



**Untersuchung der Rolle  
des Kinesin-3 Motors UncA in  
*Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa***

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

Dipl. Biol.  
Constanze Seidel

aus  
Erfurt

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer  
Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer  
Koreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 2013



## Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Untersuchung der Rolle des Kinesin-3 Motors UncA in *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa*“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, sowie mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich gekennzeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Weiterhin habe ich die Satzungen zur guten wissenschaftlichen Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 und der Universität Karlsruhe (TH) vom 15. Januar 2002 beachtet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

(Constanze Seidel)



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 2009 bis März 2013 in der Abteilung Mikrobiologie des Instituts für Angewandte Biowissenschaften am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.



# Wissenschaftliche Veröffentlichungen

**Seidel C., Zekert N. & Fischer R. (2012).** The *Aspergillus nidulans* Kinesin-3 Tail is Necessary and Sufficient to Recognize Modified Microtubules. *PLoSOne* 7 e30976.

**Seidel C., Riquelme-Pérez M. & Fischer R. (2013).** On the role of kinesin-3 Nkin2 in endosomal transport of *Neurospora crassa*. *in Vorbereitung*

**Seidel C., Grün N. & Fischer R. (2013).** Inventory of kinesin-3 cargoes in *Aspergillus nidulans*. *in Vorbereitung*

**Zekert N., Herrero de Vega S., Grün N., Seidel C. & Fischer R. (2013).** On the role of alpha-tubulin posttranslational modifications in *Aspergillus nidulans*. *in Vorbereitung*

**Grünbacher A., Throm T., Seidel C., Vincze P., Wahlheim S., Strunk T., Wenzel W., Schimmel T. & Fischer R. (2013).** Four hydrophobins are required for full hydrophobicity of the spore surface in *Aspergillus nidulans*. *in Vorbereitung*





# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Summary</b>	<b>1</b>
<b>I. Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>II. Abkürzungen</b>	<b>5</b>
<b>III. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1. Das Mikrotubulizytoskelett</b>	<b>7</b>
<b>2. <i>Aspergillus nidulans</i> und <i>Neurospora crassa</i> als Modelle zur Untersuchung des eukaryotischen Zytoskeletts</b>	<b>9</b>
<b>3. Posttranslationale Modifikationen an Tubulinen definieren und beeinflussen die zahlreichen Funktionen von MT- Subpopulationen</b>	<b>12</b>
<b>4. Die Rolle molekularer Motoren</b>	<b>13</b>
4.1. Die Superfamilie der Kinesine	14
4.2. Kinesin-3 Familie	17
4.3. Kooperation von Kinesin-3 und Dynein im bidirektionalen Transport von Endosomen	21
4.4. Die Rolle von <i>N. crassa</i> Kinesin-3 in der Mitochondrienmotilität	23
<b>5. Vesikel- Transportmechanismen und Inhalte</b>	<b>23</b>
<b>6. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
<b>1. Untersuchung der Spezifität von UncA für eine MT- Subpopulation</b>	<b>25</b>
1.1. Eine Region im Schwanzbereich UncAs wird für die MT- Spezifität benötigt	25
1.2. Andere Proteindomänen von UncA sind nicht für die MT- Spezifität verantwortlich	29
1.3. Chimäre Motorproteine bestätigen die Rolle der Schwanzdomäne von UncA in der Erkennung der MT- Subpopulation	30
1.4. Der Schwanzbereich UncAs interagiert direkt mit $\alpha$ -Tubulin	33
1.5. Eine künstliche $\beta$ 5L8- Schleife in der Motordomäne von KinA ist für die Spezifität für die selbe MT- Subpopulation verantwortlich	35
<b>2. Charakterisierung der Cargos von UncA</b>	<b>37</b>
2.1. Gezielte Analyse potentieller UncA- Interaktoren, erweitert das Wissen über die Zusammensetzung der transportierten Vesikel	37
2.1.1. Rab-3 markierte Vesikel werden von UncA transportiert	37
2.1.2. UncA spielt eine Rolle im Transport eines in Form von Endosomen recycelten Transmembrantransporters	42
2.1.3. UncA ist an der Überführung von Vesikeln vom ER zum Golgi- Apparat beteiligt	45
2.1.4. Sekretorische Vesikel und auch RNA werden durch UncA bewegt	46
2.1.5. UncA kann auch über Dynaktin den Transport von Endosomen beeinflussen	49
2.2. Hefe- Zwei- Hybrid- Analyse identifiziert neue Interaktoren von UncA	51

