72 Stunden gleich viele Sporen wie der Wildtyp. Danach verlangsamte sich jedoch die Sporenbildung im Vergleich zum Wildtyp. Nach 96 Stunden Wachstum hatte der *pcIB*-Deletionsstamm nur etwa  $1,6 \cdot 10^6$  Sporen ausgebildet, der Wildtyp hatte im Gegensatz etwa 2,5 mal so viele Sporen ausgebildet. Die Kurve zur Sporenproduktion im  $\Delta pcIA$  Stamm, entspricht dem Verlauf der Sporenproduktion im  $\Delta pcIB$  Stamm, jedoch werden insgesamt weniger Sporen ausgebildet. Nach 96 Stunden Wachstum hatte  $\Delta pcIA$  nur  $1,4 \cdot 10^6$  Sporen gebildet, im Vergleich zu  $1,6 \cdot 10^6$  Sporen beim  $\Delta pcIB$  Stamm. Der Doppel-Deletionsstamm zeigte eine stärkere Behinderung der Sporenbildung, da nach 96 Stunden Wachstum nur knapp  $5 \cdot 10^5$  Sporen gebildet wurden. Somit hatte der  $\Delta pcIA \Delta pcIB$  Stamm nach 96 Stunden weniger Sporen ausgebildet als der Wildtyp nach 48 Stunden Wachstum.



**Abbildung 44: Doppel-Deletion von *pclA* und *pclB* verursacht eine Verringerung in der Sporenproduktion.** Bestimmung der Sporenanzahl in verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. TN02A3 (blau) ist der Wildtyp und dient als Kontrolle. Der  $\Delta pclB$  Stamm (grün) und der  $\Delta pclA$  Stamm (rot) dienen als Vergleich zur Doppelmutanten  $\Delta pclA \Delta pclB$  (lila). Es ist deutlich zu erkennen, dass der doppel Deletionsstamm die geringste Sporenproduktion aufweist, gefolgt von  $\Delta pclA$  und danach  $\Delta pclB$ .

### 3.7 Mutation konservierter Domänen in PtkA

Mitglieder der Cdk9 Familie und Proteinkinasen im Allgemeinen besitzen verschiedene konservierte Domänen (Hanks, 2003a; Hanks *et al*, 1988a) mit unterschiedlichen Aufgaben, so auch PtkA (Abb. 45). Die konservierten Domänen dienen der ATP-Bindung (GEGTFG, DMKANN, DFG), dem Phosphattransfer (ALK) oder der Bindung von Zyklinen (PITALRE). Um zu überprüfen, ob die Domänen eine essentielle Funktion besitzen, wurden diese mit Hilfe von Site-directed Mutagenesis mutiert oder deletiert. Dafür wurde ein bereits hergestelltes Plasmid mit *ptkA* verwendet, wobei *ptkA* N-terminal mit *gfp* fusioniert wurde und unter der Kontrolle des *alcA* Promotors stand (pFB18). Für die Deletion oder Mutation der konservierten Reste wurden Primer verwendet, welche den gewünschten Austausch enthielten. Durch eine PCR mit den hergestellten Primern wurden die ursprünglich in PtkA enthaltenen Sequenzen gegen die in den Primern abgeänderten Sequenzen ausgetauscht. Die dadurch erhaltenen Plasmide wurden in einen Wildtypstamm (GR5) transformiert. Bei der Domäne GEGTFG (GXGXXG) sind vor allem die Glyzin-Reste konserviert, weshalb das erste und das zweite Glyzin gegen jeweils ein Alanin ausgetauscht wurden. In der Domäne DMKANN ist das Aspartat und das Asparagin konserviert (DXXXXN). Es wurde das Aspartat gegen ein Glyzin ausgetauscht. In der letzten konservierten ATP-Bindedomäne DFG wurde das Aspartat gegen Alanin ausgetauscht. Neben den ATP-Bindedomänen wurde auch die Domäne für den Transfer von Phosphat (ALK) mutiert. Dabei wurde das unveränderliche Lysin gegen ein Glutamin ausgetauscht. Als letztes wurde noch die Zyklin-Bindedomäne (PITALRE) vollständig entfernt (Abb. 45).

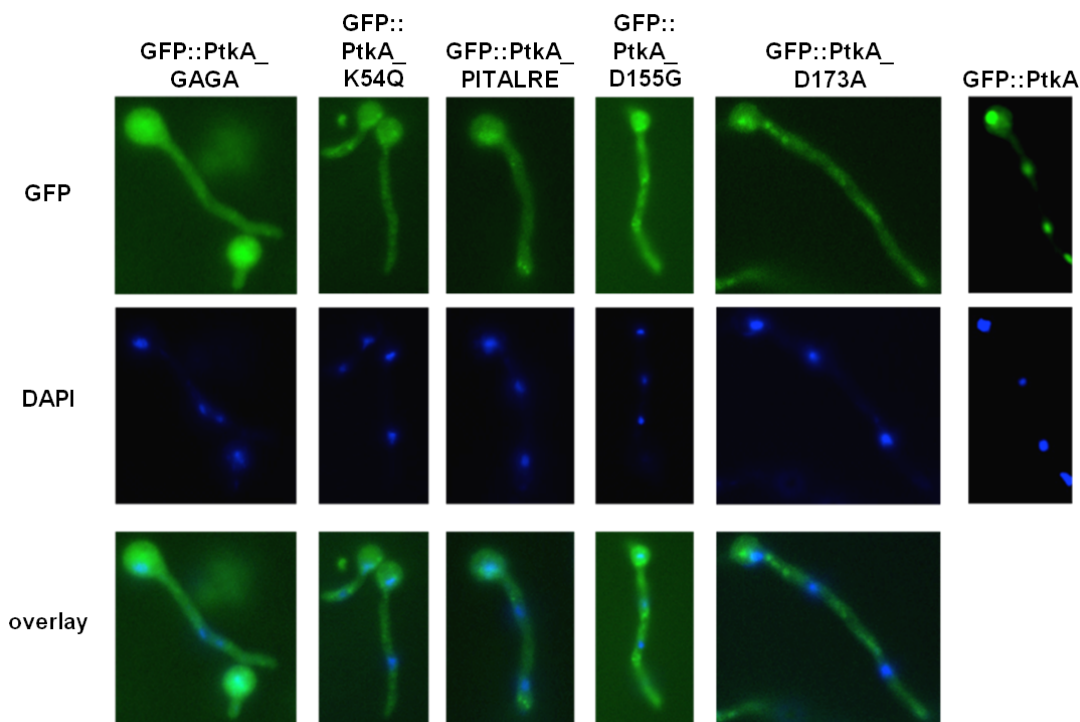


**Abbildung 45: Deletion oder Mutation konservierter Domänen in PtkA.** Durch Site-directed Mutagenesis wurden die ATP-Bindedomänen, die Domäne für den Phosphattransfer und für die Zyklin-Bindung abgeändert oder deletiert. In der Aminosäuresequenz GEGTFG wurden die Glyzine an der Position 32 und 34 jeweils gegen ein Alanin ausgetauscht. Bei der Domäne ALK wurde das unveränderliche Lysin 54 gegen Glutamin getauscht. Die Zyklin-Bindedomäne PITALRE wurde vollständig deletiert. Das Aspartat an Position 155 in DMKANN wurde gegen ein Glyzin getauscht und das Aspartat 173 in der DFG-Domäne wurden gegen ein Alanin ausgetauscht.



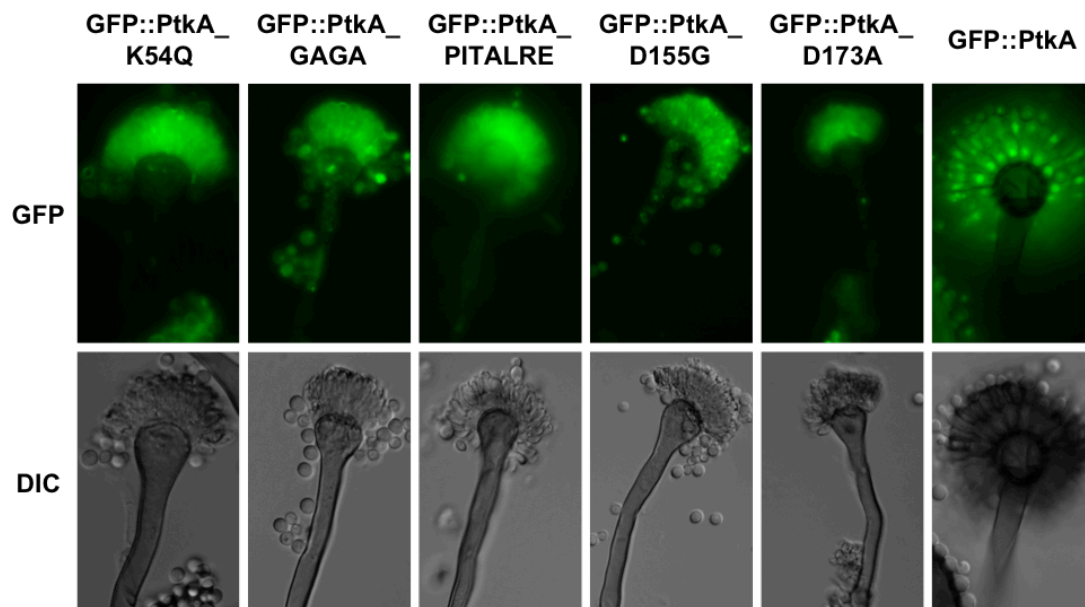
### 3.7.1 Veränderung der Lokalisierung von PtkA

Die in Kapitel 3.7 beschriebenen Konstrukte wurden jeweils in den Wildtypstamm GR5 transformiert. Dadurch wurden Stämme mit *gfp* markierten PtkA\_K54Q (SKC51), PtkA\_GAGA (SKC50), PtkA\_PITALRE (SKC46), PtkA\_D155G (SKC45) und PtkA\_D173A (SKC44) hergestellt. Durch mikroskopische Analyse der hergestellten Stämme sollte herausgefunden werden, ob die Deletion oder Mutation konservierter Aminosäuresequenzen eine Auswirkung auf die Lokalisierung von PtkA in der Zelle hat. Zur Feststellung, wo in der Zelle das unveränderte PtkA lokalisiert, wurde als positiv Kontrolle ein Stamm verwendet, welcher mit einem *gfp-ptkA* Konstrukt transformiert wurde (FB1). Dadurch konnte gezeigt werden, dass PtkA in den Zellkernen der Hyphe lokalisiert. Im Gegensatz dazu, wiesen die Stämme mit den mutierten PtkA-Varianten vor allem eine zytoplasmatische Lokalisierung auf. Da jedoch keine Aussparung der Zellkerne zu erkennen ist, kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil des gebildeten Proteins weiterhin im Zellkern lokalisiert (Abb. 46). Dies konnte durch eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI bestätigt werden.



**Abbildung 46: Deletion oder Mutation von konservierten Domänen der Kinase PtkA führen zu einer veränderten Lokalisierung in den Hyphen.** Das unveränderte PtkA lokalisiert im Zellkern, wie eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI bestätigt. Im Gegensatz dazu führt die Deletion jeder der konservierten Domänen zu einer Veränderung der Lokalisierung. Es kommt zu einer Verlagerung der Lokalisierung ins Zytoplasma, jedoch verbleibt auch ein Teil von PtkA im Zellkern. Dies konnte durch eine Anfärbung der Zellkerne mit DAPI nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob die Zellkernlokalisierung von PtkA in den Konidiophoren ebenfalls durch die Mutationen beeinträchtigt wird, wurden auch die Konidiophore der verschiedenen Stämme mikroskopiert (Abb. 47). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass jede der Mutationen von PtkA, auch in den Konidiophoren zu einer Verlagerung der Lokalisierung vor allem in das Zytoplasma stattfindet.

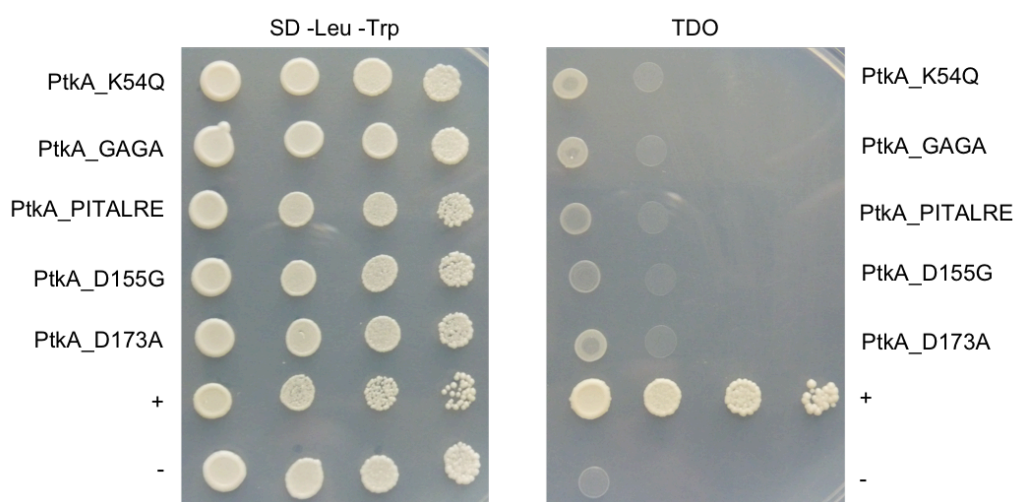


**Abbildung 47: Deletion oder Mutation von konservierten Domänen der Kinase PtkA führen zu einer veränderten Lokalisierung in den Konidiophoren.** Das Wildtyp-PtkA lokalisiert in den Konidiophoren ebenfalls im Zellkern. Im Gegensatz dazu führt die Deletion jeder der konservierten Domänen, auch in den Konidiophoren, zu einer Verringerung der Zellkernlokalisierung von PtkA. Gleichzeitig ist eine Lokalisierung im Zytoplasma zu erkennen.

### 3.7.2 Konkurrieren die verschiedenen Interaktionspartner von PtkA um die gleiche Bindestelle ?

Es sind insgesamt vier Interaktionspartner von PtkA bekannt. Eine Kinase, PipA und drei Zykline, PclA, PclB und PchA. Um herauszufinden, welche Domänen in PtkA für die Bindung der Interaktionspartner verantwortlich sind, wurden Yeast two-hybrid Experimente mit den verschiedenen mutierten PtkA-Konstrukten und den jeweiligen Interaktionspartnern durchgeführt. Dadurch sollte weiterhin herausgefunden werden, ob die Interaktionspartner möglicherweise um die gleiche Bindestelle konkurrieren.

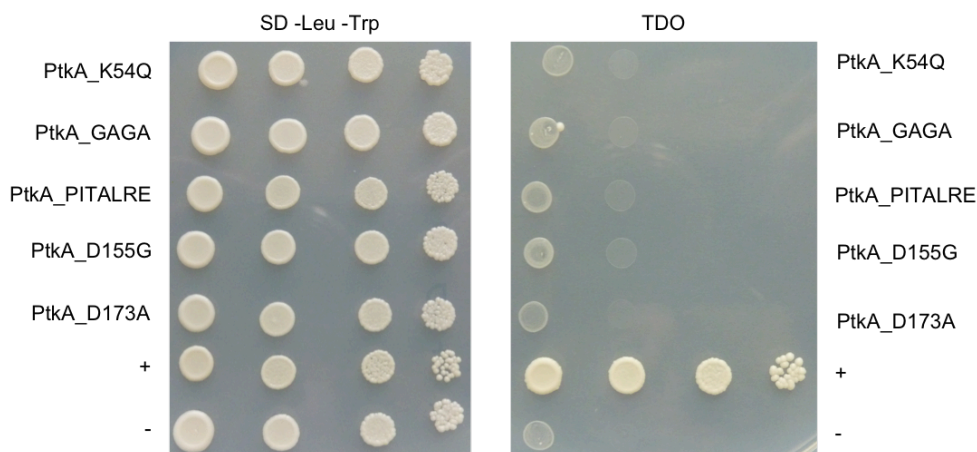
Um herauszufinden wo die Bindestelle in PtkA für PipA ist, wurde der *S. cerevisiae* Stamm AH109 mit den verschiedenen mutierten PtkA Konstrukten und gleichzeitig mit dem PipA Konstrukt transformiert. Für die PtkA-Konstrukte wurde der Vektor pGBT9 verwendet, welcher die GAL4 DNA-Bindedomäne enthält. Das Plasmid pGADT7-Rec mit der GAL4-Aktivierungsdomäne wurde für PipA verwendet. Sollte eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen stattfinden, dann können sich die Aktivierungsdomäne und die Bindedomänen des GAL4 Transkriptionsfaktors miteinander verbinden, wodurch ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor entsteht. Dadurch können verschiedene Reportergene abgelesen werden, welche es der Hefe erlauben auf dem Selektionsmedium TDO zu wachsen. Die hergestellten Stämme enthalten jeweils PipA mit PtkA\_K54Q (YKC35), PtkA\_GAGA (YKC36), PtkA\_PITALRE (YKC37), PtkA\_D155G (YKC38) oder PtkA\_D173A (YKC39). Unabhängig davon welche Domäne deletiert oder mutiert wurde, es fand keine Interaktion zwischen PtkA und PipA mehr statt (Abb. 48).



**Abbildung 48: Untersuchung der PipA-Bindestelle in PtkA.** Zur Überprüfung, welche Domänen von PtkA für die Interaktion mit PipA benötigt werden, wurde ein Y2H Versuch durchgeführt. Dafür wurde eine Kotransformation mit *pipA* und jeweils einem verändertem *ptkA*-Konstrukt in AH109 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf SD-Leu-Trp Medium

ausgebracht, um den Erfolg der Transformation und die Aufnahme der beiden Plasmide zu überprüfen, sowie auf TDO Medium, um die Interaktion zu testen. Da die Kolonien nicht auf dem TDO Medium wachsen konnten, kann davon ausgegangen werden, dass nach Deletion oder Mutation der unterschiedlichen konservierten Domänen in PtkA keine Interaktion von PipA und PtkA mehr möglich ist, unabhängig davon, welche Domäne deletiert wurde. Als Positivkontrolle wurde ein Konstrukt mit einem unverändertem *ptkA* verwendet. Als Negativkontrolle dienten die Kontrollvektoren pGBKT7-Lam und pGADT7-RecT aus dem Matchmarker Library and Construction Kit (Clontech). Es wurden verschiedene Verdünnungen einer Hefekultur aufgetragen, beginnend mit der unverdünnten Kultur hin zu einer Verdünnung von 1:1000.

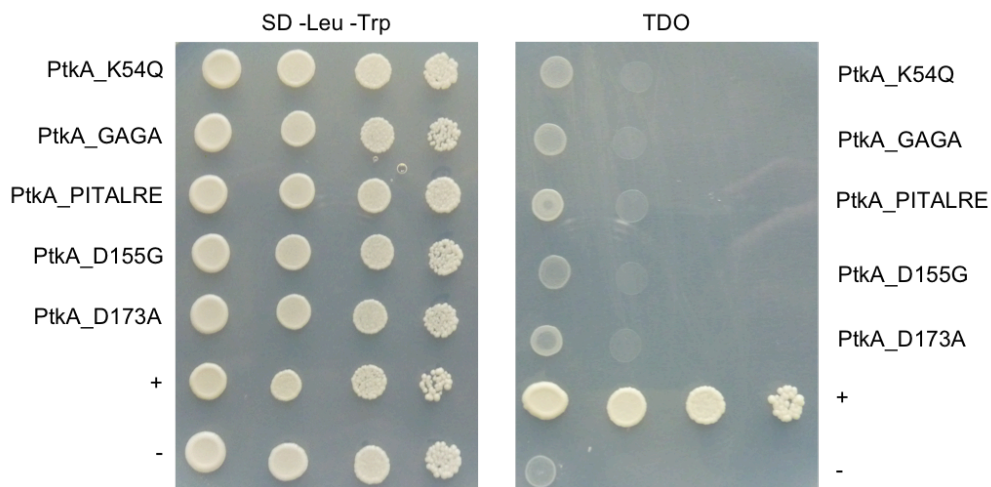
Wie schon für den Nachweis der Interaktion von PipA mit PtkA beschrieben, wurden ebenfalls Transformationen mit den mutierten PtkA-Konstrukten und PclB in den Stamm AH109 durchgeführt. Die erhaltenen Stämme mit PclB und PtkA\_K54Q (YKC40), PtkA\_GAGA (YKC41), PtkA\_PITALRE (YKC42), PtkA\_D155G (YKC43) oder PtkA\_D173A (YKC44) wurden auf Selektionsmedium ausgebracht. Auch in diesem Fall ist keine Interaktion, unabhängig von den deletierten konservierten Domänen, möglich (Abb. 49).



**Abbildung 49: Untersuchung der PclB-Bindestelle in PtkA.** Zur Überprüfung, welche Domänen von PtkA für die Interaktion mit PclB benötigt werden, wurde ein Y2H Versuch durchgeführt. Dafür wurde eine Kotransformation mit *pclB* und jeweils einem verändertem *ptkA*-Konstrukt in AH109 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf SD-Leu-Trp Medium ausgebracht, um den Erfolg der Transformation und die Aufnahme der beiden Plasmide zu überprüfen, sowie auf TDO Medium, um die Interaktion zu testen. Da die Kolonien nicht auf dem TDO Medium wachsen konnten, kann davon ausgegangen werden, dass nach Deletion oder Mutation der unterschiedlichen konservierten Domänen in PtkA keine Interaktion von PclB und PtkA mehr möglich ist, unabhängig davon, welche Domäne deletiert wurde. Als Positivkontrolle wurde ein Konstrukt mit einem unverändertem *ptkA* verwendet. Als Negativkontrolle dienten die Kontrollvektoren pGBKT7-Lam und pGADT7-RecT aus dem Matchmarker Library and Construction Kit (Clontech). Es wurden verschiedene Verdünnungen einer Hefekultur aufgetragen, beginnend mit der unverdünnten Kultur hin zu einer Verdünnung von 1:1000.

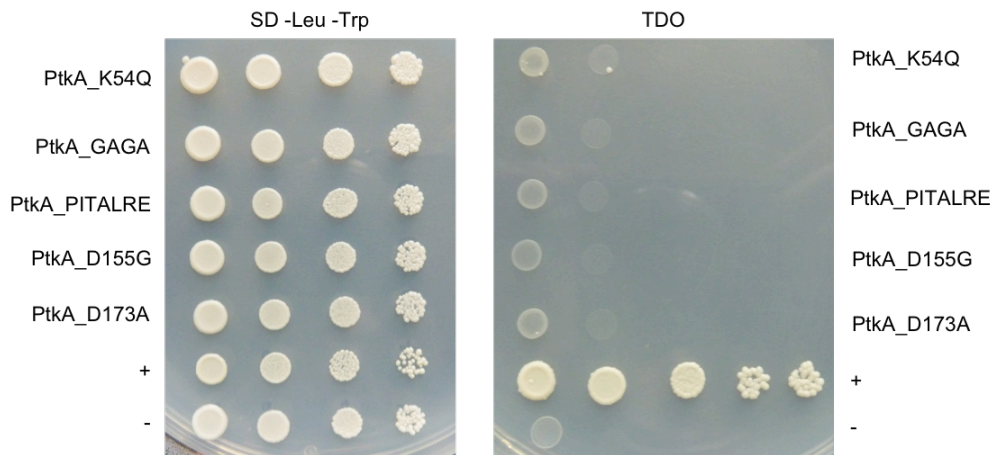
Der gleiche Versuch wurde für den Nachweis der Bindestelle von PchA in PtkA wiederholt. Die hergestellten Stämme mit PchA und PtkA\_K54Q (YKC45), PtkA\_GAGA (YKC46), PtkA\_PITALRE (YKC47), PtkA\_D155G (YKC48) oder PtkA\_D173A

(YKC49) wurden ebenfalls auf Selektionsmedium ausgebracht. Auch in diesem Fall kann ein Verlust der Interaktion von PchA mit PtkA nachgewiesen werden (Abb. 50).