2.3. Versuch der Isolierung von UncA- markierten Vesikeln mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	58
<b>3. Charakterisierung von <i>N. crassa</i> Nkin2</b>	<b>64</b>
3.1. Nkin2 lokalisiert in Vesikeln von <i>N. crassa</i>	65
3.2. Nkin2 <sup>rigor</sup> bevorzugt eine MT- Subpopulation	66
3.3. Andere Kinesine, wie Nkin3 und Nkin, zeigen keine MT- Präferenz	69
3.4. Etablierung eines Endosomenmarkers in <i>N. crassa</i>	70
3.5. Deletion von <i>Nkin2</i> zeigt Endosomenmotilitätsdefekte	73
<b>V. Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>1. Eine neue Funktion der UncA- Schwanzdomäne</b>	79
1.1. Die MT- Spezifität von Kinesin-3 ist auch in <i>N. crassa</i> konserviert	79
1.2. Kinesin-3 bevorzugt MT- Subpopulationen, aber wie?	80
1.3. Der <i>neck linker</i> wird als strukturelles Element für die MT- Bindung benötigt	83
1.4. Ein Modell zur Erkennung der modifizierten MT durch UncA	84
1.5. Ist die MT- Modifikation, die durch UncA erkannt wird artifiziell oder tatsächlich eine posttranslationale Modifikation?	85
<b>2. Dem Transportgut von Kinesin-3 ein Stück näher - neu identifizierte Interaktoren von UncA und Nkin2</b>	89
2.1. Rab3 definiert Vesikel für UncA- abhängigen Transport	90
2.2. UncA ist in Transporte während der Reifung sekretorischer Vesikel und deren finalen Transport zur Hyphenspitze involviert	91
2.3. UncA ist auch an Exo- und Endozytosevorgängen beteiligt	92
2.4. UncA- vermittelte Transportprozesse - ein zusammenfassendes Modell	93
<b>3. Kinesin-3 hat in verschiedenen Organismen eine konservierte Rolle</b>	<b>94</b>
<b>VI. Material und Methoden</b>	<b>97</b>
<b>1. Chemikalien und Materialien</b>	<b>97</b>
<b>2. Geräte</b>	<b>97</b>
<b>3. Organismen</b>	<b>98</b>
3.1. <i>Aspergillus nidulans</i> Stämme	98
3.2. <i>Neurospora crassa</i> Stämme	105
3.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	106
3.4. <i>Escherichia coli</i> Stämme	107
<b>4. Plasmide</b>	<b>107</b>
<b>5. Kultivierung der Organismen</b>	<b>113</b>
<b>6. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>119</b>
<b>7. Biochemische Methoden</b>	<b>137</b>
<b>8. Mikroskopische Methoden</b>	<b>141</b>
<b>VII. Literatur</b>	<b>143</b>
<b>VIII. Anhang</b>	<b>161</b>

# I. Summary

Molecular motors are proteins that transform chemical energy into mechanical force. They are involved in many cellular processes, including the transport of vesicles, organelles and proteins, as well as the movement of chromosomes. At least four motor proteins, myosin, conventional kinesin, dynein and kinesin-3 UncA, are required for polarized tip growth of filamentous fungal hyphae. UncA transports endosomes, and notably, the traffic of these vesicles occurs along a specific microtubule (MT) bundle, which is most likely composed of deetyrosinated  $\alpha$ -tubulin. This MT is more stable compared to cytoplasmic MTs. This is the first example of the existence of different MT populations in filamentous fungi and the second example for the specificity of a kinesin-3 motor towards modified MTs. A 86 amino acid stretch in the tail of UncA is required for the specificity. Other motor proteins such as conventional kinesin KinA (kinesin-1), KipA (kinesin-7) and KipB (kinesin-8), do not exhibit MT specificity.

In the present study the specificity of UncA was further characterized. Using different chimeric motor proteins composed for instance of the motor domain of conventional kinesin KinA and the tail region of UncA it was shown, that the tail of UncA is not only essential but also sufficient for mediating MT specificity. Furthermore, a direct interaction of the C-terminal tail of UncA with both  $\alpha$ -tubulins, TubA and TubB, has been demonstrated by Bimolecular fluorescence complementation and yeast-two-hybrid analyses (Y2H).

It has been shown in neurons that conventional kinesin exhibits a preference for deetyrosinated MTs and that this specificity is mediated by a short region in its motor domain ( $\beta$ 5L8 loop). Modification of this certain loop in *A. nidulans* KinA, which generally interacts with all MTs, induced MT specificity like in UncA. These results provide new evidence that this MT subpopulation is indeed composed of deetyrosinated MTs.

Through comparative studies of the kinesin-3 motor Nkin2 from *N. crassa* I demonstrated that this Nkin2 also exhibits a preference for modified MTs. Furthermore, a new function for this motor protein could be assigned. In addition to the previously described role of Nkin2 in mitochondrial movement in *N. crassa*, I could also show that Nkin2 is involved in the bidirectional movement of endosomes, which is in agreement with findings in *A. nidulans* and *U. maydis*. *nkin2* gene deletion mutants of *N. crassa* showed growth as well as germination related defects. With the newly developed endosomal marker Ypt52 I could demonstrate that the endosomal motility in  $\Delta nkin2$  was strongly reduced, and therefore lead to the observed accumulations at the tip apex.

To identify additional components of the UncA transport complex several approaches, including sucrose density gradient centrifugation, Y2H analysis and targeted interaction and colocalization tests have been employed, and revealed that in addition to endosomes UncA

also mediates transport of RNA and secretory vesicles, and thus has an active role in both exo- and endocytosis.

# I. Zusammenfassung

Molekulare Motoren sind Proteine, die chemische Energie in mechanische Kraft umwandeln. Sie sind an vielen zellulären Prozessen, wie dem Vesikel-, Organell- und Proteintransport und der Chromosomenbewegung beteiligt. Bislang wurden drei Familien molekularer Motoren charakterisiert: Während Myosine mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind, nutzen Dyneine und Kinesine Mikrotubuli (MT), um ihre Fracht zu transportieren. In filamentösen Pilzen sind mindestens vier Motoren, Myosin, konventionelles Kinesin, Dynein und UncA für das polare Wachstum wichtig. UncA transportiert Endosomen und interessanter Weise erfolgt der Transport dieser Vesikel entlang eines speziellen MT, der wahrscheinlich detyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin enthält und wesentlich stabiler als die anderen zytoplasmatischen MT ist. Dies ist das erste Beispiel für die Existenz verschiedener MT- Populationen in filamentösen Pilzen und das zweite Beispiel für einen Kinesin-3 Motor, der solch eine MT-Spezifität zeigt. Für die Spezifität von UncA ist dabei eine 86 Aminosäuren lange Region im C-Terminus des Kinesins notwendig. Andere Motoren wie konventionelles Kinesin KinA (Kinesin-1), KipA (Kinesin-7) und KipB (Kinesin-8) weisen keine derartige Spezifität auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Spezifität von UncA genauer untersucht. Anhand verschiedener chimärer Motorproteine, die beispielsweise aus der Motordomäne des konventionellen Kinesins KinA und dem C-Terminus von UncA zusammengesetzt sind, wurde gezeigt, dass der C-Terminus von UncA für die Vermittlung der Spezifität nicht nur notwendig, sondern ausreichend ist. Anschließend wurde eine direkte Interaktion des UncA C-Terminus mit beiden  $\alpha$ -Tubulinen, TubA und TubB, sowohl mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation, als auch mit Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen (Y2H) nachgewiesen.

In Neuronen wurde gezeigt, dass konventionelles Kinesin eine Präferenz für detyrosinierte MT hat und dass die Spezifität durch eine kurze Region in der Motordomäne ( $\beta$ 5L8-Schleife) vermittelt wird. Durch eine gezielte Modifikation dieser Schleife in *A. nidulans* KinA, welches normalerweise alle MT in der Zelle für Transportvorgänge nutzt, konnte eine Präferenz zu der selben, ebenfalls durch UncA erkannten, MT-Subpopulation erzeugt werden. Diese Ergebnisse sind weitere Hinweise, dass es sich bei dieser MT-Subpopulation tatsächlich um detyrosinierte MT handelt.