**Abbildung 50: Untersuchung der PchA-Bindestelle in PtkA.** Zur Überprüfung, welche Domänen von PtkA für die Interaktion mit PchA benötigt werden, wurde ein Y2H Versuch durchgeführt. Dafür wurde eine Kotransformation mit *pchA* und jeweils einem verändertem *ptkA*-Konstrukt in AH109 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf SD-Leu-Trp Medium ausgebracht, um den Erfolg der Transformation und die Aufnahme der beiden Plasmide zu überprüfen, sowie auf TDO Medium, um die Interaktion zu testen. Da die Kolonien nicht auf dem TDO Medium wachsen konnten, kann davon ausgegangen werden, dass nach Deletion oder Mutation der unterschiedlichen konservierten Domänen in PtkA keine Interaktion von PchA und PtkA mehr möglich ist, unabhängig davon, welche Domäne deletiert wurde. Als Positivkontrolle wurde ein Konstrukt mit einem unverändertem *ptkA* verwendet. Als Negativkontrolle dienten die Kontrollvektoren pGBKT7-Lam und pGADT7-RecT aus dem Matchmaker Library and Construction Kit (Clontech). Es wurden verschiedene Verdünnungen einer Hefekultur aufgetragen, beginnend mit der unverdünnten Kultur hin zu einer Verdünnung von 1:1000.

Als letzter bekannter Interaktionspartner von PtkA, wurde versucht eine mögliche Bindestelle für PclA in PtkA zu ermitteln. Dafür wurden erneut Transformationen mit AH109 durchgeführt, um Stämme mit PclA und PtkA\_K54Q (YKC50), PtkA\_GAGA (YKC51), PtkA\_PITALRE (YKC52), PtkA\_D155G (YKC53) oder PtkA\_D173A (YKC54) herzustellen. Im Fall von PclA führt die Mutation von jeder Domäne auch zu einem Verlust der Interaktionsfähigkeit (Abb. 51).



**Abbildung 51: Untersuchung der PclA-Bindestelle in PtkA.** Zur Überprüfung, welche Domänen von PtkA für die Interaktion mit *pclA* benötigt werden, wurde ein Y2H Versuch durchgeführt. Dafür wurde eine Kotretransformation mit PclA und jeweils einem verändertem *ptkA*-Konstrukt in AH109 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf SD-Leu-Trp Medium ausgebracht, um den Erfolg der Transformation und die Aufnahme der beiden Plasmide zu überprüfen, sowie auf TDO Medium, um die Interaktion zu testen. Da die Kolonien nicht auf dem TDO Medium wachsen konnten, kann davon ausgegangen werden, dass nach Deletion oder Mutation der unterschiedlichen konservierten Domänen in PtkA keine Interaktion von PclA und PtkA mehr möglich ist, unabhängig davon, welche Domäne deletiert wurde. Als Positivkontrolle wurde ein Konstrukt mit einem unverändertem *ptkA* verwendet. Als Negativkontrolle dienten die Kontrollvektoren pGBKT7-Lam und pGADT7-RecT aus dem Matchmaker Library and Construction Kit (Clontech). Es wurden verschiedene Verdünnungen einer Hefekultur aufgetragen, beginnend mit der unverdünnten Kultur hin zu einer Verdünnung von 1:1000.

Durch die Mutation oder Deletion konservierter Domänen von PtkA wird die Fähigkeit zur Interaktion mit allen bekannten Interaktionspartnern verhindert. Die zuvor gezeigte Veränderung der Lokalisierung von PtkA in der Zelle (Kapitel 3.7.1), aufgrund der Veränderung konservierter Aminosäuren, steht anscheinend in Verbindung mit dem Verlust der Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen.

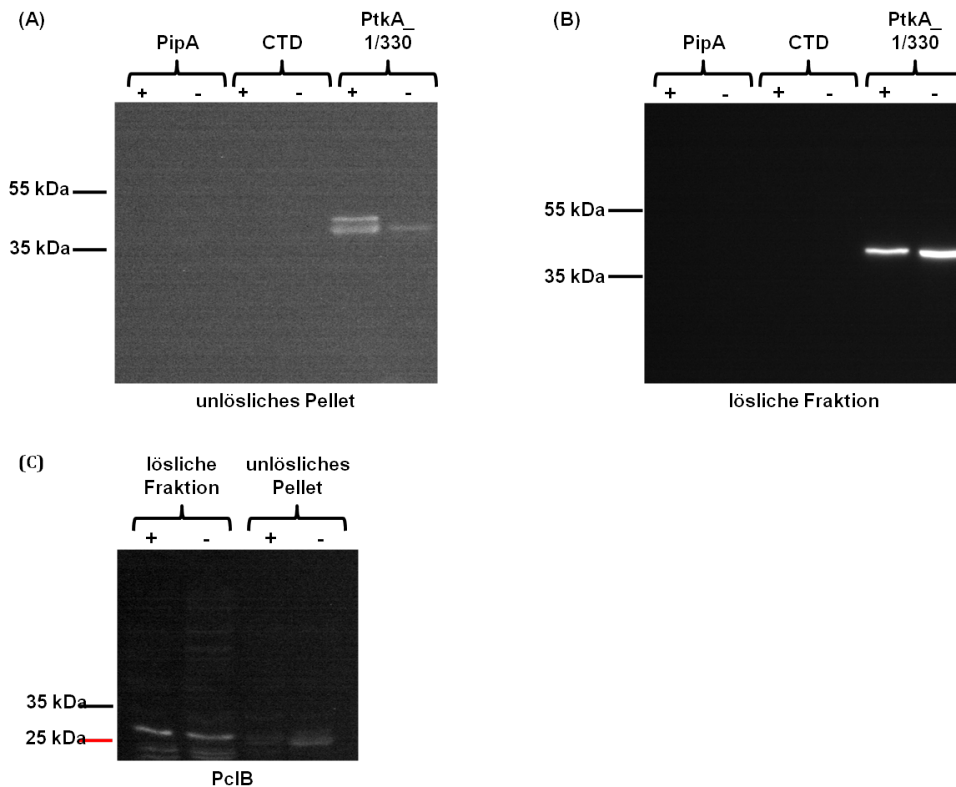
Nach dem durch Lokalisierungs- und Expressionsstudien eine Funktion der verschiedenen PtkA Interaktionspartner, während der asexuellen Entwicklung, nachgewiesen wurde, sollte eine mögliche Beteiligung von PtkA und der interagierenden Proteine bei der Aktivierung der Elongationsphase der Transkription untersucht werden. Dafür wurden die verschiedenen Proteine in *E. coli* exprimiert, um durch einen *in vitro* Kinase Assay die mögliche Veränderung des Phosphorylierungsstatus der carboxy terminalen Domäne (CTD) durch PtkA nachzuweisen, wodurch die Elongation gestartet wird.

### 3.8 Heterologe Expression und Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli*

PtkA ist homolog zu Kinasen in anderen Organismen, wie zum Beispiel Cdk9 (Kim et al, 2002; Lin et al, 2002) und Bur1 aus *S. cerevisiae* (Murray et al, 2001; Qiu et al, 2009). Da bekannt ist, dass diese Kinasen in der Regulierung der Transkription beteiligt sind, sollte die Funktion von PtkA in Bezug auf die Transkriptionskontrolle auch in *Aspergillus* untersucht werden. Es ist bekannt, dass Kinasen, welche zur Familie der Cdk9 gehören, für die Phosphorylierung der carboxy terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II verantwortlich sind (Bartkowiak & Greenleaf, 2011; Zhang et al, 2010). Um zu überprüfen, ob PtkA die gleiche Funktion in *A. nidulans* ausübt, sollte ein *in vitro* Kinase-Assay durchgeführt werden. Dafür sollte die CTD, PtkA und die Interaktionspartner in *E. coli* exprimiert werden, um eine hohe Proteinausbeute zu erzielen und spezifisch die mögliche Phosphorylierung der CTD durch PtkA und einen der Interaktionspartner nachweisen zu können.

#### 3.8.1 Expression von His-getaggten PtkA, CTD, PclB und PipA in *E. coli*

Um die CTD, PtkA und die Interaktionspartner PclB, sowie PipA in *E. coli* zu exprimieren wurde der Vektor pET28a verwendet. Dadurch wurden 6xHis-getaggte Fusionsproteine hergestellt. Die hergestellten Plasmide wurden in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert. Die Proteinexpression wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und über Nacht bei 30 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt, um diese aufzubrechen und die enthaltenen Proteine zu isolieren. Zum Nachweis der exprimierten Proteine und zur Untersuchung, ob das Protein in der löslichen oder unlöslichen Fraktion vorliegt, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Das Vorhandensein der Proteine wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen den His-Tag untersucht (Abb. 52). Es konnte gezeigt werden, dass weder die CTD noch PipA unter den verwendeten Bedingungen exprimiert werden konnten. Im Gegensatz dazu kann das mit einem His-Tag fusionierte verkürzte PtkA\_1/330 mit einer Größe von 37 kDa gebildet werden (Abb. 52 a und b). Jedoch ist nicht nur ein Signal in der mit IPTG induzierten Probe zu erkennen, sondern auch in der nicht induzierten Negativkontrolle. Des Weiteren ist nur in der unlöslichen Fraktion (Abb. 52 a) der mit IPTG induzierten Probe eine Doppelbande zu erkennen, aber nicht in der löslichen Fraktion (Abb. 52 b). Die Expression von PclB konnte ebenfalls aufgezeigt werden, wobei ein Signal in der löslichen und in der unlöslichen Fraktion zu erkennen ist. Genauso wie bei der Expression von PtkA, ist eine Bande bei der induzierten und bei der nicht induzierten Probe vorhanden (Abb. 52 c).

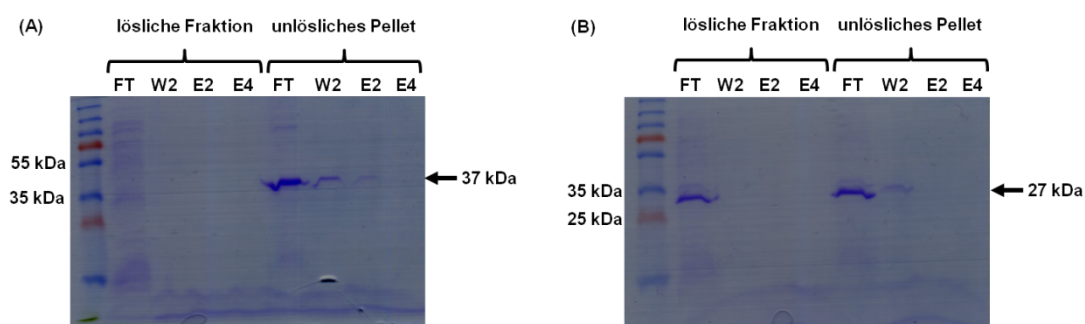


**Abbildung 52: Expression von His getaggtten PipA, PclB, CTD, PtkA\_1/545 und PtkA\_1/330.** Für die Expression His-getaggtter Proteine wurde der Expressionsvektor pET28a verwendet, in welchen die Gene *pipA*, die *ctd* und eine verkürzte Version von *ptkA* (*ptkA\_1/330*) kloniert wurden. Die hergestellten Plasmide wurden in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und über Nacht laufen gelassen. **(A und B)** Die erfolgreiche Expression der verschiedenen Proteine wurde mit Hilfe eines Western-Blots untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass weder die Expression von PipA noch die der CTD unter den verwendeten Bedingungen induziert werden konnte. PtkA\_1/330, mit einer Größe von 37 kDa, konnte exprimiert werden. Jedoch ist in der mit IPTG induzierten Probe (+), als auch in der nicht induzierten Probe (-) ein Signal zu erkennen. Des Weiteren erscheint eine Doppelbande für PtkA nach Induktion mit IPTG, jedoch nur in der unlöslichen Fraktion und nicht in der löslichen Fraktion. **(C)** Die Expression von PclB konnte, sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. Jedoch ist nicht nur nach Induktion mit IPTG (+), sondern auch ohne Induktion mit IPTG (-) eine Bande zu erkennen.

Da die Expression nur mit PclB und PtkA\_1/330 erfolgreich war, wurden beide Proteine mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen) aufgereinigt. Es konnte sowohl PclB (27 kDa), als auch PtkA\_1/330 (37 kDa) aufgereinigt werden, jedoch befindet sich nur ein Teil des aufgereinigten PclB in der löslichen Fraktion und der andere Teil in der unlöslichen Fraktion (Abb. 53 b). Das aufgereinigte PtkA\_1/330 befindet sich nur in der unlöslichen Fraktion, aus der löslichen Fraktion konnte kein Protein isoliert werden (Abb. 53 a). Da schon im Western-Blot in der unlöslichen Fraktion zwei Banden für PtkA\_1/330 erschienen sind, aber in der löslichen Fraktion nur eine Bande, scheint die Bande, welche in allen Fraktionen vorhanden ist ein unspezifisches Signal zu sein. Somit befindet sich PtkA\_1/330 nur in der unlöslichen Fraktion. Da die



Proteine nach der Aufreinigung für einen Kinase-Assay verwendet werden sollten, müssten die Proteine in der löslichen Fraktion vorliegen. Nur in diesem Fall kann eine Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, wodurch die natürliche Faltung der Proteine erhalten bleibt. Da die Proteine nur in der unlöslichen Fraktion vorliegen, müsste eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, wodurch die natürliche Faltung der Proteine zerstört wird. Aufgrund dessen wurden, in einem nächsten Schritt (Kapitel 3.8.2), die Proteine mit GST getaggt, um die Löslichkeit zu erhöhen und somit eine Aufreinigung unter natürlichen Bedingungen zu ermöglichen.



**Abbildung 53: Aufreinigung von His getaggttem PtkA\_1/330 (A) und PclB (B).** (A) Das verkürzte PtkA\_1/330 wurde mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Es wurden der Durchfluss (FT), der zweite Waschschrift (W2) und die Proben der zweiten und der vierten Elution (E2 und E4) von der Aufreinigung der löslichen und der unlöslichen Fraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt. Nach Entfärbung des Gels konnte PtkA\_1/330 (37 kDa) nachgewiesen werden, jedoch nur in der unlöslichen Fraktion. (B) PclB wurde ebenfalls mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung (siehe A) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Nach Entfärbung des Gels, konnte PclB (27 kDa) in der löslichen und in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden.

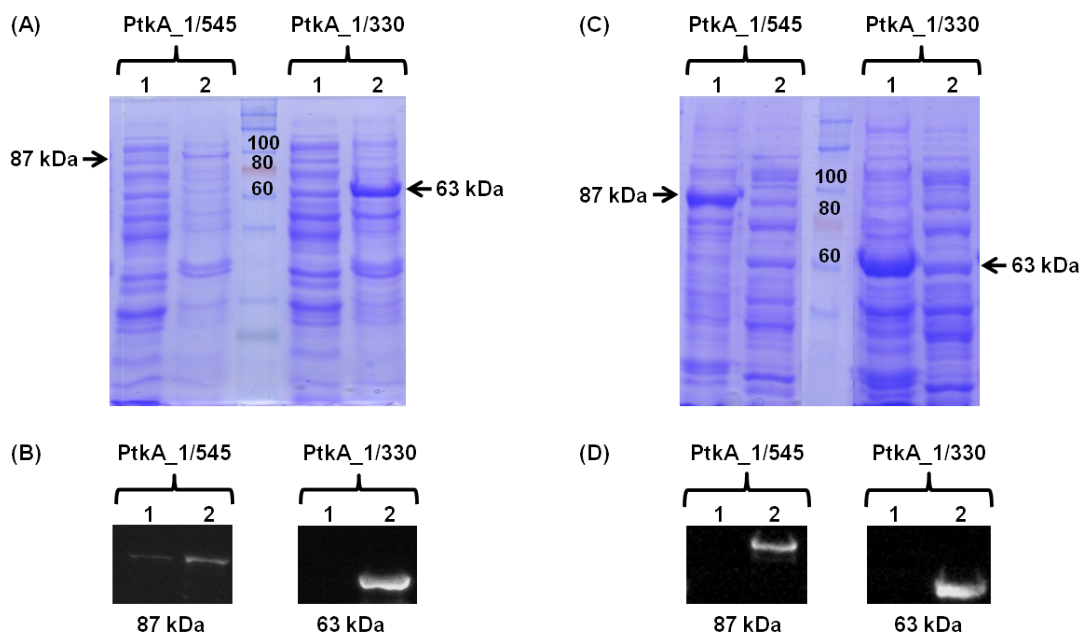
### 3.8.2 Expression von GST-getaggtten PtkA, CTD und PipA in *E. coli*

Da die Aufreinigung der His-getaggtten Proteine aufgrund deren Unlöslichkeit nicht erfolgreich war, wurden die Proteine mit GST getaggt, um die Löslichkeit zu erhöhen.

Dazu wurden die verschiedenen Gene in den Vektor pGEX4T kloniert und in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert. Es wurden verschiedene Temperaturen für die Induktion der Expression ausprobiert, um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen. Zuerst wurde über Nacht bei 28 °C und mit 0,5 mM IPTG induziert (Abb. 54 a und b). Das vollständige Protein (PtkA\_1/545) mit einer Größe von 87 kDa wird nur sehr schwach exprimiert, sowohl in der löslichen, als auch in der unlöslichen Fraktion (Abb. 54 a und b). Im Coomassie gefärbten SDS-Gel sind die

Banden für das mit GST getaggte PtkA\_1/545 nur sehr schwach zu erkennen (Abb. 54 a). Im Western-Blot wurde PtkA\_1/545 mit Hilfe eines GST-Antikörpers nachgewiesen. Es ist jeweils nur eine schwache Bande zu erkennen, wobei die Bande in der löslichen Fraktion schwächer ist als in der unlöslichen Fraktion (Abb. 54 b). Das verkürzte PtkA\_1/330 (63 kDa) wird stärker exprimiert, jedoch befindet sich das Protein erneut nur in der unlöslichen Phase und nicht in der löslichen (Abb. 54 a und b). Sowohl im Coomassie gefärbten SDS-Gel (Abb. 54 a), als auch im Western-Blot (Abb. 54 b) kann PtkA\_1/330 nur in der unlöslichen Phase detektiert werden.

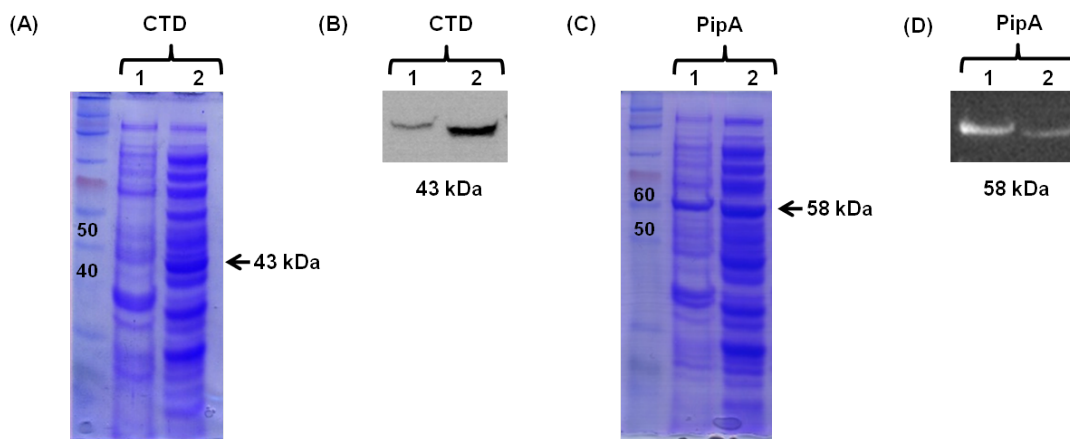
In einem weiteren Ansatz wurde die Temperatur zur Induktion der Expression verringert. Es wurde erneut mit 0,5 mM IPTG über Nacht induziert, jedoch bei nur 20 °C. Durch die Verringerung der Temperatur verbesserte sich die Expression von PtkA\_1/545 und PtkA\_1/330, als auch die Löslichkeit (Abb. 54 c und d). Im Coomassie gefärbtem SDS-Gel ist eine schwache Bande von PtkA in der unlöslichen Probe zu erkennen und eine stärkere Bande in der löslichen Probe (Abb. 54 c). Jedoch konnte im Western-Blot, unter Verwendung eines GST-Antikörpers, PtkA nur in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden und nicht in der löslichen Fraktion (Abb. 54 d).



**Abbildung 54: Expression von GST getaggten PtkA\_1/545 und PtkA\_1/330.** (A) Induktion der Expression von PtkA\_1/545 und PtkA\_1/330 mit 0,5 mM IPTG und bei 28 °C über Nacht. Die Spur 1 zeigt die lösliche Fraktion und die Spur 2 das unlösliche Pellet. PtkA\_1/545 wird nur sehr schwach exprimiert und PtkA\_1/330 liegt vor allem im unlöslichen Pellet vor. (B) Nachweis der PtkA-Expression mit Western-Blot und GST-Antikörpern. PtkA\_1/545 kann in der unlöslichen und der löslichen Fraktion nachgewiesen werden, wohingegen es für PtkA\_1/330 nur ein Signal in der unlöslichen Phase gibt. (C) Induktion der

Expression von PtkA\_1/545 und PtkA\_1/330 mit 0,5 mM IPTG und bei 20 °C über Nacht. Die Spur 1 zeigt die lösliche Fraktion und die Spur 2 das unlösliche Pellet. PtkA\_1/545 und PtkA\_1/330 werden beide exprimiert und liegen vor allem in der löslichen Fraktion vor. **(D)** Nachweis der PtkA-Expression mit Western-Blot und GST-Antikörpern. PtkA\_1/545 und PtkA\_1/330 können nur in der unlöslichen Phase nachgewiesen werden.

In einem weiteren Ansatz wurde die Expression von PipA und der CTD bei 20 °C mit 0,5 mM IPTG über Nacht induziert. Im Coomassie gefärbtem SDS-Gel ist eine Bande für die CTD in der unlöslichen Probe zu erkennen (Abb. 55 a). Im Western-Blot konnte mit einem GST-Antikörper die CTD vor allem in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden, aber auch in der löslichen Fraktion (Abb. 55 b). Die PipA Expression konnte im SDS-Gel und im Western-Blot, sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion gezeigt werden (Abb. 55 c und d).



**Abbildung 55: Expression von GST getaggtten PipA und der CTD.** **(A)** Induktion der Expression von PipA und der CTD mit 0,5 mM IPTG und bei 20 °C über Nacht. Die Spur 1 zeigt die lösliche Fraktion und die Spur 2 das unlösliche Pellet. Die CTD (43 kDa) liegt vor allem im unlöslichen Pellet vor und kann im Coomassie gefärbtem SDS-Gel nachgewiesen werden. **(B)** Nachweis der Expression der CTD mit Western-Blot und GST-Antikörpern. Die CTD kann in der unlöslichen und der löslichen Fraktion nachgewiesen werden, wobei die CTD hauptsächlich ein Signal in der unlöslichen Phase zeigt. **(C)** Induktion der Expression von PipA mit 0,5 mM IPTG und bei 20 °C über Nacht. Die Spur 1 zeigt die lösliche Fraktion und die Spur 2 das unlösliche Pellet. PipA (58 kDa) kann durch das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel in der löslichen und unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. **(D)** Nachweis der PtkA-Expression mit Western-Blot und GST-Antikörpern. Es ist vor allem ein Signal für PipA in der löslichen Phase zu erkennen, wobei auch ein geringer Anteil in der unlöslichen Phase nachweisbar ist.

Die Expression der verschiedenen in *E. coli* exprimierten Proteine müsste noch etwas optimiert werden, damit die Proteine aufgereinigt und für einen Kinase-Assay verwendet werden können. Dadurch könnte überprüft werden, ob PtkA in der Lage ist die CTD der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II zu phosphorylieren und dadurch die Transkription zu kontrollieren. Außerdem könnte herausgefunden werden, welcher Interaktionspartner dafür benötigt wird.