Durch vergleichende Untersuchungen des Kinesin-3 Motors aus *N. crassa* wurde gezeigt, dass auch dieser Motor eine Präferenz für modifizierte MT besitzt. Außerdem konnte dem Motor eine neue Funktion zugeordnet werden. Neben der bereits beschriebenen Rolle von NKin2 in der Mitochondrienbewegung von *N. crassa*, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Nkin2 zusätzlich, wie auch dessen Homologe in *A. nidulans* und *U. maydis*, im bidirektionalen Transport von Endosomen involviert ist. *Nkin2* Deletionsmutanten von

*N. crassa* wiesen sowohl Wachstums-, als auch Keimungsdefekte auf. Mit dem in dieser Arbeit neu etablierten Endosomenmarker Ypt52 wurde beobachtet, dass die Endosomenmotilität in  $\Delta nkin2$  sehr stark reduziert ist und es folglich zu Akkumulationen am Apex kommt.

Zur Erweiterung des Repertoires der bisher bekannten Cargos, die durch UncA transportiert werden, wurden mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, Y2H-Analysen, sowie gezielten Interaktions- und Kolo-kalisierungstests versucht, neue Komponenten der UncA-Transportmaschinerie zu identifizieren. Hierbei wurde gezeigt, dass UncA neben Endosomen auch RNA und sekretorische Vesikel befördert und demnach sowohl an Exo- als auch Endozytoseprozessen beteiligt ist.

## II. Abkürzungsverzeichnis

<i>alcA(p)</i>	Promotor der Alkoholdehydrogenase aus <i>A. nidulans</i>
Amp	Ampicillin
BiFC	Biomolekulare Fluoreszenzkomplementation
BLAST	“basic local alignment search tool”
BSA	Rinderserum- Albumin
<i>ccg-1(p)</i>	Promotor des <i>clock-controlled gene 1</i> aus <i>N. crassa</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2'- Phenyldoldihydrochlorid
DIC	differenzielle Phasenkontrast- Mikroskopie
DIG	Digoxigenin
EE	frühe Endosomen
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTPase	Guanosintriphosphatase
Hyg	Hygromycin
Kan	Kanamycin
MAPs	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
mRNA	„messenger“ RNA
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
NAT	Nourseothricin
ORF	offener Leserahmen
PTM	posttranslationale Modifikation
RFP	rot fluoreszierendes Protein
WT	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galactosid
YFP	gelb fluoreszierendes Protein