#### 4. Diskussion

Der Organismus *A. nidulans* wird vor allem für die Untersuchung der Mitose und der Entwicklung als Modell verwendet, da beide Prozesse in relativ kurzer Zeit ablaufen (Morris & Enos, 1992). Außerdem ist der Ablauf der Mitose mit der in höheren Eukaryoten vergleichbar, wodurch Erkenntnisse die aus *A. nidulans* gewonnen werden, auf höhere Organismen übertragen werden können. Die Entwicklung erfordert außerdem eine ausgereifte Koordination von Zellzyklus und Zellteilung. Während des vegetativen Hyphenwachstums entstehen mehrkernige Hyphen, welche sich durch polares Wachstum verlängern. Beim Übergang zur asexuellen Entwicklung muss der Zellzyklus an das Wachstum angepasst werden, da die asexuellen Strukturen durch Knospung und nicht mehr durch filamentöses Wachstum entstehen. Es werden die jeweils einkernigen Metulae, Phialiden und Konidien durch Knospung gebildet, wobei zuvor eine Mitose stattgefunden haben muss, um einen neuen Zellkern herzustellen, der in die gebildete Zelle einwandert. Eine weitere Herausforderung ist die Koordination der abweichenden Anzahl an Zellteilungen, da sich die gebildeten Metulae nur zweimal teilen, um die Phialiden hervorzubringen und die Phialiden wiederum mehrere Konidien herstellen (Adams et al, 1998; Boylan et al, 1987).

In *A. nidulans* ist für die Kontrolle der Entwicklung und der Ausbildung der verschiedenen Zelltypen eine Genkaskade verantwortlich. Am Anfang der Genkaskade steht der Transkriptionsfaktor *brlA*, der für den Beginn der Konidiophoren-Bildung verantwortlich ist. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass *brlA* für die Aktivierung von *nimX<sup>cdc2</sup>* verantwortlich ist. *NimX<sup>cdc2</sup>* ist eine zu Cdc2 homologe Kinase und ist für die Regulierung des Zellzyklus verantwortlich. Da *brlA*, in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium, *nimX<sup>cdc2</sup>* aktiviert, wird von einer Kopplung der Entwicklung und des Zellzyklus ausgegangen (Ye et al, 1999).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Interaktionspartner der Zyklin-abhängigen Kinase PtkA identifiziert und untersucht. Die mit Hilfe eines Yeast two-hybrid Screens gefundenen Interaktionen wurden durch BiFC Analysen bestätigt, wobei herausgefunden wurde, dass PtkA in verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung mit anderen Proteinen interagiert. Es wurden bereits die Zyklone *pclA* und *pchA* isoliert, welche mit *ptkA*, in den vegetativ gebildeten Hyphen miteinander interagieren (Bathe et al, 2010). In dieser Arbeit wurde ein weiteres Zyklin, *pclB*, sowie eine Serin/Threonin-Kinase, *pjpA*, isoliert. Beide interagieren mit *ptkA*, jedoch ausschließlich in den Metulae und Phialiden der asexuell gebildeten Konidiophoren. Durch Herstellung von Deletionsmutanten und Expressionsanalysen, konnte auf die Funktion der

unterschiedlichen Interaktionspartner während der asexuellen Entwicklung geschlossen werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Deletion der Gene unterschiedliche Phänotypen hervorruft, wodurch vermutet werden kann, dass PtkA die verschiedenen Interaktionspartner, für die Kontrolle unterschiedlicher Entwicklungsabläufe benötigt. Von PtkA ist bekannt, dass es trotz fehlender NLS im Zellkern lokalisiert, wodurch vermutet werden kann, dass PtkA einen Interaktionspartner benötigt, um in den Zellkern zu gelangen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass PtkA während der Mitose den Zellkern verlässt (Bathe et al, 2010). Dies wurde auch für die RNA-Polymerase II nachgewiesen (Napolitano et al, 2002; Son & Osmani, 2009), was auf eine Verringerung der Transkriptionsaktivität während der Mitose schließen lässt (Karos & Fischer, 1996). Aufgrund dessen wird eine Rolle von PtkA in der Transkriptionskontrolle vermutet, wodurch die Entwicklung an die Modulation der Transkription entwicklungsabhängiger Gene gekoppelt wäre.

#### **4.1 PtkA - eine essentielle Kinase – verantwortlich für verschiedene Schritte der Entwicklung**

PtkA ist eine Zyklin-abhängige Kinase, welche zur Familie der Cdk9 gehört. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass PtkA mit einem Zyklin der Pcl-Familie interagiert, PclA (Schier, 2001). PclA ist ein Zyklin, welches eine Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus hat, da es in der S-Phase exprimiert wird und mit der Kinase NimX<sup>cdc2</sup> interagiert, welche der Hauptzellzyklusregulator in *A. nidulans* ist (Schier & Fischer, 2002). Darüber hinaus hängt die Expression von den Transkriptionsfaktoren *brlA* und *abaA* ab, welche entwicklungsabhängig reguliert werden.

Da PtkA mit einem Zyklin interagiert, welches sowohl eine Funktion in der Entwicklung als auch in der Zellzykluskontrolle hat, kann davon ausgegangen werden, dass PtkA für die Koordination dieser Prozesse verantwortlich ist. Eine ähnliche Funktion wurde bereits für die Kinase NimX<sup>cdc2</sup> nachgewiesen, welche den Zellzyklus reguliert und gleichzeitig entwicklungsabhängige Funktionen, wodurch nachgewiesen wurde, dass eine Interaktion zwischen Regulatoren der Entwicklung und des Zellzyklus notwendig ist (Ye et al, 1999).

Darüber hinaus wird für PtkA eine Rolle in der Transkriptionskontrolle vermutet, da PtkA zur Familie der Cdk9 gehört, welche in anderen Organismen für ihre Transkriptionskontrolle bekannt sind (Marshall et al, 1996; Peng et al, 1998b). Diese Vermu-

tung wird weiterhin dadurch unterstützt, dass PtkA den Zellkern während der Mitose verlässt, da während der Mitose die Transkription verhindert wird und PtkA somit nicht mehr dafür benötigt wird (James et al, 1996; Sievers et al, 2005). Dies würde eine Kopplung der Transkription spezifischer Gene an die Entwicklung bedeuten.

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Interaktionspartner von PtkA isoliert, welche ebenfalls eine Funktion in der Regulierung der Entwicklung einnehmen und ein Interaktionspartner, welcher zur Familie der T Zykline gehört, die für ihre Funktion in der Transkription bekannt sind (De Luca et al, 2002).

#### **4.2 PipA wird für die asexuelle Entwicklung und das polare Wachstum vegetativer Hyphen benötigt**

PipA gehört zu den Serin/Threonin Kinasen und besitzt dementsprechend alle wichtigen konservierten Domänen, die eine Kinase ausmachen. Es sind zu PipA homologe Kinasen in anderen filamentösen Pilzen bekannt, die jedoch bisher noch nicht beschrieben wurden. Die homologe Kinase aus *S. cerevisiae* ist Bud32. Die Deletion von Bud32 verursacht eine allgemeine Verschlechterung der Überlebensrate während der stationären Phase und beeinträchtigt sowohl das Zellwachstum, als auch die Sporulation (Lopreiato et al, 2004). Des Weiteren ist die Zelle zu keinen meiotischen Teilungen in der Lage und es wird eine Veränderung der Zellwand hervorgerufen (Briza et al, 2002; Facchin et al, 2002a). Für Bud32 wurde zusätzlich eine Rolle in der Regulation der Transkription beschrieben. Die dazu homologe Kinase PipA in *A. nidulans* interagiert mit PtkA, für die ebenfalls eine Funktion während der Transkription vermutet wird. Diese Interaktion zwischen PipA und PtkA verstärkt noch einmal die Theorie, dass PtkA eine Rolle in der Transkription einnehmen könnte.

Durch Expressionsstudien mit *pipA*, wurde festgestellt, dass *pipA* sowohl während des vegetativen Wachstums, als auch während der asexuellen Entwicklung exprimiert wird (Kapitel 3.4; Abb. 31). Es sind leichte Schwankungen der Expression während der asexuellen Entwicklung zu erkennen, die Expression nimmt beim Übergang vom vegetativen Wachstum zur asexuellen Entwicklung (5 h) leicht ab und steigt dann im Laufe der Entwicklung wieder an und erreicht ein Plateau nach 9-11 h Wachstum. Dieses Expressionsmuster wurde durch mikroskopische Untersuchun-

gen bestätigt, da PipA sowohl in den Zellkernen und dem Zytoplasma der Hyphen und der Konidiophoren nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.3.2; Abb. 30).

Die Interaktion mit PtkA konnte dagegen nur in den Konidiophoren gezeigt werden und nicht in den Hyphen (Kapitel 3.2.2; Abb. 23 und 24), dies lässt darauf schließen, dass PipA zusammen mit PtkA nur eine Rolle während der asexuellen Entwicklung spielt. In anderen Organismen wurde bereits nachgewiesen, dass die zu PtkA homologe Kinase Cdk9 unterschiedlich stark während der Entwicklung und auch in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird (Bagella et al, 1998; Oqani et al, 2011).

Außerdem konnte die Interaktion, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden. PtkA besitzt keine Kernlokalisierungssequenz, wodurch man eine Lokalisierung von PtkA im Zytoplasma vermuten würde. Jedoch kann PtkA zum Großteil im Zellkern nachgewiesen werden, mit nur einer schwachen Präsenz im Zytoplasma. Dies kann dadurch erklärt werden, dass PtkA wahrscheinlich seine Interaktionspartner verwendet, um die Lokalisierung in der Zelle zu verändern. Da PipA eine Kernlokalisierungssequenz besitzt, könnte die Interaktion mit PtkA, die Lokalisierung von PtkA im Zellkern ermöglichen. Dieser Wechsel der Lokalisierung von Mitgliedern der Cdk9 Familie konnte bereits in anderen Organismen nachgewiesen werden (Napolitano et al, 2002; Napolitano et al, 2003). Es konnte mit Hilfe von Immunostaining mit spezifischen Cdk9-Antikörpern eine Lokalisierung von Cdk9 im Zytoplasma und im Zellkern aufgezeigt werden. Um den Export von Cdk9 aus dem Kern in das Zytoplasma zu überprüfen, wurden die Zellen mit LMB (ein Streptomyces Metabolit) behandelt, welches den Export von Proteinen mit einem Zellkernexportsignal verhindert. Dadurch wurde der Export von Cdk9 verhindert und bewiesen, dass Cdk9 zwischen Zellkern und Zytoplasma wandern kann (Harper et al, 1993).

Die Kontroverse zwischen permanenter Expression von PipA, aber auf die asexuelle Entwicklung beschränkte Interaktion mit PtkA, lässt sich dadurch erklären, dass Gene welche für die asexuelle Entwicklung verantwortlich sind und in hohen Konzentrationen während der Sporulation nachgewiesen werden, häufig noch andere Funktionen für das normale Wachstum oder für Stoffwechselwege erfüllen und deshalb auch in vegetativen Zellen nachgewiesen werden können (Adams et al, 1998; Navarro et al, 1996). Somit kann vermutet werden, dass PipA zusammen mit PtkA eine Funktion in der Regulierung der asexuellen Entwicklung einnimmt, PipA gleichzeitig aber noch andere Aufgaben während des vegetativen Wachstums besitzt.

Einen weiteren Hinweis für die Erfüllung anderer Funktionen von PipA während des vegetativen Wachstums gab der veränderte Phänotyp von Hyphen (Kapitel 3.5; Abb. 34), bei denen die PipA Expression vermindert wurde oder eine Überexpression hervorgerufen wurde. Dafür wurde ein Stamm verwendet, welcher nach homologer Rekombination ein verkürztes und inaktives *pipA* unter der Kontrolle des natürlichen Promotors besaß und das vollständige *pipA* Gen unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors. Durch Reprimierung der *pipA* Expression waren die Hyphen nicht mehr in der Lage gerade zu wachsen, sondern zeigten ein stark kurvig Wachstum. Durch Überexpression veränderte sich der Phänotyp leicht, in dem die Hyphen zwar weiterhin kurvig wuchsen, jedoch die Kurven ausschweifender waren. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Bud32 ein Teil des EKC/KEOPS Komplexes ist (Hecker et al, 2008). Dieser Komplex ist wichtig für die Lokalisierung von Bud9, welches für die Polarität der Zelle benötigt wird. Somit kann vermutet werden, dass PipA während des vegetativen Wachstums eine Rolle im polaren Wachstum einnimmt (Kato et al, 2011).

Die Veränderung der Expression von *pipA* mit Hilfe des *alcA*-Promotors führte nicht nur zu einem abnormalen Phänotyp der Hyphen, sondern auch zu einer Veränderung der asexuellen Entwicklung (Kapitel 3.5; Abb. 33 und 36). Durch Reprimierung des *alcA*-Promotors wurde die Expression von PipA weitestgehend eingestellt, wodurch Kolonien mit einer verminderten Anzahl an Konidiophoren und gleichzeitig erhöhter Produktion an Luftmyzel entstanden. Die gebildeten Konidiophoren wiesen einen normalen Phänotyp, im Vergleich zum Wildtyp, auf. Da die Konidiophorenbildung nur teilweise inhibiert ist, könnte *pipA* eine zusätzliche Rolle bei der Aktivierung der Genkaskade für die asexuelle Entwicklung spielen. Für die Kontrolle der Genkaskade, während der asexuellen Entwicklung, wird *fluG* (Lee & Adams, 1996; Seo et al, 2006) und die *flb* Gene benötigt (Garzia et al, 2010; Kwon et al, 2010; Lee & Adams, 1994). *FluG* führt zur Aktivierung von *flbA*, *flbC* und *flbE-flbD-flbB*, wodurch im Anschluss *brlA* aktiviert wird (Adams et al, 1998). Eine Deletion von *flbA* führt zur Ausbildung eines *fluffy* Phänotyps mit ausgeprägten Hyphenwachstum und zur Aktivierung von *fadA*, wodurch die Hyphen nach wenigen Tagen Wachstum autolysieren (Shin et al, 2009; Yu et al, 1996a). Die Deletion der anderen *flb* Gene führt ebenfalls zur Ausbildung eines *fluffy* Phänotyps, jedoch findet keine Autolyse der Hyphen statt, sondern es werden nach verlängerter Inkubation Konidiophoren ausgebildet (Garzia et al, 2009; Kwon et al, 2010). Somit könnte PipA eine Rolle in der Regulierung der *flb* Gene spielen, da eine Verminderung der *pipA* Expression zu vermehrten Hyphenwachstum und eingeschränkter Konidiophoren-bildung führt.



Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von *pipA* zu einer kompletten Inhibierung der Konidiophorenentwicklung, da nur noch Luftmyzel ausgebildet wird. Außerdem kommt es zur Autolyse der Kolonie nach etwa drei Tagen Wachstum. Dieser Phänotyp entspricht dem der *flbA* Deletionsmutante (Lee & Adams, 1994). *FlbA* wird für die Hemmung von *fadA* benötigt, findet keine Hemmung statt, dann wird durch äußere Wachstumssignale das inaktive FadA-GDP in das aktive FadA-GTP umgewandelt. Die aktive Form von *fadA* führt wiederum zu einer Hemmung der durch *brlA* aktivierten Genkaskade und zur Autolyse des gebildeten Myzels (Yu et al, 1996b). Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass *pipA* in der Regulierung von *flbA* eine Rolle spielt. Die Überexpression von *pipA* führt möglicherweise zu einer Hemmung der *flbA* Expression, wodurch *fadA* aktiviert wird und es zur Autolyse der gebildeten Hyphen kommt.

Möglicherweise wird PipA als negativer Regulator der *flb* Gene benötigt, in dem es die Expression kontrolliert und dient gleichzeitig selbst der Aktivierung von *brlA*. Durch Überexpression von *pipA* könnte die Expression der *flb* Gene gehemmt werden, wodurch *fluffy* Mutanten entstehen, die nach einiger Zeit die Autolyse einleiten. Durch Reprimierung der *pipA* Expression könnten die *flb* Gene exprimiert werden, gleichzeitig fehlt *pipA* für die Aktivierung von *brlA*, wodurch die Konidiophorenproduktion eingeschränkt ist. Ob *pipA* wirklich für die Kontrolle der Genkaskade durch Regulierung der Expression der *flb* Gene oder *brlA*, verantwortlich ist müsste noch näher untersucht werden.

Die Deletion von *pipA* war bislang nicht möglich. Beim Versuch *pipA* zu deletieren, wurde ein diploider Stamm gebildet. Nach verschiedenen Versuchen den Stamm zu haploidisieren konnte immer noch das *pipA* Gen nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass *pipA* ein essentielles Gen ist, welches nicht deletiert werden kann.

#### **4.3 PclB wird für die Funktion anderer Zyklone während der Entwicklung benötigt**

Das Zyklin PclB wurde, aufgrund seiner Homologie zu Pcl7 aus *S. cerevisiae*, der Familie der Pcl-Zyklone zugeordnet. Es besitzt eine Zyklin Domäne und eine Cdk Phosphorylierungsstelle, welche in Substraten von Zyklin-abhängigen Kinasen vorkommen. Des Weiteren besitzt PclB eine PEST-Domäne, sowie eine Destruction Box. Beide Domänen sind vor allem aus Zyklonen bekannt, da diese Domänen ein

Kennzeichen für die Ubiquitinierung von Proteinen und deren anschließenden Abbau durch die Proteasomen darstellen (Hochstrasser, 1995). Zyklone sind für ihre Eigenschaft als Zellzyklusregulatoren bekannt, weshalb diese nur zeitlich begrenzt exprimiert werden und die gebildeten Proteine nach Erfüllung ihrer Aufgabe wieder abgebaut werden (Evans et al, 1983). Die PEST-Domäne zeichnet sich durch eine Region aus, die reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) ist (Rechsteiner & Rogers, 1996). Die Destruction Box wurde zuerst bei B Zyklonen entdeckt (Glutzer et al, 1991) und zeichnet sich durch die konservierte R-X-X-L Domäne aus. Da PclB, die für ein Zyklon, charakteristischen Domänen aufweist und über einen Yeast two-hybrid Test als Interaktionspartner einer Zyklon-abhängigen Kinase identifiziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass PclB ebenfalls die Aufgaben eines Zyklons erfüllt.

Da die Expression von *pc1B* während des Zellzyklus nicht untersucht wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob *pc1B* eine Funktion während des Zellzyklus besitzt. Jedoch wurde bereits *pc1A*, ein weiteres Mitglied der Pcl-Familie, in *A. nidulans* beschrieben. Dieses Pcl-Zyklon wird spezifisch während der S-Phase exprimiert, weshalb angenommen werden kann, dass *pc1B* ebenfalls abhängig vom Zellzyklus reguliert wird (Schier et al, 2001). In *S. cerevisiae* konnte auch eine vom Zellzyklus abhängige Regulierung der Expression von Pcl7 gezeigt werden (Lee et al, 2000). Um diese Vermutung zu bestätigen müsste noch die Regulierung der Expression von *pc1b* während des Zellzyklus untersucht werden.

Die Expression von *pc1B* während der asexuellen Entwicklung wurde untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass *pc1B* in vegetativen Hyphen exprimiert wird und die Expression zu Beginn der asexuellen Entwicklung wieder abfällt (Kapitel 3.4; Abb. 31). Nach 9-11 h der asexuellen Entwicklung erreicht die Expression von *pc1B* ein Plateau und fällt anschließend wieder ab. Damit konnte gezeigt werden, dass *pc1B* entwicklungsabhängig exprimiert wird und hauptsächlich während des vegetativen Wachstums und zum Zeitpunkt der Metulae und Phialiden Entstehung eine Rolle spielt. Dieses Expressionsmuster konnte durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Für *pc1A* konnte auch eine entwicklungsabhängige Expression gezeigt werden, wobei die Expression von *pc1A* während des vegetativen Wachstum kaum nachweisbar ist und die Expression während der asexuellen Entwicklung ansteigt und seinen Höhepunkt zum Zeitpunkt der Sporenbildung erreicht (Schier et al, 2001).

PclB konnte sowohl während des vegetativen Wachstums, als auch während der asexuellen Entwicklung im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen werden

(Kapitel 3.3.1; Abb. 27). Die Interaktion mit der Zyklin-abhängigen Kinase PtkA konnte jedoch nur in den Metulae und den Phialiden der Konidiophoren gezeigt werden. Diese Limitierung der Interaktion lässt darauf schließen, dass PclB zusammen mit PtkA eine Rolle in der Regulierung der späteren asexuellen Entwicklung hat. Da PclB keine Zellkernlokalisierungssequenz besitzt, sondern nur ein Zellkernexportsignal, wird PclB möglicherweise für den Export von PtkA aus dem Zellkern benötigt. Die Lokalisierung von PclB in den vegetativ gebildeten Hyphen könnte bedeuten, dass PclB nicht nur eine Funktion in der asexuellen Entwicklung zusammen mit PtkA hat, sondern auch noch mit anderen Kinasen interagiert, um weitere Prozesse zu regulieren. Das homologe Zyklin Pcl7 aus *S. cerevisiae* interagiert mit der Kinase Pho85 und wird für die Wahrnehmung des Phosphatlevels aus der Umgebung benötigt und somit für die Regulierung der Expression von Phosphatase-Genen (Lee et al, 2000). In *A. nidulans* ist das zu *pho85* homologe *phoA* Gen bekannt (Bussink & Osmani, 1998). PhoA wird nicht für die Aktivierung von Phosphatase-Genen benötigt, sondern es reguliert in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration die Entwicklung. Dies könnte bedeuten, dass *pclB* mit *phoA* interagiert und dadurch für die Regulierung weiterer Entwicklungsschritte verwendet wird. Um dies zu untersuchen, müsste eine Doppeldeletionsmutante von *pclB* und *phoA* hergestellt werden.

Die Deletion von *pclB*, sowie die Veränderung der Überexpression mit Hilfe des *alcA* Promotors führte zu keiner Änderung des Phänotyps, wodurch angenommen werden kann, dass *pclB* alleine keine essentielle Rolle einnimmt (Kapitel 3.5 Abb. 32 und Kapitel 3.6.1 Abb. 37).

Jedoch führt die gleichzeitige Deletion von verschiedenen Zyklinen zu einer Verstärkung des Phänotyps, welche durch die einzelne Deletion hervorgerufen wurde (Kapitel 3.6.4 Abb. 42 und 43). Der *pclB*-Deletionsstamm besitzt keinen offensichtlichen Phänotyp, der Stamm zeigt die Ausbildung normaler Konidiophoren und produziert während einer Wachstumsphase von 72 h etwa genauso viele Sporen wie der Wildtyp. Der *pclA*-Deletionsstamm weist eine etwas stärkere Verringerung der Sporenproduktion im Vergleich zum Wildtyp auf, dies ist auch durch die geringere Grünfärbung der Kolonie zu erkennen. Gleichzeitig zeigen die Konidiophoren keine Veränderung im Phänotyp. Sobald jedoch beide Zykline gleichzeitig deletiert sind, verändert sich der Phänotyp, in dem der bei der *pclA* Deletionsmutante bereits sichtbare Phänotyp, verstärkt wird. Die Doppelmutante produziert deutlich weniger Sporen als die *pclA* Deletionsmutante und zeigt dementsprechend eine verminderte Grünfärbung der Kolonie. Für das PclA Protein ist bereits bekannt, dass es zusammen mit einer Zyklin-abhängigen Kinase für die Regulation von Zellzyklusvorgängen

während der Sporenbildung verantwortlich ist (Schier, 2001). Da PclA und PclB beide mit der Kinase PtkA interagieren, werden vermutlich beide Zykline für die Funktion der Kinase und somit für die Sporenbildung benötigt. Die Doppeldeletionsmutante weist zusätzlich zur verringerten Sporenproduktion auch einen veränderten Phänotyp der Konidiophoren auf. Die Konidiophore besteht aus einer verringerten Anzahl an Metulae und Phialiden, sowie einer verminderten Anzahl an Sporen. Da der Phänotyp an das Aussehen von Konidiophoren einer *apsA* Deletionsmutante erinnerte und dieser Phänotyp durch eine Störung in der Kernverteilung hervorgerufen wird, kann eine ähnliche Ursache auch den Phänotyp der *pclA-pclB*-Deletionsmutante verursachen (Fischer & Timberlake, 1995). Insbesondere da bekannt ist, dass *pclA* an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist und für *pclB* eine Rolle im Zellzyklus vermutet werden kann.