## III. Einleitung

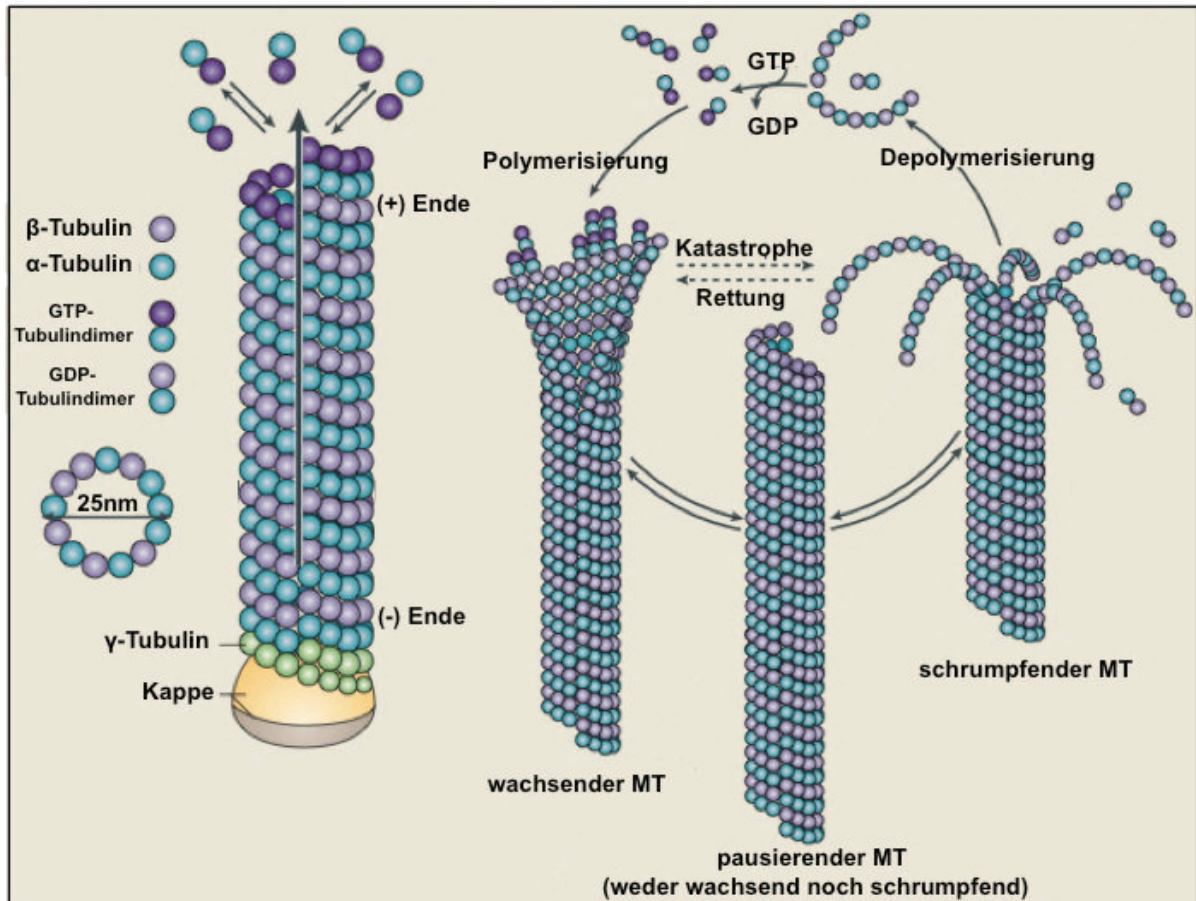
Die räumliche Organisation der Bewegung, Zellform und des Lebenszyklus eukaryotischer Zellen wird von einem komplexen Netzwerk von Filamenten kontrolliert, dem Zytoskelett. Das Zytoskelett besteht aus Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli (MT). Das Aktinzytoskelett spielt bei Endozytoseprozessen, Sekretion und Membranfusionen eine zentrale Rolle und ist vorrangig in der Zellperipherie und entlang von Membranen zu finden (Araujo-Bazan *et al.*, 2008; Upadhyay & Shaw, *et al.*, 2008; Berepiki *et al.*, 2010). Intermediärfilamente hingegen durchziehen das gesamte Zytoplasma mit einem Netzwerk und erhöhen damit die mechanische Stabilität und vermitteln auch Zell-Zell-Verbindungen (Eriksson *et al.*, 2009). Mit einem äußeren Durchmesser von 25nm bilden die MT die größte Komponente des Zytoskeletts. Entlang dieser erfolgt zum einen der Langstreckentransport, was in manchen Neuronen vom Zellkörper zu den Synapsen Transporte länger als einen Meter bedeuten kann (Sheetz *et al.*, 1989), zum anderen aber natürlich auch viele strukturelle Aufgaben der Zelle. Im Folgenden wird auf den Aufbau der MT näher eingegangen, da entlang dieser Strecken mit Hilfe der Motorproteine Organellen und Vesikel transportiert werden, ein Vorgang, der in dieser Arbeit näher charakterisiert werden soll.

### 1. Das Mikrotubulizytoskelett

MT setzen sich aus  $\alpha\beta$ - Tubulin- Heterodimeren zusammen, welche die Grundeinheit bilden und sich längsgerichtet alternierend zu Protofilamenten zusammenlagern. 13 circular angeordnete Protofilamente bilden jeweils einen hohlen Tubulus mit 25nm Durchmesser (Wade *et al.*, 2007). Das  $\gamma$ -Tubulin enthaltende MTOC (Mikrotubulus- Organisationszentrum) agiert hierbei als MT- Nukleationszentrum (Wiese & Zheng, 2006; Zekert *et al.*, 2010) und stellt gleichzeitig durch Interaktion mit  $\alpha$ -Tubulin das sogenannte (-) Ende des Tubulus dar. Im Gegensatz zu dem eher stabilen (-) Ende, werden am (+) Ende kontinuierlich weitere  $\alpha\beta$ - Dimere angelagert, so dass eine dynamische Instabilität durch stochastische Wechsel zwischen Wachstums- und Schrumpfphasen gewährleistet wird (Conde & Cáceres, 2009) (**Abb. 1**). Das Polymerisieren wird durch das Binden von GTP in die Nukleotid-Austauschstelle (*E-site*) von  $\beta$ -Tubulin ermöglicht (Heald & Nogales, 2002). Die Polymerisationsrate hängt demnach unter anderem von der zellulären  $\alpha\beta$ - Tubulinkonzentration ab, wird aber auch durch andere Faktoren reguliert, die im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

Die dynamische Instabilität ist ein zentraler Punkt, der die zahlreichen Funktionen der MT, wie beispielsweise Mitose, Zellpolarität, Sekretion und Aufrechterhaltung der Zellform, erlaubt. In der Zelle gibt es verschiedene Möglichkeiten die Dynamik der MT zu regulieren. Zum einen gibt es so genannte +TIP Proteine (*MT Plus end tracking proteins*), die spezifisch

am (+) Ende der MT akkumulieren und dort die MT- Wachstumsrichtung, -Dynamik und Interaktionen mit Zellkortexproteinen beeinflussen (Jaworski *et al.*, 2007). Weiterhin gibt es MT- destabilisierende Proteine, wie beispielweise SGC10 (*superior cervical ganglia neural-specific 10 protein*) und das SGC10-ähnliche Protein SCLIP, welche die Rate der MT- Katastrophen deutlich erhöhen können (Grenningloh *et al.*, 2004). Zum anderen gibt es MAP- Proteine (**M**ikrotubuli- **a**ssoziierte **P**roteine), die die MT direkt stabilisieren oder auch vor der Depolymerisierung durch andere Proteine schützen können (Qiang *et al.*, 2006).



**Abbildung 1: MT- Aufbau und dynamische Instabilität.** Ein Protofilament setzt sich aus  $\alpha\beta$ -Tubulindimeren zusammen, wobei das  $\beta$ -Tubulinmonomer (lila) jeweils in Richtung des dynamischeren (+) Endes gerichtet ist, das  $\alpha$ -Tubulinmonomer (blau) hingegen zum langsamer wachsenden (-) Ende. Eine dritte Tubulinisoform, das  $\gamma$ -Tubulin (grün), fungiert als Startpunkt für die Assemblierung des Mikrotubulus. Die dynamische Instabilität erfolgt mit Hilfe einzelner Tubulinmoleküle mit fest gebundenem GTP, die sich an das (+) Ende anlagern, wodurch dieses wächst (Polymerisierung). Nach kurzer Zeit wird das GTP per Hydrolyse zu GDP abgebaut, bleibt aber an den Tubulus gebunden. Dadurch entsteht eine Kappe aus GTP- Tubulinen am (+) Ende des MT, auf die in Richtung des (-) Endes eine lange Kette aus GDP- Tubulinen folgen. Der Abbau (Depolymerisierung) findet statt, wenn die Hydrolyse schneller voranschreitet als neues GTP- Tubulin gebunden wird. In diesem Fall kann es passieren, dass das GTP des letzten Tubulinmoleküls in der Kette zu GDP zerfällt, wodurch der Mikrotubulus rapide depolymerisiert (Katastrophe). Die Depolymerisierung wird erst dann unterbrochen, wenn ein neues GTP-Tubulin an den zerfallenden Strang bindet und sich eine neue GTP-Tubulin-Kappe ausbilden kann. Abbildung modifiziert nach Conde & Cáceres, 2009.