Für den Doppeldeletionsstamm von *pclB* und *pchA* kann eine ähnliche Aussage getroffen werden wie für den *pclA-pclB*-Deletionsstamm, da die Deletion beider Zykline zu einer Verstärkung des Phänotyps der *pchA* Deletion führt. Der *pchA* Deletionsstamm ist kaum überlebensfähig und bildet sehr kompakte Kolonien aus. Die Konidiophoren haben ein verändertes Aussehen mit vergrößerten Metulae und fehlender Sporenproduktion (Bathe et al, 2010). Durch die zusätzliche Deletion von *pclB* wird die Konidiophoren-Bildung eingestellt und der Stamm ist nur noch in der Lage Hyphen auszubilden.

Da bereits gezeigt wurde, dass *pclA* durch *brlA* und *abaA* reguliert wird, könnte auch die Regulierung der *pclB* Expression von diesen Entwicklungsgenen abhängen. Da drei mögliche Bindestellen von *brlA* und vier mögliche Bindestellen von *abaA* im Promotorbereich von *pclB* gefunden wurden, könnte die Expression tatsächlich durch *brlA* oder *abaA* reguliert werden. Diese Vermutung müsste jedoch durch Experimente, mit einer veränderten Expression von *brlA* und deren Auswirkungen auf die *pclB* Expression untersucht werden.

#### **4.4 PchA hat eine wichtige Funktion für das normale Wachstum und die Konidiophoren Bildung**

Durch eine Suche nach T Zyklinen in *A. nidulans*, mit Hilfe von BLAST, wurde PchA identifiziert. Es ist bekannt, dass T Zykline einen Komplex mit Cdk9 ausbilden und für die Kontrolle der Transkription, sowie der Entwicklung verantwortlich sind

(Bagella et al, 1998; Kohoutek et al, 2009; Ni et al, 2008). Außerdem konnten verschiedene T Zykline T1, T2a und T2b (De Luca et al, 2002), sowie ein K Zyklin als Cdk9 Interaktionspartner isoliert werden, wobei auch das K Zyklin für die Transkriptionskontrolle, zusammen mit Cdk9, benötigt wird (Fu et al, 1999). In *A. nidulans* konnte nur PchA als homologes Zyklin zu den T und K Zyklinen, mit Hilfe einer BLAST-Suche identifiziert werden.

Die Deletion von PchA verursacht einen starken Phänotyp (Kapitel 3.6.3 Abb. 41). Der Pilz kann nur noch sehr langsam wachsen und bildet aufgrund dessen sehr kleine Kolonien aus. Außerdem ist die asexuelle Entwicklung gestört, da hauptsächlich Hyphen gebildet werden und die wenigen vorhandenen Konidiophoren können nur einige vergrößerte Metulae, aber keine Sporen ausbilden.

Des Weiteren wurde die Expression von *pchA* während der Entwicklung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass *pchA* relativ konstant während der gesamten Entwicklung exprimiert wird. Dies könnte darauf hindeuten, dass *pchA* während der gesamten Wachstumszeit eine Funktion hat, wodurch auch der extreme Phänotyp der Deletion erklärt werden kann. Außerdem wird durch die konstante Expression von *pchA* die Zugehörigkeit zu den T Zyklinen untermauert, da aus anderen Organismen bekannt ist, dass T Zykline für die Kontrolle der Transkription benötigt werden und somit immer benötigt werden.

Sowohl in *C. elegans* (Shim et al, 2002), als auch in menschlichen Zellen konnte nachgewiesen werden (Garriga et al, 2010), dass der Komplex aus Cdk9 und T Zyklin für die Expression verschiedener Gene während der Entwicklung verantwortlich ist. Aufgrund des sehr schlechten Wachstums der PchA Deletionsmutante, kann auch in *A. nidulans* eine Rolle des PchA/PtkA-Komplexes in der transkriptionellen Kontrolle verschiedener entwicklungsabhängiger Gene vermutet werden. PtkA hat noch andere Interaktionspartner, mit einer möglichen Funktion in der Transkriptionskontrolle. Dies könnte erklären, warum der PchA Deletionsstamm keine letale Wirkung hat. Möglicherweise übernehmen die anderen Interaktionspartner zusammen mit PtkA die Kontrolle der Transkription weiterer Gene.

Ob PtkA zusammen mit den verschiedenen bekannten Partnern tatsächlich eine Funktion in der Regulierung der Transkription spielt, müsste weiter untersucht werden. Dafür könnte ein *in vitro* Kinase Assay mit PtkA, den verschiedenen Zyklinen und der CTD der RNA-Polymerase II durchgeführt werden. Da bekannt ist, dass Cdk9 für die Phosphorylierung der CTD der RNA-Polymerase II und somit für den Start der Elongationsphase verantwortlich ist, könnte mit einem Kinase Assay untersucht werden, ob PtkA auch in *A. nidulans* die CTD phosphoryliert. Die dafür benö-

tigten aufgereinigten Proteine wurden bereits teilweise in *E. coli* exprimiert und könnten für den Kinase Assay weiter verwendet werden (Kapitel 3.8).

#### **4.5 Die Veränderung konservierter Domänen in PtkA führt zu einem Verlust der normalen Lokalisierung und der Fähigkeit zur Interaktion**

PtkA gehört zu den Serin/Threonin-Kinasen und besitzt dementsprechend alle konservierten Domänen, welche für die Funktion einer Kinase benötigt werden. Um die Wichtigkeit der verschiedenen konservierten Domänen zu testen, wurden diese einzeln deletiert oder verändert (Kapitel 3.7). Dabei konnte festgestellt werden, dass jede Veränderung eines konservierten Restes zum Verlust der Zellkernlokalisierung von PtkA führte (Napolitano et al, 2003).

In der konservierten Glyzin-reichen Region, mit der Erkennungssequenz G-X-G-X-X-G, wurde das erste und das zweite Glyzin durch ein Alanin ersetzt. Die Glyzin-Reste dienen der korrekten Positionierung des  $\gamma$ -Phosphats von ATP und der Bindung von ATP. In dem Stamm, welcher das veränderte PtkA getaggt mit GFP besitzt, konnte gezeigt werden, dass durch Veränderung der konservierten Domänen, die Lokalisierung von PtkA aus den Zellkernen in das Zytoplasma verschoben ist. Da keine Aussparung der Zellkerne zu erkennen ist, lokalisiert ein Teil von PtkA immer noch im Zellkern, aber der Großteil befindet sich im Zytoplasma. Bei anderen Kinasen, wie der Kinase des Insulin-Rezeptors, wurde gezeigt, dass die Veränderung der Glyzin-Domäne zu einer Verringerung der Kinase-Aktivität führt, was wahrscheinlich durch die Zerstörung der ATP-Bindestelle hervorgerufen wird (Odawara et al, 1989).

In der ALK-Domäne wurde das Lysin gegen ein Glutamin ausgetauscht, wodurch sich ebenfalls die Lokalisierung von PtkA vom Zellkern in Richtung Zytoplasma verschiebt. Es ist bekannt, dass das Lysin für den Phosphattransfer von ATP auf ein Substrat benötigt wird, und dass die Veränderung des Restes diese Phosphatübertragung verhindert (Carrera et al, 1993). Des Weiteren wird die Umsatzrate der Kinase verringert, wodurch wiederum die Aktivität der Kinase eingeschränkt wird.

Die PITALRE Sequenz, welche der Zyklin-Bindung dient wurde vollständig entfernt. Diese Domäne dient zusammen mit dem Lysin des ALK-Motivs der ATP-Bindung und ist ein fester Bestandteil, der nicht variabel ist. Auch die Deletion der PITALRE Sequenz führt zu einer Verschiebung der Lokalisierung von PtkA aus dem Zellkern

hauptsächlich in das Zytoplasma. Da die Zyklin-Bindung ebenfalls für die katalytische Aktivität einer Kinase verantwortlich ist und durch die Deletion der Zyklin-Bindedomäne die Bindung von Interaktionspartnern verhindert wird, könnte dies ein Grund für die veränderte Lokalisierung sein (Napolitano et al, 2003).

Als nächstes wurde die Wichtigkeit des Aspartats von DMKAAN untersucht, in dem das Aspartat gegen ein Glyzin ausgetauscht wurde. Das Aspartat dient der Stabilisierung der richtigen Position der Hydroxyl-Gruppe der Kinase und erleichtert die Substratfreilassung nach der Phosphatübertragung. Der Austausch des Aspartats führt möglicherweise zu einer Destabilisierung der Kinase und somit zu einer Verringerung der Aktivität.

Als letztes wurde das Aspartat der DFG-Domäne gegen ein Alanin ausgetauscht. Das Aspartat dient auch der Übertragung des Phosphats und der Bindung des Magnesiums von ATP. In Hefe hat der Austausch des Aspartats gegen Alanin eine letale Wirkung (Gibbs & Zoller, 1991). Da der Austausch wiederum zu einer Veränderung der Lokalisierung von PtkA führt, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Veränderung der DFG-Domäne eine Deaktivierung von PtkA herbeigeführt wird.

Die verschiedenen konservierten Motive sind alle für die ATP-Bindung oder die Stabilisierung der ATP-, sowie Zyklin-Bindung verantwortlich. Da diese somit für die Aktivität der Kinase benötigt werden, kann vermutet werden, dass die Deletion des konservierten Restes zu einem Verlust der Kinaseaktivität führt, welche eine Veränderung der Lokalisierung nach sich zieht (Napolitano et al, 2003).

Als erstes wurden die Auswirkungen der Veränderung konservierter Reste auf die Lokalisierung von PtkA untersucht. Als nächstes wurde die Interaktionsfähigkeit der Kinase, mit veränderten konservierten Resten, mit den bekannten Interaktionspartnern untersucht. Dafür wurden verschiedene Yeast two-hybrid Versuche durchgeführt (Kapitel 3.7.2). Durch Kotransformation wurde der Hefestamm AH109 jeweils mit einem Plasmid, welches eines der Interaktionspartner enthielt und einem anderen Plasmid mit einem veränderten PtkA-Konstrukt, transformiert. Durch Ausbringen und Wachstum der erhaltenen Kolonien auf Selektionsmedium (SD-Leu-Trp) konnte die Aufnahme beider Plasmide nachgewiesen werden. Durch replika-plattieren auf Selektionsmedium (TDO), welches für die Selektion auf Interaktion benötigt wird, konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der verschiedenen konservierten Region keine Interaktion mehr möglich ist. Diese Ergebnisse stimmen mit der Veränderung der eigentlichen Lokalisierung von PtkA durch Abänderung der kon-

servierten Domänen überein. Da der Austausch der konservierten Aminosäuren wahrscheinlich zu einem Verlust der Kinaseaktivität und zu einer Strukturänderung des Proteins führt, geht die Fähigkeit zur Interaktion verloren.

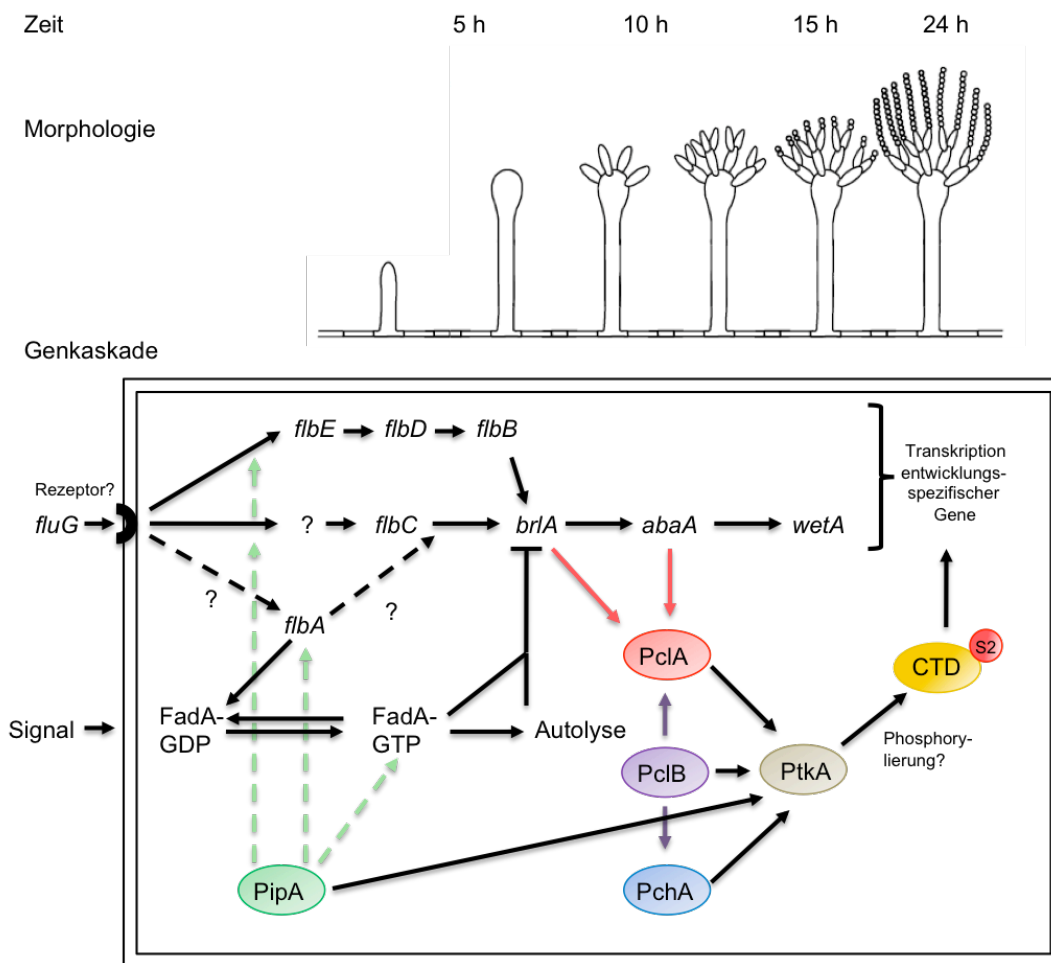
#### 4.6 Abhängigkeit der Entwicklung von verschiedenen Genen – möglicherweise im Zusammenspiel mit der Feinkontrolle der Transkription

Die Kontrolle der Entwicklung in *A. nidulans* ist ein komplexer Prozess, welcher von der Expression einer großen Anzahl von verschiedenen Genen abhängt. Die Entwicklung wird durch den Ablauf einer Genkaskade reguliert. Für die Aktivierung dieser Kaskade wird zu Beginn *fluG*, für die Aufnahme äußerer Signal, benötigt. Durch die Aktivierung von *fluG* werden die *fluffy* Gene exprimiert, welche wiederum *brlA* aktivieren. *BrlA* wird für den Start der Konidiophorenentwicklung benötigt und aktiviert die Gene *abaA* und *wetA*, welche für die Ausbildung der Metulae, Phialiden und Sporen wichtig sind.

Durch die Identifizierung weiterer Gene, deren Deletion oder veränderte Expression zu einer Störung der asexuellen Entwicklung führen, kann die bisher bekannte Genkaskade erweitert werden (Abb. 56). Durch die Suche nach Interaktionspartnern der Kinase PtkA wurden die Gene *pclA*, *pclB*, *pchA* und *pipA* identifiziert. Für *pclA* konnte bereits eine Rolle in der Regulierung der Sporenproduktion nachgewiesen werden, sowie eine Aktivierung der Expression durch *brlA* und *abaA* (Schier et al, 2001). Das Zyklin *pclB*, welches zur gleichen Familie der Zykline wie *pclA* gehört, wird ebenfalls für die asexuelle Entwicklung benötigt, jedoch spielt es nur eine Rolle zusammen mit den anderen Zyklinen *pclA* und *pchA*. *PclB* wird zusammen mit *pclA* für die Sporenbildung gebraucht, da eine Deletion von beiden Zyklinen zu einer weiteren Verringerung der Sporenproduktion führte. Zusammen mit *pchA* wird *pclB* für den Start der Konidiophorenbildung benötigt, da eine Deletion von beiden Zyklinen die Konidiophorenentstehung verhinderte und nur noch Hyphen gebildet wurden. Für *pchA* konnte ebenfalls eine wichtige Funktion während des Wachstums gezeigt werden, da die Deletion die Ausbildung von Konidiophoren verminderte und die gebildeten Konidiophoren vergrößerte Metulae aufwiesen und keine Sporen mehr ausbildeten. *PipA* scheint zu Beginn der asexuellen Entwicklung nötig zu sein, da die Überexpression einen *fluffy*-Phänotyp mit Autolyse aufwies und die Reprimierung der Expression zu einer Verringerung der Konidiophoren-Produktion führte.



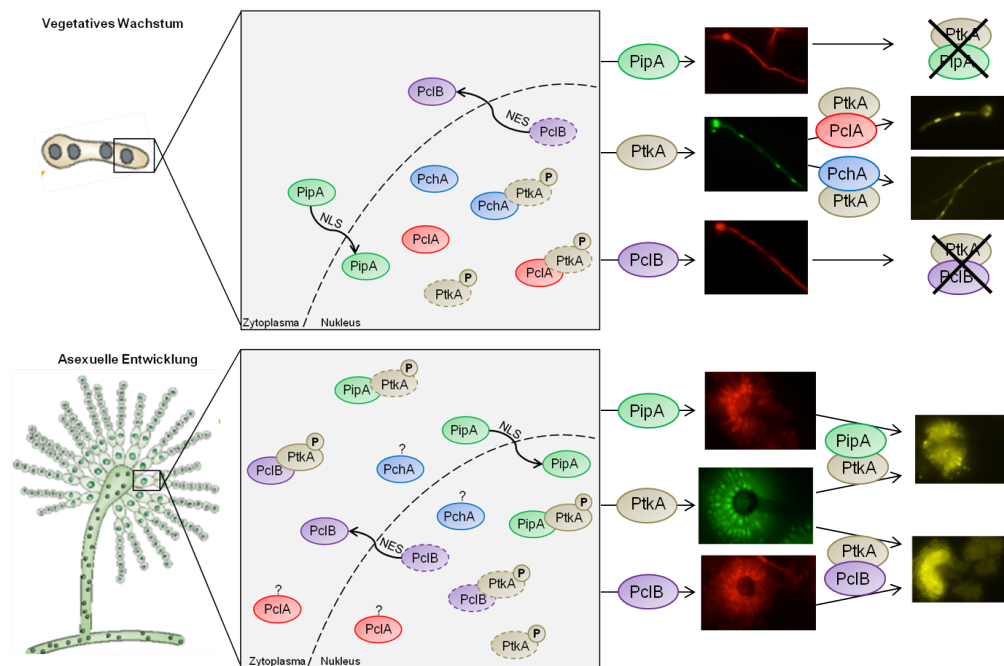
Da die Interaktionspartner von PtkA zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung mit PtkA interagieren und in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung eine Rolle spielen, kann vermutet werden, dass die Interaktionspartner für die Aktivierung von PtkA zu bestimmten Zeiten der Entwicklung benötigt werden. Für PtkA wird eine Rolle in der Phosphorylierung der CTD der RNA-Polymerase II und somit in der Regulierung der Transkription vermutet wird. Somit könnten die Interaktionspartner PtkA zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktivieren, wodurch diese die Transkription entwicklungsabhängiger Gene aktiviert und dadurch die asexuelle Entwicklung fortschreiten kann.



**Abbildung 56: Mögliche Rolle von PtkA und der verschiedenen Interaktionspartner in der Regulierung der asexuellen Entwicklung.** Aufgrund der erhaltenen Phänotypen durch eine veränderte Expression von *pipA*, kann eine Rolle von *pipA* in der Regulierung der *flb*-Gene oder von *fadA* vermutet werden (in grün dargestellt). Von *PclA* (in rot dargestellt) ist bereits bekannt, dass es eine Rolle während der asexuellen Entwicklung spielt und durch *brlA* und *abaA* reguliert wird (Schier, 2001). *PclB* (in lila dargestellt) spielt, wahrscheinlich zusammen mit *pclA* und *pchA*, eine Rolle während der asexuellen Entwicklung. Da eine Deletion von *pchA* zur Verringerung der Konidiophorenproduktion und zum Ausbleiben der

Sporenbildung führte, kann eine Rolle von *pchA* während der Bildung der Phialiden und Sporen vermutet werden. Aufgrund der Homologie von PtkA zu Cdk9, wird vermutet, dass PtkA für die Phosphorylierung von Serin 2 der CTD (orange) der großen Untereinheit der RNA-Polymerase benötigt wird. Da alle gefundenen Interaktionspartner in der Regulierung der asexuellen Entwicklung involviert sind und mit PtkA interagieren, das wahrscheinlich eine Funktion in der Transkription einnimmt, wird eine Verknüpfung der Entwicklung mit der Transkription vermutet (Adams et al, 1998).

Neben den unterschiedlichen Funktionen der gefundenen Zyklone und Kinasen, konnte auch eine unterschiedliche Verteilung der Proteine in der Zelle, sowie abweichende Interaktionsorte mit PtkA nachgewiesen werden. Während des vegetativen Hyphenwachstums konnte sowohl PipA als auch PclB im Zytoplasma und in den Zellkernen nachgewiesen werden. Diese Lokalisierung kann durch das Vorhandensein einer NLS in der Sequenz von PipA und einer NES in der Sequenz von PclB erklärt werden, wodurch ein Wechsel der Proteine zwischen Zytoplasma und Zellkern ermöglicht werden könnte. Jedoch fand keine Interaktion mit PtkA in den Hyphen statt. In den Zellkernen der Hyphen interagierten nur die Zyklone PclA und PclB mit PtkA. PtkA lokalisierte, trotz fehlender NLS, im Zellkern. Dies könnte durch eine Interaktion mit einem anderen Protein erklärt werden, welches dabei hilft PtkA in den Zellkern zu bringen. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Lokalisierung ist die Aktivität von PtkA, da diese ebenfalls die Lokalisierung beeinflussen könnte. Während der asexuellen Entwicklung konnte wiederum PclB und PipA im Zytoplasma und im Kern der Metulae und Phialiden nachgewiesen werden, wohingegen PtkA vor allem in den Zellkernen lokalisierte. Die Interaktion von PtkA mit PclB und PipA findet in den Zellkernen und im Zytoplasma statt. Dadurch kann vermutet werden, dass die Interaktion mit PclB oder PipA die Aktivierung von PtkA einleitet und dadurch auch einen Wechsel zwischen Zytoplasma und Zellkern ermöglicht (Abb. 57).



**Abbildung 57: Überblick über die Lokalisierung und Interaktion von PtkA, sowie seinen Interaktionspartnern während der Entwicklung.** PipA (grün) besitzt eine NLS und PclB (lila) eine NES. Beide lokalisierten im Zytoplasma und im Zellkern. PtkA (braun) lokalisierte, trotz fehlender NLS, hauptsächlich im Zellkern und interagierte dort mit PclA und PchA, die eine NLS besitzen und im Zellkern lokalisierten. Für die richtige Lokalisierung von PtkA wird die Aktivität der Kinase benötigt, was durch Phosphorylierung geschieht. In den Konidiophoren lagen PclB und PipA in den Zellkernen und im Zytoplasma vor, wohingegen PtkA vor allem in den Zellkernen vorkam. In den Konidiophoren konnte auch eine Interaktion mit PipA und PclB gezeigt werden. Ob dort auch PclA und PchA mit PtkA interagieren ist unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Hinweise erhalten, dass die asexuelle Entwicklung nicht nur von der Transkriptionskontrolle der Entwicklungsgene durch stadienspezifische Transkriptionsfaktoren, sondern wahrscheinlich auch durch eine Modulation der Transkriptionsmaschinerie reguliert wird.

## 5. Material & Methoden

### 5.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Kits stammten von den Firmen Roth (Kallsruhe), Applichem (Darmstadt), Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich (Seelze), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt) und Fermentas (St. Leon-Rot).

### 5.2 Verwendete Organismen und Kultivierung

#### 5.2.1 Verwendete Stämme von *A. nidulans* und Kultivierung

Die *A. nidulans* Stämme wurden auf oder in Minimalmedium kultiviert. *A. nidulans* Voll- und Minimalmedien wurden je nach Bedarf an Auxotrophiemarkern mit Vitaminen, Aminosäuren, Nukleotiden und für Transformationsexperimente mit osmoprotektiven Substanzen (Tabellen 1 und 2) komplementiert. Für die unterschiedliche Expression von Proteinen, unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors, wurde 2 % Threonin (Induzierung), 2 % Glycerin (Dereprimierung) oder 2 % Glukose (Reprimierung) dem Medium zugesetzt. Als Standard Kohlenstoffquelle wurde 2 % Glukose verwendet. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben im Schüttler bei 180 rpm über Nacht inkubiert. Bei Festmedien wurde zusätzlich 1,5 % Agar eingewogen. Die Pilzkulturen wurden, falls nicht anders vermerkt, bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 1: Medien für *A. nidulans***

| Anzuchtsmedium               | Zusammensetzung (bezogen auf 1 Liter Medium)   |
|------------------------------|--|
| Minimalmedium                | 50 ml Salzstammlösung; 1 ml Spurenelemente-lösung; 20 g Glukose oder 20 g Threonin + 2 g Glukose oder 20 g Glycerin + 2 g Glukose (Induktion oder Dereprimierung des <i>alcA</i> -Promotors)<br>pH-Wert mit 10 N NaOH auf 6,5 einstellen<br>zur Regeneration von Protoplasten wurde 44 g KCl (0,6 M) verwendet                                   |
| Spurenelementelösung (1000x) | 22 g ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 5 g MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O; 5 g FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 1,6 g CoCl <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O; (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O; 50 g Na <sub>4</sub> EDTA; mit 4 N KOH-Lösung auf pH 6,5-6,8 einstellen |
| Salzstammlösung (20x)        | 120 g NaNO <sub>3</sub> ; 10,4 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 30,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |

Tabelle 2: Supplemente für Auxotrophien in *A. nidulans*

| Substanz                   | Konzentration der Stammlösung     | Menge in 1 Liter Medium |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Arginin</i>             | 500 mM (100 x ); sterilfiltrieren | 10 ml                   |
| <i>p</i> -Aminobenzoesäure | 0,1 % (1000 x ); autoklavieren    | 1 ml                    |
| <i>Pyridoxin-HCL</i>       | 0,1 % (1000 x ); autoklavieren    | 1 ml                    |
| <i>Uracil</i>              | ---                               | 1 g                     |
| <i>Uridin</i>              | 500 mM (100 x ); sterilfiltrieren | 10 ml                   |

Tabelle 3: Verwendete *A. nidulans* Stämme

| Stamm  | Genotyp   | Herkunft/Referenz                          |
|--------|---|--|
| FGSCA4 | Glasgow wild type (veA+)  | Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA |
| TN02A3 | <i>pyrG89; pyroA; argB2; nkuA::argB; veA1</i>   | Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA |
| GR5    | <i>pyrG89; wA3; pyroA; veA1</i>   | G. May, Houston, USA                       |
| RMSO11 | <i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1</i>  | (Stringer et al, 1991)                     |
| SKC7   | Kreuzung von SSNI30 ( <i>pyrG89; pyroA; pclA::argB</i> ) mit RMSO11   | Diese Arbeit                               |
| SKC9   | TN02A3 transformiert mit pFB1888 ( <i>pchA::pyro</i> Deletionskonstrukt) <i>pyrG89; pyroA4; nkuA::argB; pchA::pyroA; veA1</i> | Diese Arbeit                               |
| SKC13  | TN02A3 transformiert mit pKC24 ( <i>alcA(p)::gfp::pipA177::pyro</i> )   | Diese Arbeit                               |
| SKC15  | TN02A3 transformiert mit pKC35 ( <i>alcA(p)::gfp::pclB197::pyro</i> )   | Diese Arbeit                               |
| SKC17  | GR5 transformiert mit pKC31 ( <i>alcA(p)::gfp::pipA::pyro</i> )   | Diese Arbeit                               |
| SKC18  | GR5 transformiert mit pKC32 ( <i>alcA(p)::gfp::pclB::pyro</i> )   | Diese Arbeit                               |
| SKC19  | GR5 transformiert mit pKC39 ( <i>alcA(p)::n-yfp::pipA::pyro</i> ) und pFB13 ( <i>alcA(p)::c-yfp::ptkA::pyr4</i> )             | Diese Arbeit                               |

|       |   |              |
|-------|---|--------------|
| SKC20 | GR5 transformiert mit<br>pKC38 ( <i>alcA(p)::n-yfp::pclB::pyro</i> ) und<br>pFB13 ( <i>alcA(p)::c-yfp::ptkA::pyr4</i> )                 | Diese Arbeit |
| SKC27 | TN02A3 transformiert mit<br>pKC46 ( <i>pipA(p)::pipA::gfp::pyrG</i> )   | Diese Arbeit |
| SKC28 | TN02A3 transformiert mit<br>pKC51 ( <i>pclB(p)::pclB::gfp::pyrG</i> )   | Diese Arbeit |
| SKC29 | TN02A3 transformiert mit<br>pKC54 ( <i>pipA(p)::pipA::n-yfp::pyrG</i> ) und<br>pKC53 ( <i>ptkA(p)::ptkA::c-yfp::pyro</i> )              | Diese Arbeit |
| SKC30 | TN02A3 transformiert mit<br>pKC52 ( <i>pclB(p)::pclB::n-yfp::pyrG</i> ) und<br>pKC53 ( <i>ptkA(p)::ptkA::c-yfp::pyro</i> )              | Diese Arbeit |
| SKC34 | <i>TN02A3 transformiert mit pKC37<br/>(pclB::pyrG Deletionskonstrukt)<br/>pyrG89; pyroA4; nkuA::argB; pclB::pyrG;<br/>veA1</i>          | Diese Arbeit |
| SKC40 | Kreuzung von SKC9 und SKC34   | Diese Arbeit |
| SKC41 | Kreuzung von SKC7 und SKC34   | Diese Arbeit |
| SKC44 | GR5 transformiert mit<br>pKC66 ( <i>alcA(p)::gfp::ptkA_D173A::pyro</i> )  | Diese Arbeit |
| SKC45 | GR5 transformiert mit<br>pKC71 ( <i>alcA(p)::gfp::ptkA_D155G::pyro</i> )  | Diese Arbeit |
| SKC46 | GR5 transformiert mit<br>pKC64 ( <i>alcA(p)::gfp::ptkA_PITALRE::pyro</i> )  | Diese Arbeit |
| SKC49 | <i>TN02A3 transformiert mit<br/>pKC36 (pipA::pyrG Deletionskonstrukt)<br/>pyrG89; pyroA4; nkuA::argB; pipA::pyrG;<br/>veA1; diploid</i> | Diese Arbeit |
| SKC50 | GR5 transformiert mit<br>pKC70 ( <i>alcA(p)::gfp::ptkA_GAGA::pyro</i> )   | Diese Arbeit |
| SKC51 | GR5 transformiert mit<br>pKC65 ( <i>alcA(p)::gfp::ptkA_K54Q::pyro</i> )   | Diese Arbeit |
| SKC72 | GR5 transformiert mit<br>pKC56 ( <i>alcA(p)::mrfp::pclB::pyr4</i> ) und<br>pKC1886 ( <i>alcA(p)::gfp::ptkA::pyro</i> )                  | Diese Arbeit |
| SKC73 | GR5 transformiert mit<br>pKC55 ( <i>alcA(p)::mrfp::pipA::pyr4</i> ) und<br>pFB1886 ( <i>alcA(p)::gfp::ptkA::pyro</i> )                  | Diese Arbeit |

Tabelle 4: Liste der *A. nidulans* Auxotrophie Marker

| Defektes Gen   | Funktion   | Chromosom |
|----------------|--|-----------|
| <i>argB</i>    | Arginin-Synthese (Ornithin-Carbamoyltransferase)             | III       |
| <i>pabaA1</i>  | <i>p</i> -Aminobenzoesäure-Synthese                          | I         |
| <i>pyrG89</i>  | Uracil-Auxotrophie (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase)      | I         |
| <i>pyroA4</i>  | Pyridoxin-Auxotrophie  | IV        |
| <i>trpC801</i> | Tryptophan-Auxotrophie (Phosphoribosylanthranilat Isomerase) | VII       |
| <i>wA3</i>     | Weißer Konidiosporen (Polyketidsynthase)                     | II        |
| <i>yA2</i>     | Gelbe Konidiosporen (Laccase)                                | I         |

### 5.2.2 Bestimmung der Sporenzahl

Zur Bestimmung der Sporenzahl eines *A. nidulans* Stammes wurden Sporensuspensionen hergestellt. Von den Sporensuspensionen wurden jeweils  $1 \cdot 10^6$  Sporen, auf neuen Agarplatten, gleichmäßig ausgebracht. Zum Zeitpunkt für die Bestimmung der gebildeten Sporenmenge, wurde mit Hilfe der Rückseite einer blauen Pipettenspitze aus verschiedenen Stellen der Agarplatte ein Agarblock ausgestanzt. Dieser wurde in ein Eppendorfgefäß mit einer Lösung aus 0,85 % NaCl und 0,02 % Tween 20 überführt. Die Proben wurden für 20 min. auf einem 68 °C Heizblock geschüttelt, um die Sporen gleichmäßig vom Agar abzulösen. Die Anzahl der gebildeten Sporen wurde anschließend durch auszählen bestimmt.

### 5.2.3 Verwendete Stämme von *E. coli* und Kultivierung

Die verwendeten *E. coli* Kulturen wurden bei 37 °C aerob inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm in Erlenmeyerkolben angezogen. Festmedien wurden mit 15 g Agar pro Liter Medium versetzt. Hitze empfindliche Lösungen wie Antibiotika wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren den Medien zugegeben.

Tabelle 5: Verwendete *E. coli* Stämme

| Stamm         | Genotyp  | Herkunft/Referenz         |
|---------------|--|---------------------------|
| Top 10F       | <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i><br><i>φ80lacZΔM15ΔlacX74 nupG recA1 araD139</i><br><i>Δ(ara-leu)7697galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>)</i><br><i>endA1 χ</i> | Invitrogen<br>(Karlsruhe) |
| BL21<br>(DE3) | <i>F ompT gal dcm lon hsdSB(rB<sup>mB</sup>) λ(DE3</i><br><i>[lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>   | Invitrogen<br>(Karlsruhe) |

Tabelle 6: Medien für *E. coli*

| Anzuchtsmedium     | Zusammensetzung (bezogen auf 1 Liter Medium)   |
|--------------------|--|
| Luria Bertani (LB) | 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7.0  |
| SOC                | 20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl;<br>2,03 g MgCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 2,46 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 3,6 g Glu-<br>kose |

Tabelle 7: Antibiotika für *E. coli* Medien

| Antibiotikum | Endkonzentration |
|--------------|------------------|
| Ampicillin   | 100 µg/ml        |
| Kanamycin    | 50 µg/ml         |

### 5.2.3 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae* und Kultivierung

Die verwendeten *S. cerevisiae* Kulturen wurden bei 30 °C aerob inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 180-230 rpm in Erlenmeyerkolben angezogen. Festmedien wurden mit 20 g Agar pro Liter Medium versetzt.

Tabelle 8: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme

| Stamm | Genotyp   | Referenz            |
|-------|---|---------------------|
| AH109 | <i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52,</i><br><i>his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 ::</i><br><i>GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-</i><br><i>GAL2TATA-ADE2, URA3 :: MEL1UAS-</i><br><i>MEL1TATA-lacZ, MEL1</i> | (James et al, 1996) |



|       |  |                      |
|-------|--|----------------------|
| Y187  | <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>met-</i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>URA3 : : GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ</i> , <i>MEL1</i> | (Harper et al, 1993) |
| YKC1  | AH109 transformiert mit pKC3 ( <i>ptkA_1/545</i> in pGBT9)   | Diese Arbeit         |
| YKC3  | AH109 transformiert mit pKC6 ( <i>ptkA_24/170</i> in pGBKT7)   | Diese Arbeit         |
| YKC23 | Y187 transformiert mit pKC19 ( <i>pclB</i> in pGADT7-Rec)  | Diese Arbeit         |
| YKC25 | Y187 transformiert mit pKC22 ( <i>pipA</i> in pGADT7-Rec)  | Diese Arbeit         |
| YKC30 | AH109 transformiert mit pKC59 ( <i>ptkA_K54Q</i> in pGBT9) und   | Diese Arbeit         |
| YKC31 | AH109 transformiert mit pKC57( <i>ptkA_GAGA</i> in pGBT9)  | Diese Arbeit         |
| YKC32 | AH109 transformiert mit pKC60 ( <i>ptkA_PITALRE</i> in pGBT9)  | Diese Arbeit         |
| YKC33 | AH109 transformiert mit pKC45 ( <i>ptkA_D155G</i> in pGBT9)  | Diese Arbeit         |
| YKC34 | AH109 transformiert mit pKC61 ( <i>ptkA_D173A</i> in pGBT9)  | Diese Arbeit         |
| YKC35 | AH109 transformiert mit pKC59 ( <i>ptkA_K54Q</i> in pGBT9) und pKC22 ( <i>pipA</i> in pGADT7-Rec)  | Diese Arbeit         |
| YKC36 | AH109 transformiert mit pKC57( <i>ptkA_GAGA</i> in pGBT9) und pKC22 ( <i>pipA</i> in pGADT7-Rec)   | Diese Arbeit         |
| YKC37 | AH109 transformiert mit pKC60 ( <i>ptkA_PITALRE</i> in pGBT9) und pKC22 ( <i>pipA</i> in pGADT7-Rec)   | Diese Arbeit         |
| YKC38 | AH109 transformiert mit pKC45 ( <i>ptkA_D155G</i> in pGBT9) und pKC22 ( <i>pipA</i> in pGADT7-Rec)   | Diese Arbeit         |
| YKC39 | AH109 transformiert mit pKC61( <i>ptkA_D173A</i> in pGBT9) und pKC22 ( <i>pipA</i> in pGADT7-Rec)  | Diese Arbeit         |
| YKC40 | AH109 transformiert mit pKC59 ( <i>ptkA_K54Q</i> in pGBT9) und pKC19 ( <i>pclB</i> in pGADT7-Rec)  | Diese Arbeit         |

|       |  |              |
|-------|--|--------------|
| YKC41 | AH109 transformiert mit pKC57( <i>ptkA_GAGA</i> in pGBT9) und pKC19 ( <i>pcIB</i> in pGADT7-Rec)     | Diese Arbeit |
| YKC42 | AH109 transformiert mit pKC60 ( <i>ptkA_PITALRE</i> in pGBT9) und pKC19 ( <i>pcIB</i> in pGADT7-Rec) | Diese Arbeit |
| YKC43 | AH109 transformiert mit pKC45 ( <i>ptkA_D155G</i> in pGBT9) und pKC19 ( <i>pcIB</i> in pGADT7-Rec)   | Diese Arbeit |
| YKC44 | AH109 transformiert mit pKC61( <i>ptkA_D173A</i> in pGBT9) und pKC19 ( <i>pcIB</i> in pGADT7-Rec)    | Diese Arbeit |
| YKC45 | AH109 transformiert mit pKC59 ( <i>ptkA_K54Q</i> in pGBT9) und pKC10 ( <i>pchA</i> in pGADT7-Rec)    | Diese Arbeit |
| YKC46 | AH109 transformiert mit pKC57( <i>ptkA_GAGA</i> in pGBT9) und pKC10 ( <i>pchA</i> in pGADT7-Rec)     | Diese Arbeit |
| YKC47 | AH109 transformiert mit pKC60 ( <i>ptkA_PITALRE</i> in pGBT9) und pKC10 ( <i>pchA</i> in pGADT7-Rec) | Diese Arbeit |
| YKC48 | AH109 transformiert mit pKC45 ( <i>ptkA_D155G</i> in pGBT9) und pKC10 ( <i>pchA</i> in pGADT7-Rec)   | Diese Arbeit |
| YKC49 | AH109 transformiert mit pKC61( <i>ptkA_D173A</i> in pGBT9) und pKC10 ( <i>pchA</i> in pGADT7-Rec)    | Diese Arbeit |
| YKC50 | AH109 transformiert mit pKC59 ( <i>ptkA_K54Q</i> in pGBT9) und pKC8 ( <i>pcIA</i> in pGADT7-Rec)     | Diese Arbeit |
| YKC51 | AH109 transformiert mit pKC57( <i>ptkA_GAGA</i> in pGBT9) und pKC8 ( <i>pcIA</i> in pGADT7-Rec)      | Diese Arbeit |
| YKC52 | AH109 transformiert mit pKC60 ( <i>ptkA_PITALRE</i> in pGBT9) und pKC8 ( <i>pcIA</i> in pGADT7-Rec)  | Diese Arbeit |
| YKC53 | AH109 transformiert mit pKC45 ( <i>ptkA_D155G</i> in pGBT9) und pKC8 ( <i>pcIA</i> in pGADT7-Rec)    | Diese Arbeit |
| YKC54 | AH109 transformiert mit pKC61( <i>ptkA_D173A</i> in pGBT9) und pKC8 ( <i>pcIA</i> in pGADT7-Rec)     | Diese Arbeit |

Tabelle 9: Medien für *S. cerevisiae*

| Stamm     | Genotyp  |
|-----------|--|
| YPDA      | 10 g Pepton; 5 g Hefe Extrakt; 30 mg Adenin-Hemisulfat; pH 6,5; 50 ml einer steril filtrierten 40% Glucose-Lösung (nach dem Autoklavieren) |
| SD-Medium | 6,9 g Yeast Nitrogen Base w/o amino acids; 100 ml 10x DO-Lösung; 20 g Glucose; pH 5,8  |

Tabelle 10: Zusammensetzung der verschiedenen 10x DO-Lösungen

| 10x DO-Lösung        | Zusammensetzung pro Liter   |
|----------------------|---|
| DO-Leu               | 200 mg L-Adenin-Hemisulfat; 200 mg L-Arginin HCl; 200 mg L-Histidine HCl Monohydrat; 300 mg L-Isoleucin; 300 mg L-Lysin HCl; 200 mg L-Methionin; 500 mg L-Phenylalanin; 2 g L-Threonin; 200 mg L-Tryptophan; 300 mg L-Tyrosin; 200 mg L-Uracil; 1.5 g L-Valin |
| DO-Trp               | 200 mg L-Adenin-Hemisulfat; 200 mg L-Arginin HCl; 200 mg L-Histidine HCl Monohydrat; 300 mg L-Isoleucin; 1 g L-Leucin; 300 mg L-Lysin HCl; 200 mg L-Methionin; 500 mg L-Phenylalanin; 2 g L-Threonin; 300 mg L-Tyrosin; 200 mg L-Uracil; 1.5 g L-Valin        |
| DO-Leu-Trp           | 200 mg L-Adenin-Hemisulfat; 200 mg L-Arginin HCl; 200 mg L-Histidine HCl Monohydrat; 300 mg L-Isoleucin; 300 mg L-Lysin HCl; 200 mg L-Methionin; 500 mg L-Phenylalanin; 2 g L-Threonin; 300 mg L-Tyrosin; 200 mg L-Uracil; 1.5 g L-Valin                      |
| DO-Leu-Trp-His (TDO) | 200 mg L-Adenin-Hemisulfat; 200 mg L-Arginin HCl; 300 mg L-Isoleucin; 300 mg L-Lysin HCl; 200 mg L-Methionin; 500 mg L-Phenylalanin; 2 g L-Threonin; 300 mg L-Tyrosin; 200 mg L-Uracil; 1.5 g L-Valin   |

### 5.3 Molekularbiologische Methoden

#### 5.3.1 Gelelektrophorese, DNA-Restriktion und Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %-ige Agarosegele mit 0,5x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA) hergestellt. Als Größenstandard diente der Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Rot) oder der 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt). Die Gele wurden etwa 15 min. in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in TAE) geschwenkt, um anschließend die

DNA-Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) sichtbar machen und zu photographieren.

Falls nötig, wurden DNA-Fragmente mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) aufgereinigt.

Restriktionsverdauungen wurden in 10 µl Ansätzen durchgeführt. Die Ansätze enthielten etwa 0,3-1 µl (5-100 U/µl) des jeweiligen Restriktionsenzymes. Die Zusammensetzung der Ansätze und die Reaktionstemperatur entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Die Ansätze wurden je etwa 1-2 Stunden inkubiert. Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt) oder Fermentas (St. Leon-Rot).

Für die Durchführung von Klonierungen wurde die DNA wie zuvor beschrieben geschnitten, auf ein Gel aufgetragen und anschließend aus diesem eluiert. Mit der geschnittenen Insert- und Vektor-DNA wurden Ligationen über Nacht bei 16 °C oder bei Raumtemperatur für 1 h mit Hilfe der T4-Ligase der Firma New England Biolabs (Frankfurt) durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor zu Insert lag bei jeder Ligation bei 1:3.

Für Zwischenklonierungen wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Leek, NL), mit dem Vektor pCR2.1-TOPO, oder das CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas), mit dem Vektor pJET1.2/blunt Cloning Vector, nach Herstellerangaben verwendet. Wurden für die TOPO-Klonierungen PCR-Produkte verwendet, welche mit der *Pfu*-Polymerase (Fermentas) oder der Phusion-Polymerase (Finnzymes Reagents) hergestellt wurden, dann wurde mit der *Taq*-Polymerase (New England Biolabs) und einem Überschuss von 100 µM dATP, durch Inkubation für 15 min. bei 72 °C, A-Überhänge an das Amplifikat gehängt.

### 5.3.2 PCR und verwendete Oligonucleotide

PCR-Reaktionen wurden entweder mit der *Pfu*-, *Taq*- oder Phusion-Polymerase durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Die PCR-Standardreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 200 µM dNTPs und 0,2 µM Primern angesetzt. Das PCR-Protokolle wurde nach den Herstellerangaben für die jeweiligen Polymerasen durch-

geführt, wobei das Protokoll entsprechend der Größe des PCR-Produktes und der Schmelztemperatur der Primer angepasst wurde.

Für die Herstellung von Sonden für den Southern-Blot, wurde der PCR-Ansatz 1 µl des DIG Probe Synthesis Mix aus dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) zugefügt.

PCR-Produkte wurden mit dem DNA clean & concentrator Kit (Zymo) aufgereinigt.

**Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide**

| Bezeichnung     | Sequenz (5' → 3'): Restriktionsschnittstellen und Linker sind unterstrichen |
|-----------------|---|
| Cyclin_Nde_for  | ggc <u>atacat</u> ATGAACAGTGGAGTCGGCG                                       |
| Cyclin_Bam_Rev  | ggcatag <u>gatcc</u> TCACGTCGGGTGTTCC                                       |
| Bud32_Nde_for   | ggc <u>atacat</u> ATGCCACCAACGAACCGC  |
| Bud32_Bam_Rev   | ggcatag <u>gatcc</u> CTACCCAATCATGCTCCTC                                    |
| Bud32_P1_for    | GCATGGAATGATGTCCATGGCG  |
| Bud32_P2_for    | CTTCCCCTCCTCTCTTCTTCTC  |
| Bud32_P3_rev    | <u>ctccagcgctgcaccagctcc</u> CCCAATCATGCTCCTCTTCTCCTC                       |
| Bud32_P4_for    | <u>atcagtgctcctctcagacag</u> TAGTTACCTATATAACAGG-TATCGAATGG                 |
| Bud32_P5_rev    | GGCAGCCGTCAACATTCAAGTC  |
| Bud32_P6_rev    | GCGTGCTGTGAACAGGCAATTAG   |
| Cyclin_P1_for   | GGATGGCTTGCCTAACAGCTCTTG  |
| Cyclin_P2_for   | GTCCGACCATGCCCGTTTCATC  |
| Cyclin_P3_rev   | <u>ctccagcgctgcaccagctcc</u> CGTCGGGTGTTCCATGTACCA-ATG                      |
| Cyclin_P4_for   | atcagtgctcctctcagacagTGACTCTGGGTATGGTGACGTG                                 |
| Cyclin_P5_rev   | CTTCGTCTGGAGTAGTTCGCAGTG  |
| Cyclin_P6_rev   | GCACGATATAATAGTGGCACCGC   |
| Cyclin_Asc_for  | ggcatag <u>gcgcca</u> ATGAACAGTGGAGTCGGC                                    |
| Bud32_Asc_for   | ggcatag <u>gcgcca</u> ATGCCACCAACGAACCGC                                    |
| AN2513_P1-LB    | CGTCAGGCCATTGAGAACCAC   |
| AN2513_P2nested | CTAACCGTGCCATCATTCTGACC   |
| Bud177_Bam_rev  | ggcatag <u>gatcc</u> CTACCCATGTATAACACCCGC                                  |

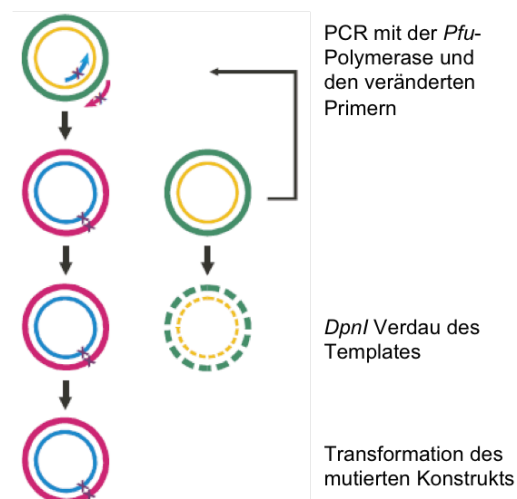
|                  |  |
|------------------|--|
| AN10741_P1-LB    | GGTGCCGAGAAATGTCGAGGAC                           |
| AN10741_P2nested | GCGATGGAGACGTCGATTTGACG                          |
| Cyclin197_Bam    | ggcataggatccTCACCCAACCTTAGCAACTCG                |
| AN10741_P3-KO    | gaagagcattgtttgaggcgCAGGGCGGGATGAAGGATGAAG       |
| AN10741_P4-KO    | atcagtgccctcctcagacagGCAAGTGCAGAGGTTACGGATG      |
| pchA-LB-Sonde1   | GCCAGCACCCCTATATCACGTC                           |
| pchA-LB-Sonde2   | CGATCACCCCTTTATTTCCCGTC                          |
| pchA-RB-Sonde1   | CCGAAACTAACCTGCATCTACC                           |
| pchA-RB-Sonde2   | CTATGCCAGACGCAACTATCAC                           |
| AN2513-P3-KO     | gaagagcattgtttgaggcgGAGAGAGCGGTGATAGTGAGG        |
| AN2513-P4-KO     | atcagtgccctcctcagacagGACAACGCCGCGCTCTTAGATG      |
| pGBT9_for        | GTCGACCTGCAGCCAAGCTAATTCC                        |
| GFP-GA-Linker    | GGAGCTGGTGCAGGCGCTG                              |
| pyrG-cas-F       | CGCCTCAAACAATGCTCTTC                             |
| pyrG-cas-R       | CTGTCTGAGAGGAGGCACTGAT                           |
| pyrG-3raus       | GAGTATGCGGCAAGTCATG                              |
| pyrG-5raus       | CAATTGCGACTTGGACGAC                              |
| ptkA_D155G_for   | GTATCCTACACCGCGGCATGAAAGCTGCCAATC                |
| ptkA_D155G_rev   | CTAGCCTTTCATGCCGCGGTGTAGGATAC                    |
| Cyclin_Pac_rev   | gctacgtaattaaTCACGTCGGGTGTTCCATGTACC             |
| Bud_Pac_rev      | gctacgtaattaaCTACCCAATCATGCTCCTCTTCC             |
| Bud_for          | CCGCGTCCCTTCTTCTTACTC                            |
| Bud_rev          | GGGTTTTGACGGGCGGATTTTG                           |
| Cyclin_for       | GGAGAGGGTGAACCTAGCCTTG                           |
| Cyclin_rev       | GAAGTTCCATGGCGTTCTCCG                            |
| ptkA_KQ_F1       | GATGGCTCCATCGTCGCGCTGCAAAA-<br>GATCCTCATGCATAATG |
| ptkA_KQ_R1       | CATTATGCATGAGGATCTTTTGCAGCGCGAC-<br>GATGGAGCCATC |
| PtkA_PITALRE_f   | PHO-CTA CTG AAA ATG TTG TCC CAC ACC              |

|                 |  |
|-----------------|--|
| PtkA_PITALRE_r  | PHO-CTT TGA CGA TCA GAT AGC TGC C                |
| PITALRE_rev     | PHO-GCC ATC TCG TTC ATT ATG CAT GAG              |
| PtkA_D173A_f    | CTGCAGATTGCC <u>GCCTTCGG</u> ACTGGC              |
| PtkA_D173A_r    | GCCAGTCCGAAG <u>GCGGCAATCTGC</u> AG              |
| PtkA_GAGA_r     | CCAAAGGT <u>GGCCTCCGCC</u> AGTTTGC               |
| PtkA_GAGA_f     | GCAA <u>ACTGGCGGAGGCC</u> ACCTTTGG               |
| PtkA_D155G_f    | GTATCCTACACCGC <u>GGCATGAAAGG</u> CTAG           |
| PtkA_D155G_r    | CTAGCCTTTTCAT <u>GCCGCGGTGTAGG</u> AATAC         |
| Bud_LB_for      | GGTGAAGTTCTCGGTATCACGCG                          |
| Bud_LB_rev      | GCAACGCTAAACGCCATAATGC                           |
| AN0809_SacI_rev | ggcatagagctcTTACTGGCGAGGAGAGGTGGG                |
| CTD_NdeI_for    | ggcatacatATGCCTACATCGCCTGGCTATTC                 |
| CTD_BamHI_for   | ggctacggatccATGCCTACATCGCCTGGCTATTC              |
| AN0809_NotI_rev | ggctacgcgccgcTTACTGGCGAGGAGAGGTGGG               |
| PipA_EcoRI_for  | ggctacgaattcATGCCACCAACGAACCGCCC                 |
| PipA_XhoI_rev   | ggctacctcgagCTACCCAATCATGCTCCTCTTCC              |
| pGB_ptkA_for    | ggcatatgGGCATAGCGTCACTCG                         |
| pGB_ptkA_rev    | gggatccTCACCGGCGATACGGAC                         |
| PtkA_Bam_for    | ggatccATGGGCATAGCGTCACTCG                        |
| PtkA_Sal_rev    | gggtcgacTCATGGCGGTGTCGAGAAATAA                   |
| Raus pyro5'     | CGTCAGGAACAGCTGGAACGCC                           |
| Raus pyro3'     | GGCCAAGAGAGGATGGTAATTGC                          |
| cyfp-test-rev   | TGGTTCATGACCTTCTGTTTCAGG                         |
| gfp-test-for    | GAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCC                        |
| gfp-test-rev    | GTTTCATCCATGCCATGTGTAATCC                        |
| PtkA_P4         | GAAGGACGTTCTTGGCTGACC                            |
| PtkA_F1_neuer   | AAGGAAAGCCGATTCTTGCTGG                           |
| PtkA_P6         | <u>ctccagcgctgcaccagctcc</u> CCGGCGATACGGACCCCTG |

|            |  |
|------------|--|
| PtkA_P5    | <u>atcagtgccctcctctcagacag</u> TGAAGCTACCGTCTACCA-TAAAAC |
| PtkA-KO-R1 | GCGCGCCAAGTTTCGACCC                                      |
| PtkA-P7    | TGTGAAATCATCGCTCTTGCTC                                   |

### 5.3.3 Site-directed Mutagenesis

Für die Herstellung von Konstrukten mit veränderter Sequenz wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von der Firma Stratagene (Abb. 58) verwendet. Es wurden Primer erstellt, welche die gewünschte Mutation enthielten. Damit wurde eine PCR, mit der *Pfu*-Polymerase, auf ein bereits vorhandenes Plasmid, welches das zu verändernde Plasmid enthielt, durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit *DpnI* verdaut, um das methylierte Ausgangsplasmide ohne Mutation zu verdauen, so dass nur das Plasmid mit der eingebauten Mutation erhalten bleibt. Der PCR-Ansatz wurde anschließend für eine *E. coli* Transformation verwendet. Die erhaltenen Kolonien wurden auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids getestet. Das Plasmid wurde isoliert und anschließend zum sequenzieren, bei der Firma MWG, geschickt, wodurch die Integration der Mutation bestätigt wurde.



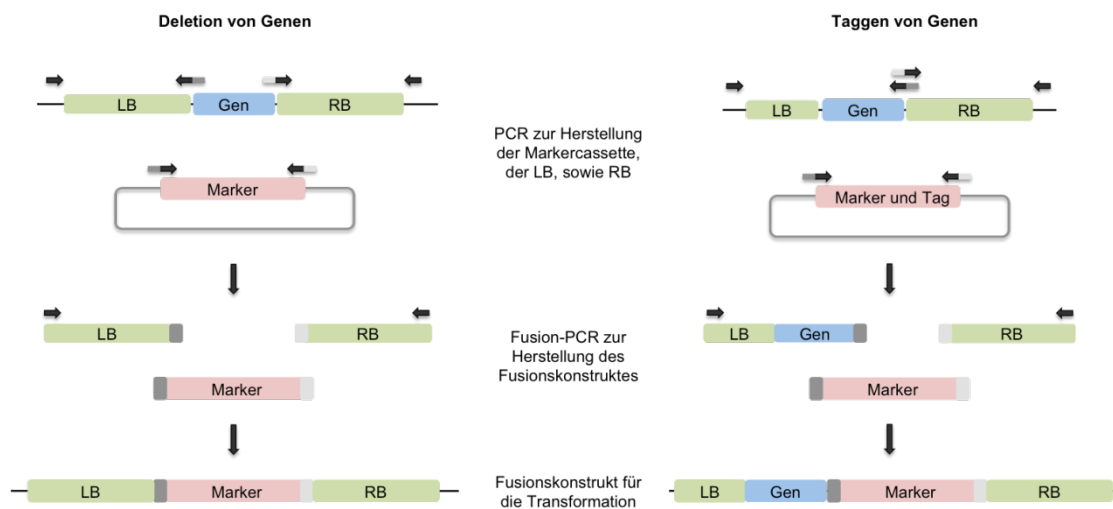
**Abbildung 58: Überblick über den Ablauf der Site-directed Mutagenesis (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Instruction Manual).**

Für die Site-directed Mutagenesis werden Primer mit veränderter Sequenz verwendet, um durch eine PCR Veränderungen in ein bereits bestehendes Plasmid einzubauen.



### 5.3.4 Fusion-PCR zur Herstellung von Deletionskonstrukten und zum Taggen von Genen unter der Kontrolle des natürlichen Promotors

Zur Herstellung von Konstrukten für die Deletion von Genen oder für das Taggen von Genen unter der Kontrolle des jeweiligen natürlichen Promotors, wurde die Fusion-PCR Methode verwendet (Szewczyk et al, 2006). Bei dieser Methode werden mittels PCR zuerst drei Fragmente amplifiziert. Für die Herstellung von Konstrukten für die Deletion eines Gens wurden die Markercassette, sowie je ein Fragment mit einer Länge von etwa 1 kb der 5'-UTR-Region (LB) und der 3'-UTR-Region (RB) des Gens amplifiziert. Für die Herstellung von Konstrukten für das C-terminale taggen von Genen wurden die Markercassette, sowie je ein Fragment mit einer Länge von etwa 1 kb der Gen-Region mit gegebenenfalls ein Teil der 5'-UTR (LB) und der 3'-UTR-Region (RB) amplifiziert. Durch Verwendung von Primern, welche zueinander komplementäre Sequenzen besitzen, werden diese Linker (GA5) an die hergestellte LB-, RB-Region und die Markercassette angehängt (Abb. 59). In einer zweiten PCR, der eigentlichen Fusion-PCR, werden die drei hergestellten Fragmente miteinander verbunden. Das hergestellte Fusion-PCR-Konstrukt wurde entweder direkt für eine Transformation in *A. nidulans* verwendet oder in den pJET-Vektor zwischenkloniert.



**Abbildung 59: Schematische Darstellung für die Herstellung von Fusionsprodukten mittels PCR für die Deletion oder für das Taggen von Genen.**

Durch eine PCR mit Primern, welche einen GA5-Linker besitzen, auf die Markercassette und die 5'-UTR oder 3'-UTR des zu deletierenden oder zu taggenden Gens, werden Fusionskonstrukte für eine Transformation in *A. nidulans* hergestellt..

### 5.3.5 *E. coli* Transformation und Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Für die Transformation wurden chemisch-kompetente TOP10 Zellen verwendet. Die bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz vermischt. Nach 30 min. Inkubation auf Eis wurde für 30 sek. ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert und im Anschluss auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

**Tabelle 12: Lösungen für Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli***

| Lösung   | Zusammensetzung                                |
|----------|--|
| Puffer 1 | 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,01% RNase |
| Puffer 2 | 0,2 M NaOH; 1 % SDS                            |
| TE       | 10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 mM EDTA pH 8,0       |

Um Transformanten einer Klonierung zu testen, wurde eine Minipräparation durchgeführt. Die zu untersuchenden Kolonien wurden mit einem Zahnstocher in Glasröhrchen mit je 2 ml LB-Medium, mit entsprechenden Antibiotika, überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurde etwa 1 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min. bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde zum Abbau von Ribonukleinsäuren zunächst in 200 µl Puffer 1 resuspendiert. Die Alkalische Lyse der Zellen erfolgte mit 200 µl Puffer 2 und die Fällung der Proteine anschließend 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 neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 500 µl 100% Isopropanol für 20 min bei -20° C gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 4° C für 30 min pelletiert, anschließend 1x mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und in der Speed Vac getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 68° C für ca. 10 im Heizblock gelöst. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend durch einen Restriktionsverdau überprüft.

Um Plasmid-DNA im größeren Maßstab zu isolieren wurden Übernachtskulturen mit 50-100 ml Medium hergestellt. Zur Isolierung der DNA 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-Spectrophotometer (Typ ND-100, *Peqlab*) bestimmt.

## 5.3.6 Hergestellte und verwendete Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgenden Plasmiden gearbeitet.

Tabelle 13: Verwendete und hergestellte Plasmide

| Plasmid                      | Beschreibung  | Referenz                                   |
|------------------------------|---|--|
| pJET1.2/blunt Cloning Vector | Klonierungsvektor für Klonierungen mit <i>pfu</i> - oder phusion-amplifizierten PCR-Produkten mit einem blunt Ende (CloneJET™ PCR Cloning Kit)                                | Fermentas                                  |
| pCR2.1-TOPO                  | Klonierungsvektor mit 3'T-Überhängen zur Klonierung von <i>taq</i> -amplifizierten PCR-Produkten (TOPO TA Cloning Kit)  | Invitrogen                                 |
| pET28a                       | Proteinexpressionsvektor ( <i>E. coli</i> ), T7 (p), 6 x His-Tag, MCS; 6 x His-Tag; Kan <sup>R</sup>  | Invitrogen                                 |
| pGEX4T-1                     | Proteinexpressionsvektor ( <i>E. coli</i> ), tac (p); Gst-Tag, MCS; Amp <sup>R</sup>  | GE Healthcare                              |
| pMCB17apx                    | Überexpression von Genen in <i>A. nidulans</i> mittels <i>alcA(p)</i> ; Fusion N-terminal mit <i>gfp</i> beim Einklonieren in die MCS, Amp <sup>R</sup> , <i>pyr4</i> -Marker | V. P. Efimov                               |
| pGADT7-Rec                   | Expressionsvektor ( <i>S. (Takeshita et al, 2008) cerevisiae</i> ), <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>AD</i> , <i>LEU2</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i>                                    | Clontech                                   |
| pGBKT7                       | Starker Expressionsvektor ( <i>S. cerevisiae</i> ), <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD</i> , <i>TRP1</i> , <i>Kan<sup>r</sup></i>  | Clontech                                   |
| pGBT9                        | Schwacher Expressionsvektor ( <i>S. cerevisiae</i> ), <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD</i> , <i>TRP1</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i>  | Clontech                                   |
| pFNO3                        | <i>ga5::gfp::pyrG</i> , <i>Kan<sup>r</sup></i> , <i>Amp<sup>r</sup></i>   | Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA |
| pNZ12                        | 1,7 kb Fragment von <i>pyroA</i>  | (Purschwitz et al, 2009)                   |
| pDV7                         | <i>gfp</i> in pCMB17apx ausgetauscht gegen <i>n-yfp</i>   | (Takeshita et al, 2008)                    |
| pDV8                         | <i>gfp</i> in pCMB17apx ausgetauscht gegen <i>c-yfp</i>   | (Takeshita et al, 2008)                    |
| pFB13                        | <i>alcA(p)::c-yfp::ptkA::pyr4</i> <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pDV8   | (Bathe et al, 2010)                        |
| pFB27                        | 1,5 kb der 5'-UTR von <i>pchA</i> mit <i>SfiI</i> in pCR2.1-TOPO  | (Bathe et al, 2010)                        |
| pFB28                        | 1,5 kb der 3'-UTR von <i>pchA</i> mit <i>SfiI</i> in pCR2.1-TOPO  | (Bathe et al, 2010)                        |
| pFB31                        | <i>pchA</i> -Deletionsplasmid flankierende Regionen von pFB27   | (Bathe et al, 2010)                        |

|       |  |                     |
|-------|--|---------------------|
|       | und pFB28 ligiert mit <i>pyroA</i> von pNZ12   |                     |
| pFB15 | <i>alcA(p)::gfp::ptkA::pyr4</i> <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pMCB17apx   | (Bathe et al, 2010) |
| pKC3  | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD::ptkA</i> mit <i>BamHI</i> und <i>Sall</i> aus cDNA in pGBT9   | Diese Arbeit        |
| pKC6  | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD::ptkA_24/170</i> mit <i>EcoRI</i> und <i>PstI</i> in pGBKT7  | Diese Arbeit        |
| pKC8  | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>AD::pclA</i> mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pGADT7-Rec   | Diese Arbeit        |
| pKC10 | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>AD::pchA</i> mit <i>NdeI</i> und <i>XmaI</i> in pGADT7-Rec  | Diese Arbeit        |
| pKC16 | <i>alcA(p)::gfp::pipA::pyro</i> mit <i>AscI</i> und <i>BamHI</i> in pMCB17apx  | Diese Arbeit        |
| pKC17 | <i>alcA(p)::gfp::pclB::pyro</i> <i>AscI</i> und <i>BamHI</i> in pMCB17apx  | Diese Arbeit        |
| pKC19 | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>AD::pclB</i> mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pGADT7-Rec   | Diese Arbeit        |
| pKC22 | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>AD::pipA</i> mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pGADT7-Rec   | Diese Arbeit        |
| pKC24 | <i>alcA(p)::gfp::pipA178::pyro</i> mit <i>AscI</i> und <i>BamHI</i> in pMCB17apx   | Diese Arbeit        |
| pKC35 | <i>alcA(p)::gfp::pclB197::pyro</i> mit <i>AscI</i> und <i>BamHI</i> in pMCB17apx   | Diese Arbeit        |
| pKC36 | <i>pipA</i> -Deletionskonstrukt<br>pyrG-Cassette umgeben von 1 kb der 5'-UTR und 1 kb der 3'-UTR von <i>pipA</i><br>hergestellt durch Fusion-PCR in pJET   | Diese Arbeit        |
| pKC37 | <i>pclB</i> -Deletionskonstrukt<br>pyrG-Cassette umgeben von 1 kb der 5'-UTR und 1 kb der 3'-UTR von <i>pclB</i><br>hergestellt durch Fusion-PCR in pJET   | Diese Arbeit        |
| pKC38 | <i>alcA(p)::n-yfp::pclB::pyro</i> mit <i>AscI</i> und <i>BamHI</i> in pMCB17apx  | Diese Arbeit        |
| pKC39 | <i>alcA(p)::n-yfp::pipA::pyro</i> mit <i>AscI</i> und <i>BamHI</i> in pMCB17apx  | Diese Arbeit        |
| pKC45 | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD::ptkA_D155G</i> mit <i>BamHI</i> und <i>Sall</i> aus cDNA in pGBT9   | Diese Arbeit        |
| pKC46 | <i>pipA</i> C-terminal getaggt mit <i>gfp</i><br><i>gfp-pyrG</i> -Cassette umgeben von 1 kb der 5'-UTR mit <i>pipA</i> und 1 kb der 3'-UTR von <i>pipA</i><br>hergestellt durch Fusion-PCR in pJET | Diese Arbeit        |

|       |  |              |
|-------|--|--------------|
| pKC51 | <i>pclB</i> C-terminal getaggt mit <i>gfp</i><br><i>gfp-pyrG</i> -Cassette umgeben von 1 kb<br>der 5'-UTR mit <i>pclB</i> und 1 kb der 3'-<br>UTR von <i>pclB</i> hergestellt durch Fusi-<br>on-PCR in pJET  | Diese Arbeit |
| pKC52 | <i>pclB</i> C-terminal getaggt mit <i>n-yfp</i><br><i>n-yfp-pyro</i> -Cassette umgeben von 1<br>kb der 5'-UTR mit <i>pclB</i> und 1 kb der<br>3'-UTR von <i>pclB</i> hergestellt durch<br>Fusion-PCR in pJET | Diese Arbeit |
| pKC53 | <i>ptkA</i> C-terminal getaggt mit <i>c-yfp</i><br><i>c-yfp-pyrG</i> -Cassette umgeben von 1<br>kb der 5'-UTR mit <i>ptkA</i> und 1 kb der<br>3'-UTR von <i>ptkA</i> hergestellt durch<br>Fusion-PCR in pJET | Diese Arbeit |
| pKC54 | <i>pipA</i> C-terminal getaggt mit <i>n-yfp</i><br><i>n-yfp-pyro</i> -Cassette umgeben von 1<br>kb der 5'-UTR mit <i>pipA</i> und 1 kb der<br>3'-UTR von <i>pipA</i> hergestellt durch<br>Fusion-PCR in pJET | Diese Arbeit |
| pKC55 | <i>alcA(p)::mrfp::pipA::pyr4</i> mit <i>Ascl</i> und<br><i>Pacl</i> in pMCB17apx   | Diese Arbeit |
| pKC56 | <i>alcA(p)::mrfp::pclB::pyr4</i> mit <i>Ascl</i> und<br><i>Pacl</i> in pMCB17apx   | Diese Arbeit |
| pKC57 | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD::ptkA_GAGA</i> mit<br><i>BamHI</i> und <i>Sall</i> aus cDNA in pGBT9   | Diese Arbeit |
| pKC59 | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD::ptkA_K54Q</i> mit<br><i>BamHI</i> und <i>Sall</i> aus cDNA in pGBT9   | Diese Arbeit |
| pKC60 | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD::ptkA_PITALRE</i><br>mit <i>BamHI</i> und <i>Sall</i> aus cDNA in<br>pGBT9   | Diese Arbeit |
| pKC61 | <i>GAL4<sub>(1-147)</sub>DNA-BD::ptkA_D173A</i> mit<br><i>BamHI</i> und <i>Sall</i> aus cDNA in pGBT9  | Diese Arbeit |
| pKC64 | <i>alcA(p)::gfp::ptkA_PITALRE::pyro</i> mit<br><i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx  | Diese Arbeit |
| pKC65 | <i>alcA(p)::gfp::ptkA_K54Q::pyro</i> mit<br><i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx   | Diese Arbeit |
| pKC66 | <i>alcA(p)::gfp::ptkA_D173A::pyro</i> mit<br><i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx  | Diese Arbeit |
| pKC70 | <i>alcA(p)::gfp::ptkA_GAGA::pyro</i> mit<br><i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx   | Diese Arbeit |
| pKC71 | <i>alcA(p)::gfp::ptkA_D155G::pyro</i> mit<br><i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx  | Diese Arbeit |
| pKC79 | <i>pclB</i> in pET28a mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>   | Diese Arbeit |

|       |  |              |
|-------|--|--------------|
| pKC80 | <i>pipA</i> in pET28a mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>       | Diese Arbeit |
| pKC84 | <i>ctd</i> in pET28a mit <i>NdeI</i> und <i>SacI</i>         | Diese Arbeit |
| pKC86 | <i>ptkA_1/330</i> in pET28a mit <i>BamHI</i> und <i>Sall</i> | Diese Arbeit |
| pKC92 | <i>ptkA</i> in pGEX4 mit <i>BamHI</i> und <i>Sall</i>        | Diese Arbeit |
| pKC93 | <i>ptkA_1/330</i> in pGEX4 mit <i>BamHI</i> und <i>Sall</i>  | Diese Arbeit |
| pKC94 | <i>ctd</i> in pGEX4 mit <i>BamHI</i> und <i>NotI</i>         | Diese Arbeit |
| pKC95 | <i>pipA</i> in pGEX4 mit <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>        | Diese Arbeit |

### 5.3.7 Herstellung von Protoplasten und Transformation von *A. nidulans*

**Tabelle 14: Lösungen für die Herstellung von Protoplasten und die Transformation von *A. nidulans***

| Lösung             | Zusammensetzung   |
|--------------------|---|
| Myzel-Waschlösung  | 0,6 M MgSO <sub>4</sub>   |
| Osmotisches Medium | 1,2 M MgSO <sub>4</sub> ; 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 5.8  |
| Trapping Buffer    | 0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris-HCl pH 7.0                           |
| STC                | 1,2 M Sorbitol; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM Tris-HCl pH 7.5 |
| PEG                | 60 % PEG 4000; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM Tris-HCl pH 7.5  |

Für die Transformation werden 500 ml Medium in einem 1 L Kolben mit Sporen eines zu transformierenden *A. nidulans* Stammes beimpft. Der Stamm wird etwa 12 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Das gebildete Myzel wird über einen Trichter mit sterilen Miracloth abfiltriert und mit 200 ml Myzel-Waschlösung gewaschen. In einen 100 ml Kolben wird 1 g Myzel gefüllt und mit 5 ml Osmotischem Medium versetzt. Nach Zugabe von 1 ml Glucanexlösung (240 mg/ml) und 500 µl Albuminlösung (10 mg/ml) wird die Lösung für 90 min. bei 30 °C und 100 rpm inkubiert. Die Protoplasten Suspension wird in einen 50 ml Falcon überführt, mit 10 ml Trapping-Buffer überschichtet und 18 min bei 5000 rpm und 4 °C im Ausschwingrotor (Universal 320 R von Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Die gebildete Interphase mit den Protoplasten wird mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen, in ein Corex-Gefäß überführt und mit 10 ml STC versetzt. Die Suspension wird bei 7000 rpm und 4 °C für 10 min. zentrifugiert und das Protoplastenpellet wird in 200-500 µl STC resuspendiert. Für jede Transformation wurden 100 µl Protoplastensuspension mit 5 – 10 µg DNA (ge-

löst in 100 µl STC) vermischt und 25 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurden 2 ml PEG dazugegeben und für weitere 25 min inkubiert. Zum Schluß wurden 8 ml STC hinzugegeben und die Suspension auf MM-Platten mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren und 0,6 M KCl, zur Regeneration der Protoplasten, verteilt. Nach drei Tagen Inkubationszeit bei 30 °C wurden die ersten Transformanten sichtbar.

### 5.3.8 PCR mit intakten Sporen (Sporen-PCR)

Es wurden frische Sporensuspensionen in 100 µl dH<sub>2</sub>O hergestellt, für 15 min. bei – 80 °C gefroren, im Anschluß 3 min. auf 100 °C erhitzt und gevortext, um die Sporen zu zerstören. Für die PCR wurden 4 µl der Sporensuspension und 0,5 µl *Taq*-Polymerase in einem 10 µl Ansatz eingesetzt.

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

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *A. nidulans* wurden Petrischalen mit etwa 20 ml Medium befüllt, mit Sporen beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die über Nacht gebildete Kahmhaut wird geerntet, zwischen Papierhandtüchern durch pressen getrocknet und unter Kühlung mit flüssigen Stickstoff gemörsert. Das fein gemörserte Myzel wird in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 1 ml Extraktionspuffer (50 mM EDTA; 0,2 % SDS) versetzt und bei 68 °C für 1-2 h inkubiert. Durch Zugabe von 60 µl einer 8 M Kaliumacetatlösung (pH 4,2) und 5 min. Inkubation auf Eis wurden die Proteine gefällt und durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Die isolierte genomische DNA wurde in TE-Puffer gelöst.

## 5.3.10 Southern-Blot

Tabelle 15: Lösungen für einen Southern-Blot

| Lösung                             | Zusammensetzung  |
|------------------------------------|--|
| Denaturierungspuffer               | 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl   |
| Neutralisierungspuffer             | 0,25 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl                                      |
| 20 x SSC                           | 3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat   |
| DIG Standard Hybridisierungspuffer | 5x SSC; 0,02 % SDS; 1 % Blocking Reagenz (Roche); 0,1 % N-Laurylsarcosin |
| 2 x Waschlösung                    | 2x SSC; 0,1 % SDS  |
| 0,5 x Waschlösung                  | 0,5x SSC; 0,1 % SDS  |
| Waschpuffer                        | 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,3 % Tween20                           |
| Blockingpuffer                     | 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl; 1 % Blocking Reagenz                    |
| AP-Puffer                          | 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub>              |

Für die Durchführung eines Southern-Blots wurden DIG markierte Sonden mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche (Mannheim), nach Angaben des Herstellers, hergestellt. Über Nacht wurde die genomische DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA wurde bei 80 Volt aufgetrennt und der Marker anschließend mit Hilfe einer Pipettenspitze im Gel markiert. Das Gel wurde für 10-20 min. mit 250 mM HCl behandelt und im Anschluss je zweimal 15 min. im Denaturierungspuffer und im Neutralisierungspuffer geschüttelt. Nach 10 min. Inkubation in 20 x SSC wurde der Blot aufgebaut (Abb. 60).

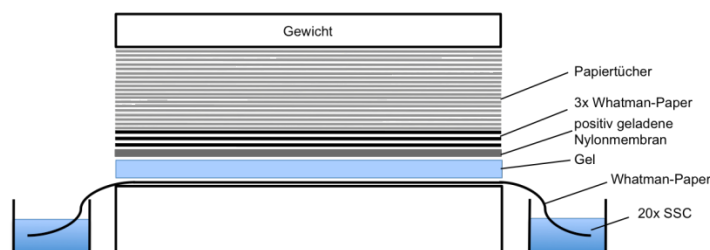


Abbildung 60: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern-Blots.

Es wurde mindestens 3 h oder auch über Nacht geblottet. Nach dem Abbau des Blots wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (0,120 mJ) auf der Nylonmembran fixiert. Die Membran wurde 1 h bei 68 ° C im DIG-Standard Hybridisierungspuffer prähybridisiert und über Nacht bei 68 ° C mit der denaturierten Sonde im DIG Stan-



standard Hybridisierungspuffer inkubiert. Die Sonde wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und konnte mehrmals wiederverwendet werden. Die Membran wurde zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in 0,5 x Waschlösung gewaschen, anschließend zweimal bei  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 min. in 2 x Waschlösung und 5 min. bei Raumtemperatur in Waschpuffer. Die Membran wurde 1 h in Blockingpuffer und danach 30 min. mit einem DIG-Antikörper (gekoppelt an alkalische Phosphatase) inkubiert. Im Anschluß wurde zweimal für 15 min. in Waschlösung gewaschen und für 5 min. in AP-Puffer äquilibriert. Zur Entwicklung wurde 500  $\mu\text{l}$  Farbreagenz (5  $\mu\text{l}$  CDP Star von Roche in 500  $\mu\text{l}$  AP-Puffer) für 5 min. auf die Membran gegeben und auf eine Plastikfolie gelegt. Die Signale auf der Membran wurden mit Hilfe des Chemi-Smart Chemilumineszenzsystem (Peglabor) detektiert.

### 5.3.11 Isolierung von RNA aus *A. nidulans*

Es wurde Medium in Erlenmeyerkolben gefüllt, mit Sporen beimpft und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  schüttelnd inkubiert. Zur Isolierung von RNA aus verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wurde ein Teil des Myzels direkt weiter verarbeitet und der Rest wurde auf Agarplatten, welche mit Cellophan beschichtet waren, überimpft. Diese wurden weiter für 5 h, 7 h, 9 h, 11 h und 24 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Das gebildete Myzel wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 1 ml TRI Reagent versetzt, gevortext und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Alle anschließenden Schritte erfolgten bei 11500 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nach der Inkubation auf Eis wurde 10 min. zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde 15 sek.

gevortext und 15 min. auf Eis inkubiert. Es wurde erneut 15 min. zentrifugiert, wonach die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben wurde. Zu dieser Suspension wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und gevortext. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min., wonach erneut die obere Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert wurde. Dieser Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, gut gemischt und 10 min. zentrifugiert. Wieder wurde die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und die RNA durch Zugabe von 0,25 ml Na-Citrat/NaCl (0,8 M Tri-Natrium-Citrat; 1,2 M NaCl) und 0,25 ml 100% Isopropanol für 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 (1 ml DEPC/L H<sub>2</sub>O) gelöst. Dazu wurde die RNA mehrmals auf 65° C erwärmt und gevortext. Die gelöste RNA wurde dann 10 min. abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die Konzentration mittels Nanodrop-Spektrophotometer gemessen und bei -80° C eingefroren.

### 5.3.11 Quantitative Real-time PCR

Für die quantitative Real Time PCR wurde das iScript one Step RT-PCR Kit SYBR Green und der iCycler von Bio-Rad verwendet. Es wurden 25 µl Ansätze mit 5 µM Primern und 100 ng RNA eingesetzt. Als Haushaltsgen wurde beta-Tubulin verwendet. Für die Analyse der Ergebnisse wurde die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Es wurden je zwei biologische Replikate benutzt.

### 5.3.12 Kreuzung von *A. nidulans*

Für Kreuzungen wurden die Kreuzungspartner auf Medium, mit allen benötigten Markern, nebeneinander angeimpft und für 1-2 Tage bei 37 °C inkubiert. Sobald sich die Kolonien im Randbereich getroffen haben, wurden aus den Berührungspunkten Agarblöckchen ausgeschnitten und auf Minimalmedium-Platten mit geeigneten Auxotrophiemarkern, welche nur ein Wachstum des Heterokaryons erlaubt, überführt. Die Platten wurden mit Parafilm und Klebeband verschlossen, um den CO<sub>2</sub> Partialdruck zu erhöhen und dadurch die sexuelle Entwicklung einzuleiten. Die Platten wurden bei 37 °C bis zur Ausbildung von Kleistothezien, nach etwa 7-14 Tagen, inkubiert. Die Kleistothezien wurden mit einer Impfnadel gepickt und durch Rollen auf einer Agarplatte von den umgebenen Hüllzellen befreit. Jedes Kleistothezium wurde in ein Eppendorfgefäß mit 100 µl dH<sub>2</sub>O überführt und dort zum Platzen gebracht. Die dadurch hergestellte Askosporensuspension wurde auf Agarplatten mit allen Markern ausplattiert. Die nach 2-3 Tagen gewachsenen Kolonien wurden auf Platten mit verschiedenen Markern gepickt, um nach Kolonien zu selektieren, welche die benötigten Marker enthalten (Sievers et al, 2005).

### 5.3.13 Heterokaryon-Test und Haploidisierung von *A. nidulans*

Zur Überprüfung, ob Kolonien nach einer Transformation, bei der ein mögliches essentielles Gen deletiert werden sollte, zur Ausbildung eines Heterokaryons oder eines diploiden Stammes führt, können verschiedene Tests durchgeführt werden.

Beim Heterokaryon-Test werden mit Hilfe einer Impföse, welche in eine Lösung mit 0,2 % Tween 20 getaucht wurde, Sporen von einer Platte abgenommen, ohne dabei Hyphen abzukratzen. Die Sporen werden dann auf Platten mit allen Markern und auf Platten, bei denen der Marker fehlt, welcher durch die Transformation eingebracht wurde, ausplattiert. Können keine Kolonien auf dem Selektionsmedium wachsen, dann liegt ein Heterokaryon vor und das deletierte Gen hat eine essentielle Funktion, weshalb die Deletion letal ist. Können Kolonien wachsen, dann ist die Deletion nicht letal. Da die Sporen haploid sind, besitzen diese entweder einen Kern mit dem Gen oder einen Kern, bei dem das Gen durch den Selektionsmarker ausgetauscht wurde. Die Sporen mit dem Gen können nicht wachsen, da der Auxotrophiemarker fehlt und die Kolonien mit der Deletion können wegen der letalen Wirkung ohne das Gen nicht wachsen (Osmani et al, 2006).

Um zu testen, ob ein Stamm nach einer Transformation diploid ist, werden Platten hergestellt, welche den Wirkstoff Benomyl in verschiedenen Konzentrationen enthalten. Benomyl hat eine destabilisierende Wirkung auf Mikrotubuli. Die zu testenden Kolonien werden jeweils in die Mitte einer Platte mit Benomyl gepickt und bei 37 °C inkubiert. Sollte ein diploider Stamm vorliegen, dann führt das Wachstum auf Platten mit Benomyl zur Ausbildung von Sektoren, welche ein Zeichen für eine Haploidisierung darstellen. Aus diesen Sektoren werden Sporen entnommen und auf neues Selektionsmedium überimpft. Die Platten werden bei 37 °C für 2-3 Tage inkubiert. Die gewachsenen Kolonien werden mittels PCR getestet, um die Haploidisierung zu überprüfen. Bei erfolgreicher Haploidisierung sollten Kolonien mit dem transformierten Konstrukt und Wildtyp Kolonien vorliegen (Rischitor et al, 2004).

### 5.3.14 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen und Transformation

**Tabelle 16: Verwendete Lösungen für die Transformation von *S. cerevisiae***

| Lösung         | Zusammensetzung   |
|----------------|---|
| 10 x TE-Puffer | 0,1 M Tris-HCL; 10 mM EDTA  |
| 10 x LiAc      | 10,2 g LiAc in 100 ml dH <sub>2</sub> O lösen;<br>pH 7.5 mit verdünnter Essigsäure einstellen |
| 1,1 x TE/LiAc  | 1,1x TE-Puffer (10 x); 1,1x LiAc (10 x)   |
| 1 x PEG/LiAc   | 1x PEG 4000 (50 %); 1 x TE (10x); 1 x LiAc (10x)  |

Für die Herstellung kompetenter Hefen wurde mit einer Kolonie von AH106 oder Y187 eine Übernachtskultur in 5 ml YPDA hergestellt. Die Kultur wurde 8 h bei 30°C

geschüttelt. Nach 8 h wurden 50 µl entnommen und in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml YPDA Medium überführt. Die Kultur wurde 16-20 h bei 30 °C und 230-250 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.15-0.3 erreicht wurde (stationäre Phase). Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 700 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml YPDA gelöst. Die Kultur sollte nun eine OD<sub>600</sub> von 0.2-0.3 haben. Die Zellsuspension wurde weitere 3-5 h inkubiert bis eine OD von 0.4-0.5 erreicht wurde (mid-log Phase). Die Kultur wurde erneut 5 min bei 700 g, das Pellet in 30 ml dH<sub>2</sub>O resuspendiert und 5 min bei 700 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml 1,1x TE/LiAc gelöst. Die Zellsuspension wurde auf zwei Eppendorfgeläße aufgeteilt und 15 sek. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 µl 1,1x TE/LiAc gelöst. Die frisch hergestellten kompetenten Zellen wurden innerhalb der nächsten Stunden weiter verwendet.

Für die Transformation (Gietz et al, 1992) von *S. cerevisiae* wurden 100 µl kompetente Zellen mit 0,1 mg carrier DNA (zuvor 5 min. bei 100 °C inkubiert) und 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Danach wurden 600 µl PEG/LiAc zugegeben und 10 sek. gevortext. Der Transformationsansatz wurde 30 min. bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt und nach jeweils 10 min. gevortext. Zugabe von 70 µl DMSO (Hill et al, 1991) zu der Probe, 15 min. bei 42 °C im Wasserbad inkubieren und nach je 5 min. vortexen. Die Probe 15 sek. bei 14000 rpm zentrifugieren und das Pellet in 500 µl YPDA lösen. Anschließend 90 min. bei 30 °C und 265 rpm schüttelnd inkubieren. Die Probe erneut 15 sek. Zentrifugieren und das Pellet in 500 µl einer 0.9 %-igen NaCl-Lösung resuspendieren. Von der Probe wurden Verdünnungen von 1:10 bis 1:1000 hergestellt und je nach verwendetem Plasmid auf das entsprechende Selektions-medium ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert.

### 5.3.15 Yeast two-hybrid durch Kreuzung

Für die Kreuzung wurde eine Übernachtskultur mit dem Hefe-Stamm, transformiert mit dem bait-Plasmid hergestellt. Dafür wurde eine Kolonie in 50 ml des entsprechenden Selektionsmediums gelöst und bei 30 °C, sowie 240 rpm für 16-20 h inkubiert. Die Kultur sollte eine OD<sub>600</sub> von mindestens 0.8 erreicht haben, um anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min. bei 600 g zentrifugiert zu werden. Das Pellet wurde in 5 ml 2x YPDA/Kanamycin gelöst und in einen Erlenmeyerkolben (2 L) überführt. Dazu wurde ein aufgetautes Aliquot (1 ml) der cDNA-Library gegeben und mit 2 x YPDA/Kanamycin auf 50 ml gebracht. Die Kreuzungskultur wurde bei 30 °C und 30-50 rpm 24-48 h inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugen-röhrchen überführt und bei 2500 rpm für 10 min. zentrifugiert. Der

Kolben mit der Kreuzungssuspension wurde mit 20 ml 0,5 x YPDA/ Kanamycin ausgespült und dann zur Resuspendierung des Pellets verwendet.

Die Zellsuspension wurde mit 0,5 x YPDA/Kanamycin auf 50 ml aufgefüllt und 10 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 0,5 x YPDA/Kanamycin resuspendiert. Von der Kultur wurden mit einer 0,9%-igen NaCl-Lösung Verdünnungen von 1:10 bis 1:100000 hergestellt und auf verschiedenen Selektionsmedien (SD-Leu, SD-Trp, SD-Leu-Trp) ausplattiert. Der Rest der Zellsuspension wurde auf Medium zur Selektion von Interaktionen ausplattiert (TDO, QDO). Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert.

## 5.4 Biochemische Methoden

### 5.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

**Tabelle 17: Lösungen für die SDS-Page**

| Lösung                            | Zusammensetzung  |
|-----------------------------------|--|
| Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer | 25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS   |
| 4-fach SDS-Ladepuffer             | 200 mM Tris-HCl (pH 6,8); 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,4 % Bromphenolblau; 40 % Glycerol |
| Coomassie-Färbelösung             | 0,1 % Serva Blue R; 45 % Ethanol; 10 % Essigsäure                                  |
| Entfärber                         | 20 % Ethanol; 10 % Essigsäure  |

Alle Komponenten für die SDS-Page wurden, wie in Sambrook & Russel (Appendix 8; Gele auf Seite A8.43) beschrieben, hergestellt (Sambrook & Russell, 2000). Zur Herstellung der Polyacrylamidgelen und zur Gelelektrophorese wurde ein Mini-PROTEAN System von Bio-Rad verwendet. Je nach Bedarf wurden Gele mit einer Dicke von 0,75 mm oder 1 mm hergestellt. Zunächst wurde ein 10 %-iges Trenngel in die im Gießstand eingespannten Platten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde die überstehende Flüssigkeit abgenommen und das Trenngel mit einem 5 %-igen Sammelgel überschichtet und sofort ein Gelkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit vierfach SDS-Ladepuffer gemischt (Verhältnis 3:1) und 5 min auf dem Heizblock bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden in die Geltaschen gefüllt, zuvor wurde die Apparatur mit Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer befüllt. Als Marker diente der Prestained Protein Ladder von Fermentas. Der Gellauf erfolgte bei 100 V bis die Proben sich am Ende des Sammelgels befanden, danach für ca. 1,5 h bei 130V.

Die hergestellten Gene wurden entweder für einen Western-Blot weiter verwendet oder mit Coomassie angefärbt.

Für eine Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie wurde das SDS-Gel für 30 min. in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde es für mehrere Stunden im Entfärber aufbewahrt, wobei die Lösung 1-2 x erneuert wurde und schließlich bis zur vollständigen Hintergrund-Entfärbung mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen wurde. Alternativ wurde das Gel nur durch Inkubation in destilliertem Wasser über Nacht entfärbt. Alle Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

#### 5.4.2 Western-Blot

**Tabelle 18: Lösungen für den Western-Blot und die Immundetektion**

| Lösung             | Zusammensetzung   |
|--------------------|---|
| Transferpuffer     | 20 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol   |
| TBS-T              | 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20  |
| Block-Lösung       | 5 % Magermilchpulver in TBS-T   |
| Primärantikörper   | Anti-His monoclonal antibody (IgG2a); aus Maus (GE Healthcare)<br>GST-Tag monoclonal antibody; aus Maus (Novagen)                                     |
| Sekundärantikörper | Anti-Mouse IgG peroxidase conjugate; aus Ziege (Sigma)  |
| Luminol            | Lösung A: 50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6<br>Lösung B: 11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO<br>35 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |

Western-Blots wurden mit Tank-Blotting-Apparaturen von BioRad durchgeführt. Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine PVDF-Membran (A. Hartenstein) bei 30 V über Nacht bei 4°C oder bei 100 V für 1 h. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen auf der Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur mit Block-Lösung inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit dem Primärantikörper in Magermilchlösung für 1 h bei Raumtemperatur. Ungebundene Antikörper wurden anschließend in drei Waschschritten für je 10 min. mit TBS-T abgespült und die Membran mit dem an eine Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten für je 10 min. wurde die Immundetektion am Chemi-Smart Chemilumineszenzsystem (PepLab) durchgeführt.

### 5.4.3 Proteinexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Sobald ein neues Expressionskonstrukt in *E. coli* exprimiert wurde, wurde zunächst die Löslichkeit des rekombinanten Proteins getestet. Dafür wurde der Zellaufschluss ausgehend von 6 ml Hauptkultur im Reagenzglas durchgeführt. Die Proteinexpression wurde ab einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 mit 0,5 mM IPTG *f.c.* induziert. Es wurde zumeist auch eine Kultur mitgeführt, bei der kein IPTG zugegeben wurde und die als Negativkontrolle fungierte. Die Kulturen wurden anschließend meist über Nacht bei 28°C und 180 rpm geschüttelt. Gegebenenfalls wurde die Temperatur verändert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min. bei 4°C gewonnen. Die Zellpellets wurden dann für mindestens 1 h bei -20°C eingefroren und anschließend mit 500 µl Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 1 mM PMSF) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte am Ultraschallgerät (Sonoplus GM 3080, SpitzeMS70; *Bandelin electronic*, Berlin), wobei pro Ansatz 2 x je 3 min (2 sec Pulse/2 min Pausen, Amplitude 50 %) auf Eis gepulst wurde. Der Zellaufschluss wurde am Mikroskop überprüft. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min. und bei 4°C wurden unlösliche Proteine (*inclusion bodies*) mit dem Pellet von der löslichen Fraktion im Überstand abgetrennt. Für die SDS-PAGE wurden Aliquots aus Überstand und Pellet geladen.

### 5.4.4 Aufreinigung von His-getaggten Proteinen mit Ni-NTA-Agarose

Tabelle 19: Puffer für die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose

| Lösung            | Zusammensetzung  |
|-------------------|--|
| Lysispuffer       | 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff;<br>20 mM Imidazol; pH-Wert 8,0  |
| Waschpuffer I     | 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff;<br>50 mM Imidazol; pH-Wert 6,3  |
| Waschpuffer II    | 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff;<br>100 mM Imidazol; pH-Wert 6,3 |
| Elutionspuffer I  | 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff;<br>300 mM Imidazol; pH-Wert 5,5 |
| Elutionspuffer II | 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff;<br>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 1 h bei Raumtemperatur rollend inkubiert. Danach wurde das Gemisch in eine Leersäule gefüllt und 5 min. bei 800 rpm zentrifugiert, um das Säulenmaterial mit dem gebundenen Protein vom übrigen Durchfluss (FT) zu trennen. 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. Verschiedene Fraktionen wurden in der SDS-PAGE getestet.

## 5.5 Mikroskopische Methoden

### 5.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Für mikroskopische Untersuchungen von Hyphen wurden die entsprechenden *A. nidulans*-Stämme in Minimalmedium mit 2 % Glycerol und den entsprechenden Auxotrophiemarkern auf Deckgläsern angeimpft und für 16-24 Std. bei Raumtemperatur oder für etwa 6 h bei 37 °C inkubiert. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Zeiss Mikroskop AxioImagerZ.1 (Software: AxioVision V4.5) und mit einem 63-er Objektiv durchgeführt. Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde das DIC-Verfahren (*Differential Interference Contrast*) angewendet. Zur Bildaufnahme diente die Zeiss AxioCamMR und als Quelle für Fluoreszenzlicht eine HBO100 Quecksilberdampfampe (*Osram*).

Für mikroskopische Untersuchungen von Konidiophoren, wurden Objektträger mit Medium überschichtet, welches 0,8 % Agarose enthielt. Die Objektträger wurden mit Sporen, des zu mikroskopierenden Stammes, beimpft und auf blaue Spitzen in einer, mit etwas Wasser gefüllten, Petrischale gelegt. Die Proben wurden für etwa 48 h bei 37 °C inkubiert.



## 6. Literaturverzeichnis

**Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE (1988)** brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353-362

**Adams TH, Hide WA, Yager LN, Lee BN (1992)** Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **12**: 3827-3833

**Adams TH, Wieser JK, Yu JH (1998)** Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and molecular biology reviews* **62 (1)**: 35-54

**Andrews B, Measday V (1998)** the cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends in Genetics* **14** 66-72

**Andrianopoulos A, Timberlake WE (1994)** The *Aspergillus nidulans* abaA gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**: 2503-2515

**Arellano M, Moreno S (1997)** Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 559-573

**Axelrod DE, Gealt M, Pastushok M (1973)** Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **34**: 9-15

**Bagella L, MacLachlan TK, Buono RJ (1998)** Cloning of Murine CDK9/PITALRE and Its Tissue-Specific Expression in Development. *Journal of cellular physiology* **177** 206-213

**Bartkowiak B, Greenleaf AL (2011)** Phosphorylation of RNAPII: To P-TEFb or not to P-TEFb? *Transcription* **2**: 115-119

**Bathe F, Kempf C, Osmani SA, Osmani AH, Hettinger S, Wohlmann E, Fischer R (2010)** Functional characterization of a new member of the Cdk9 family in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **9**: 1901-1912

**Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Durr P (1996)** Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol* **16**: 3401-3409

**Boylan MT, Mirabito PM, Willett CE, Zimmerman CR, Timberlake WE (1987)** Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**: 3113-3118

**Briza P, Bogengruber E, Thur A, Rutzler M, Munsterkotter M, Dawes IW, Breitenbach M (2002)** Systematic analysis of sporulation phenotypes in 624 non-lethal homozygous deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 403-422

**Bussink HJ, Osmani SA (1998)** A cyclin-dependent kinase family member (PHOA) is required to link developmental fate to environmental conditions in *Aspergillus nidulans*. *EMBO* **17** 3990-4003

- Carrera AC, Alexandrov K, Roberts TM (1993)** The conserved lysine of the catalytic domain of protein kinases is actively involved in the phosphotransfer reaction and not required for anchoring ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 442-446
- Casselton L, Zolan M (2002)** The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* **3**: 683-697
- Chang YC, Timberlake WE (1993)** Identification of *Aspergillus* brIA response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics* **133**: 29-38
- Chao SH, Price DH (2001)** Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem* **276**: 31793-31799
- Chomczynski P (1987)** Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159
- Clutterbuck AJ (1969)** Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **55**: 291-299
- de Groot PW, Ruiz C, Vazquez de Aldana CR, Duenas E, Cid VJ, Del Rey F, Rodriguez-Pena JM, Perez P, Andel A, Caubin J, Arroyo J, Garcia JC, Gil C, Molina M, Garcia LJ, Nombela C, Klis FM (2001)** A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genomics* **2**: 124-142
- De Luca A, De Falco M, Baldi A, Paggi MG (2002)** Cyclin T: Three Forms for Different Roles in Physiological and Pathological Functions. *Journal of Cellular Physiology* **194**: 101-107
- Dickman MB, Yarden O (1999)** Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **26**: 99-117
- Draetta G, Brizuela L, Potashkin J, Beach D (1987)** Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell* **50**: 319-325
- Elledge SJ, Richman R, Hall FL, Williams RT, Lodgson N, Harper JW (1992)** CDK2 encodes a 33-kDa cyclin A-associated protein kinase and is expressed before CDC2 in the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2907-2911
- Espinosa-Ruiz A, Saxena S, Schmidt J, Mellerowicz E, Miskolczi P, Bako L, Rishikesh PB (2004)** Differential stage specific regulation of cyclin dependent kinases cambial dormancy in hybrid aspen. *The Plant Journal* **38**: 603-615
- Espinoza FH, Ogas J, Herskowitz I, Morgan DO (1994)** Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. *Science* **266**: 1388-1391
- Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U (2010)** *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* **18**: 569-576
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983)** Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**: 389-396

- Facchin S, Lopreiato R, Stocchetto S, Arrigoni G, Cesaro L, Marin O, Carignani G, Pinna LA (2002a)** Structure-function analysis of yeast piD261/Bud32, an atypical protein kinase essential for normal cell life. *Biochem J* **364**: 457-463
- Facchin S, Sarno S, Marin O, Lopreiato R, Sartori G, Pinna LA (2002b)** Acidophilic character of yeast PID261/BUD32, a putative ancestor of eukaryotic protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 1366-1371
- Fischer R, Timberlake WE (1995)** *Aspergillus nidulans* apsA (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol* **128**: 485-498
- Fisher RP, Morgan DO (1994)** A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**: 713-724
- Fu TJ, Peng J, Lee G, Price DH, Flores O (1999)** Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* **274**: 34527-34530
- Garriga J, Grana X (2004)** Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* **337**: 15-23
- Garriga J, Segura E, Mayol X, Grubmeyer C, Grana X (1996)** Phosphorylation site specificity of the CDC2-related kinase PITALRE. *Biochem J* **320 ( Pt 3)**: 983-989
- Garriga J, Xie H, Obradovic Z, Grana X (2010)** Selective control of gene expression by CDK9 in human cells. *J Cell Physiol* **222**: 200-208
- Garzia A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Fischer R, Espeso EA, Ugalde U (2009)** *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* **71**: 172-184
- Garzia A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Ugalde U, Espeso EA (2010)** The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces brlA expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **75**: 1314-1324
- Gibbs CS, Zoller MJ (1991)** Rational scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions. *J Biol Chem* **266**: 8923-8931
- Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl R (1992)** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* **20 (6)** 1425
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991)** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-138
- Goldsmith EJ, Cobb MH (1994)** Protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* **4**: 833-840
- Grana X, De Luca A, Sang N, Fu Y, Claudio PP, Rosenblatt J, Morgan DO, Giordano A (1994)** PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3834-3838

- Han S, Navarro J, Greve RA, Adams TH (1993)** Translational repression of brlA expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J* **12**: 2449-2457
- Hanks SK (1987)** Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 388-392
- Hanks SK (2003a)** Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biology* **4** %6: 111-118 %&
- Hanks SK (2003b)** Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* **4**: 111
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988a)** The Protein Kinase family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241** %6: 42-52 %&
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988b)** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993)** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816
- Hecker A, Lopreiato R, Graille M, Collinet B, Forterre P, Libri D, van Tilbeurgh H (2008)** Structure of the archaeal Kae1/Bud32 fusion protein MJ1130: a model for the eukaryotic EKC/KEOPS subcomplex. *EMBO J*
- Hill J, Ian KA, Donald G, Griffiths DE (1991)** DMSO enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research* **19** (20) 5791
- Hochstrasser M (1995)** Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 215-223
- Huang D, Friesen H, Andrews B (2007a)** Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Molecular Microbiology* **66**(2) 303-314
- Huang D, Friesen H, Andrews B (2007b)** Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol* **66**: 303-314
- Inaba T, Matsushime H, Valentine M, Roussel MF, Sherr CJ, Look AT (1992)** Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* **13**: 565-574
- James P, Halladay J, Craig EA (1996)** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436
- Kaffman AHITR, O'Shea EK (1994)** Phosphorylation of the Transcription Factor PH04 by a Cyclin-CDK Complex, PH080-PH085. *Science* **263** 1153-1156
- Karos M, Fischer R (1996)** hymA (hypha-like metulae), a new developmental mutant of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **142** ( Pt 11): 3211-3218
- Kato Y, Kawasaki H, Ohyama Y, Morishita T, Iwasaki H, Kokubo T, Hirano H (2011)** Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. *Genetics* **188**: 871-882

- Kim YK, Bourgeois CF, Isel C, Churcher MJ, Karn J (2002)** Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation. *Mol Cell Biol* **22**: 4622-4637
- Kohoutek J, Li Q, Blazek D, Luo Z, Jiang H, Peterlin BM (2009)** Cyclin T2 is essential for mouse embryogenesis. *Mol Cell Biol* **29**: 3280-3285
- Kwon NJ, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U, Yu JH (2010)** FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **77**: 1203-1219
- Lee BN, Adams TH (1994)** Overexpression of flbA, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of brlA and premature initiation of development. *Mol Microbiol* **14**: 323-334
- Lee BN, Adams TH (1996)** FluG and flbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through brlA beta activation. *EMBO J* **15**: 299-309
- Lee M, O'Regan S, Moreau JL, Johnson AL, Johnston LH, Goding CR (2000)** Regulation of the Pcl7-Pho85 cyclin-cdk complex by Pho81. *Mol Microbiol* **38**: 411-422
- Lees E (1995)** Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 773-780
- Lin X, Taube R, Fujinaga K, Peterlin BM (2002)** P-TEFb containing cyclin K and Cdk9 can activate transcription via RNA. *J Biol Chem* **277**: 16873-16878
- Liou LY, Haaland RE, Herrmann CH, Rice AP (2006)** Cyclin T1 but not cyclin T2a is induced by a post-transcriptional mechanism in PAMP-activated monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* **79**: 388-396
- Liu H, Herrmann CH (2005)** Differential Localization and Expression of the Cdk9 42k and 55k Isoforms. *Journal of cellular physiology* **203** 251-260
- Lopreiato R, Facchin S, Sartori G, Arrigoni G, Casonato S, Ruzzene M, Pinna LA, Carignani G (2004)** Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem J* **377**: 395-405
- Malumbres M (2005)** Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* **4**: 206-210
- Malumbres M, Barbacid M (2005)** Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**: 630-641
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S (2002)** Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *TRENDS in Biochemical Sciences Vol27 No10 October 2002* **27 (10)**: 514-520
- Marshall MA, Timberlake WE (1991)** *Aspergillus nidulans* wetA activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**: 55-62

- Marshall NF, Peng J, Xie Z, Price DH (1996)** Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* **271**: 27176-27183
- Measday V, Moore L, Retnakaran R, Lee J, Donoviel M, Neiman AM, Andrews B (1997)** A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* **17**: 1212-1223
- Morgan DO (1995)** Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-134
- Morris NR, Enos AP (1992)** Mitotic gold in a mold: *Aspergillus* genetics and the biology of mitosis. *Trends Genet* **8**: 32-37
- Murray S, Udupa R, Yao S, Hartzog G, Prelich G (2001)** Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain by the Bur1 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* **21**: 4089-4096
- Napolitano G, Licciardo P, Carbone R, Majello B, Lania L (2002)** CDK9 has the intrinsic property to shuttle between nucleus and cytoplasm, and enhanced expression of cyclin T1 promotes its nuclear localization. *J Cell Physiol* **192**: 209-215
- Napolitano G, Majello B, Lania L (2003)** Catalytic activity of Cdk9 is required for nuclear co-localization of the Cdk9/cyclin T1 (P-TEFb) complex. *J Cell Physiol* **197**: 1-7
- Nasmyth K (1993)** Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Current Opinion in Cell Biology* **5** 166-179
- Navarro RE, Stringer MA, Hansberg W, Timberlake WE, Aguirre J (1996)** *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* **29**: 352-359
- Ni Z, Saunders A, Fuda NJ, Yao J, Suarez JR, Webb WW, Lis JT (2008)** P-TEFb is critical for the maturation of RNA polymerase II into productive elongation in vivo. *Mol Cell Biol* **28**: 1161-1170
- Noble M, Endicott JA, Brown NR, Johnson LN (1997)** The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *TIBS* **22** %6: 482-487 %&
- Nurse P (2000)** A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **100**: 71-78
- O'Keeffe B, Fong Y, Chen D, Zhou S, Zhou Q (2000)** Requirement for a kinase-specific chaperone pathway in the production of a Cdk9/cyclin T1 heterodimer responsible for P-TEFb-mediated tat stimulation of HIV-1 transcription. *J Biol Chem* **275**: 279-287
- Oakley BR, Rinehart JE, Mitchell BL, Oakley CE, Carmona C, Gray GL, May GS (1987)** Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **61**: 385-399
- Odawara M, Kadowaki T, Yamamoto R, Shibasaki Y, Tobe K, Accili D, Bevins C, Mikami Y, Matsuura N, Akanuma Y, et al. (1989)** Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Science* **245**: 66-68

- Oqani RK, Kim HR, Diao YF, Park CS, Jin DI (2011)** The CDK9/Cyclin T1 Subunits of P-TEFb in Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos: A Possible Role in Embryonic Genome Activation. *BMC Dev Biol* **11**: 33
- Osmani AH, May GS, Osmani SA (1999)** The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem* **274**: 23565-23569
- Osmani AH, Oakley BR, Osmani SA (2006)** Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat Protoc* **1**: 2517-2526
- Osmani AH, van Peij N, Mischke M, O'Connell MJ, Osmani SA (1994)** A single p34cdc2 protein kinase (encoded by nimXcdc2) is required at G1 and G2 in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **107** ( Pt 6): 1519-1528
- Palancade B, Bensaude O (2003)** Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem* **270**: 3859-3870
- Pei Y, Schwer B, Shuman S (2003)** Interactions between Fission Yeast Cdk9, Its Cyclin Partner Pch1, and mRNA Capping Enzyme Pct1 Suggest an Elongation Checkpoint for mRNA Quality Control. *Journal of Biological Chemistry* **278** (9) 7180-7188
- Peng J, Marshall NF, Price DH (1998a)** Identification of a cyclin subunit required for the function of *Drosophila* P-TEFb. *J Biol Chem* **273**: 13855-13860
- Peng J, Zhu Y, Milton JT, Price DH (1998b)** Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* **12**: 755-762
- Prade RA, Timberlake WE (1993)** The *Aspergillus nidulans* brlA regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* **12**: 2439-2447
- Prelich G (2002)** RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinases: emerging clues to their function. *Eukaryot Cell* **1**: 153-162
- Price DH (2010)** Regulation of RNA polymerase II elongation by c-Myc. *Cell* **141**: 399-400
- Purschwitz J, Muller S, Fischer R (2009)** Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics* **281**: 35-42
- Qiu H, Hu C, Hinnebusch AG (2009)** Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters. *Mol Cell* **33**: 752-762
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996)** PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**: 267-271
- Rischitor PE, Konzack S, Fischer R (2004)** The Kip3-like kinesin KipB moves along microtubules and determines spindle position during synchronized mitoses in *Aspergillus nidulans* hyphae. *Eukaryot Cell* **3**: 632-645

- Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Muller S, Fischer R (2010)** Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* **64**: 585-610
- Romano G, Giordano A (2008)** Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases. *Cell Cycle* **7**: 3664-3668
- Russell P, Nurse P (1986)** Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided. *Cell* **45**: 781-782
- Sambrook J, Russell DW (2000)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory* 3rd ed.
- Sartori G, Mazzotta G, Stocchetto S, Pavanello A, Carignani G (2000)** Inactivation of six genes from chromosomes VII and XIV of Saccharomyces cerevisiae and basic phenotypic analysis of the mutant strains. *Yeast* **16**: 255-265
- Schier N (2001)** Molekulare Analyse der Funktion des Cyklins PclA während der asexuellen Entwicklung von Aspergillus nidulans. Philipps-Universität Marburg,
- Schier N, Fischer R (2002)** The Aspergillus nidulans cyclin PclA accumulates in the nucleus and interacts with the central cell cycle regulator NimXCdc2. *FEBS Letters* **523** 143-146
- Schier N, Liese R, Fischer R (2001)** A Pcl-Like Cyclin of Aspergillus nidulans Is Transcriptionally Activated by Developmental Regulators and Is Involved in Sporulation. *Molecular and cellular biology* **6**: 4075-4088
- Seo JA, Guan Y, Yu JH (2006)** FluG-dependent asexual development in Aspergillus nidulans occurs via derepression. *Genetics* **172**: 1535-1544
- Sewall TC, Mims CW, Timberlake WE (1990)** abaA controls phialide differentiation in Aspergillus nidulans. *Plant Cell* **2**: 731-739
- Sherr CJ (1995)** D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* **20**: 187-190
- Shim EY, Walker AK, Shi Y, Blackwell TK (2002)** CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the C. elegans embryo. *Genes & Development* **16** 2135-2146
- Shin KS, Kwon NJ, Kim YH, Park HS, Kwon GS, Yu JH (2009)** Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of Aspergillus nidulans. *Eukaryot Cell* **8**: 738-746
- Shore SM, Byers SA, Dent P, Price DH (2005)** Characterization of Cdk9 55 and differential regulation of two Cdk9 isoforms. *Gene* **350** 51-58
- Shore SM, Byers SA, Maury W, Price DH (2003)** Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene* **307** 175-182
- Sievers N, Krüger M, Fischer R (2005)** Kreuzung von Aspergillus nidulans. *Biologie in unserer Zeit* **27**: 383-388



**Simon I, Barnett J, Hannett N, Harbison CT, Rinaldi NJ, Volkert TL, Wyrick JJ, Zeitlinger J, Gifford DK, Jaakkola TS, Young RA (2001)** Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell* **106**: 697-708

**Son S, Osmani SA (2009)** Analysis of all protein phosphatase genes in *Aspergillus nidulans* identifies a new mitotic regulator, *fcp1*. *Eukaryot Cell* **8**: 573-585

**Srinivasan M, Mehta P, Yu Y, Prugar E, Koonin EV, Karzai AW, Sternglanz R (2011)** The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A. *EMBO J* **30**: 873-881

**Stringer MA, Dean RA, Sewall TC, Timberlake WE (1991)** Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev* **5**: 1161-1171

**Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, Edgerton H, Xiong Y, Taheri-Talesh N, Osmani SA, Oakley BR (2006)** Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**: 3111-3120

**Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R (2008)** Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 339-351

**Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM (1992)** Structural framework for the protein kinase family. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 429-462

**Taylor SS, Kornev AP (2011)** Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* **36**: 65-77

**Waters NC, Knight JP, Creasy CL, Bergman LW (2004)** The yeast Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex has multiple substrates. *Curr Genet* **46**: 1-9

**Wieser J, Adams TH (1995)** *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* **9**: 491-502

**Wieser J, Lee BN, Fondon J, 3rd, Adams TH (1994)** Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**: 62-69

**Ye XS, Lee SL, Wolkow TD, McGuire SL, Hamer JE, Wood GC, Osmani SA (1999)** Interaction between developmental and cell cycle regulators is required for morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **18**: 6994-7001

**Yu H, King RW, Peters JM, Kirschner MW (1996a)** Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr Biol* **6**: 455-466

**Yu JH, Wieser J, Adams TH (1996b)** The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* **15**: 5184-5190

**Zehring WA, Lee JM, Weeks JR, Jokerst RS, Greenleaf AL (1988)** The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not

required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3698-3702

**Zhang J, Li G, Ye X (2010)** Cyclin T1/CDK9 interacts with influenza A virus polymerase and facilitates its association with cellular RNA polymerase II. *J Virol* **84**: 12619-12627

**Zhu Y, Pe'ery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall N, Marshall T, Amendt B, Mathews MB, Price DH (1997)** Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* **11**: 2622-2632

**Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD (2001)** Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* **30**: 892-897

## 7. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

|         |  |
|---------|--|
| alcA(p) | Promotor der Alkoholdehydrogenase          |
| BiFC    | bimolekulare Fluoreszenzkomplementation    |
| DEPC    | Diethylpyrocarbonat                        |
| IPTG    | Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid |
| NES     | Nuclear Export Signal                      |
| NLS     | Nuclear Localisation Signal                |
| ORF     | Open Reading Frame                         |
| PMSF    | Phenylmethylsulfonylfluorid                |

**Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen**

Bathe F, Kempf C, Osmani S A, Osmani A H, Hettinger S, Wohlmann E, Fischer R (2010) Functional characterization of a new member of the Cdk9 family in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **9**: 1901-12

Kempf C and Fischer R (2012) Identification of new interaction partners of the *Aspergillus nidulans* Cdk9 involved in the regulation of the asexual development (in Vorbereitung)

**Konferenzbeiträge**

03/2009                      Poster: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Bochum

03/2011                      Poster: 26th Fungal Genetics Conference, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, USA (CA)

04/2011                      Poster: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Karlsruhe

**Lebenslauf**

**Name** Claudia Kempf  
**Geburtsdatum** 30.03.1984  
**Geburtsort** Landau in der Pfalz

**Schulbildung und Studium**

3/2003 Alfred-Grosser- Gymnasium, Bad Bergzabern  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/2003 bis 04/2009 Universität Karlsruhe (TH)  
Studium der Biologie mit Abschluss Diplom

07/2008 bis 04/2009 Universität Karlsruhe (TH)  
Diplomarbeit am Institut für Angewandte Biowissenschaften –  
Abteilung Mikrobiologie  
Thema der Diplomarbeit: Identifizierung von Interaktionspart-  
nern der Zyklin-abhängigen Kinase PtkA in *Aspergillus nidu-  
lans*

05/2009 - 04/2012 Karlsruher Institut für Technologie  
Promotion  
Thema der Dissertation: Identifizierung und Untersuchung  
von Interaktionspartnern der Zyklin-abhängigen Kinase PtkA  
in *Aspergillus nidulans*

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Reinhard Fischer bedanken, der mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit gab und immer Ratschläge zur Lösung von auftretenden Problemen hatte.

Bei Jörg Kämper möchte ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Friederike Bathe bedanken, die mich zu Beginn meiner Promotion betreut hat.

Als nächstes möchte ich mich bei meinen Kollegen aus dem Fischer2-Labor, für die stets gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Maren, Julia, Kristin und Andy, welche für die Korrektur meiner Arbeit bereitstanden. Ein weiterer Dank gilt unserer guten Fee Elke.

Insbesondere möchte ich mich bei Maren bedanken, die mich während meiner gesamten Dissertationszeit begleitet hat und stets für Diskussionen bereit stand. Außerdem möchte ich mich bei Julia für ihr immer offenes Ohr bedanken.

Zum Abschluss möchte ich noch meiner Familie danken, die mich während meiner gesamten Studienzzeit unterstützt hat.