## 2. *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* als Modelle zur Untersuchung des eukaryotischen Zytoskeletts

### *A. nidulans*

Der filamentöse Ascomyzet *A. nidulans* wird schon seit mehreren Jahrzehnten intensiv studiert und ist vor allem als Modellorganismus innerhalb der Gattung *Aspergillus* von großer Bedeutung. Zur Gattung *Aspergillus* gehören aber auch humanpathogene Arten wie *A. fumigatus* und *A. flavus*. Bei immunsupprimierten Menschen, beispielsweise hervorgerufen durch starke medikamentöse Behandlungen nach Chemotherapien, Transplantationen oder HIV Infektion, aber auch bei Asthmapatienten sind Aspergillosen häufig auftretende Erkrankungen, welche jedoch hauptsächlich durch den humanpathogenen Verwandten *A. fumigatus* verursacht werden. Über eine Primärinfektion über die Lunge kann nahezu jedes Organ befallen werden und solche Infektionen verlaufen häufig tödlich (Richardson & Kokki, 1999; Fisher *et al.*, 2012). Auch die Überschreitung von weltweit eingeführten Grenzwerten von Aflatoxinen, welche vorwiegend durch *A. flavus* und *A. parasiticus* gebildet werden, wird in Lebensmitteln wie Getreide, Reis, Pistazien, Erdnußbutter, Ölen und sogar in Kosmetika immer wieder gemeldet (Leong *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009). Eine immense wirtschaftliche Bedeutung erlangten die *Aspergillen* durch biotechnologische Produktion unterschiedlicher Zusatzstoffe und Enzyme wie Zitronensäure und Lactasen ("Weiße Biotechnologie"), aber auch in Fermentationsprozessen, wie der Gärung von Sake durch *A. oryzae* (Sun *et al.*, 2009; Kniemeyer, 2011).

*A. nidulans* spielt auch als Modell für eukaryotische Zellbiologie eine wichtige Rolle in der Grundlagenforschung. Untersuchungen der Mitose und des Zellzyklus, aber auch motorenabhängige Kern- und Organellbewegung wurden intensiv in *A. nidulans* studiert (Morris *et al.*, 1989; Morris *et al.*, 1992; Osmani & Ye, 1996). Ausserdem wurden in den 1970 und 1980er Jahren alle Tubulingene als erstes in *A. nidulans* entdeckt und beschrieben (Sheir-Neiss *et al.*, 1978, Morris *et al.*, 1979; Weil *et al.*, 1986; Oakley & Oakley, 1989). Seit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins GFP für *in vivo* Untersuchungen intrazellulärer Bewegungen von Organellen und Proteinen, mit Hilfe der Expression GFP-markierter Fusionsproteine, hat sich *A. nidulans* zu einem hervorragenden zellbiologischen Modellorganismus etabliert (Suelmann *et al.*, 1997).

Ein Forschungsschwerpunkt in unserer Gruppe liegt in der Untersuchung MT-abhängiger Transportmechanismen. Die Vorgänge sind bis zum Neuron konserviert und Defekte resultieren dort in neurogenerativen Krankheiten und Störungen in der Neuronalentwicklung (Hirokawa *et al.*, 2010).

***N. crassa***

*N. crassa*, ein weiterer Ascomyzet, gehört auf Grund des 2003 als erstes entschlüsselten Genoms eines Hyphenpilzes (Galagan *et al.*, 2003), der Verfügbarkeit vieler Mutanten und der rasch fortschreitenden Entwicklung in der mikroskopischen Bildgebung zusammen mit *A. nidulans* zu den bisher best untersuchtesten Modellsysteme in dem Forschungsfeld rund um die Zell- und Molekularbiologie niederer Eukaryoten. Schon in den 1940er Jahren wurde *N. crassa* von Tatum und Beadle als Modellorganismus verwendet, welche dann 1958 für deren bahnbrechende "Ein-Gen-Ein-Enzym-Hypothese" mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden. Während es in *A. nidulans* bei der sexuellen Entwicklung durch Hyphenfusion oder Selbstbefruchtung zur Bildung von Kleistothecien kommt, in denen anschließend meiotische Ascosporen gebildet werden, entwickelt *N. crassa* männliche (Trichogyne) und weibliche (Acogone) Strukturen zur Fruchtkörperbildung. Der vorwiegend haploide Lebenszyklus ermöglicht, wie auch in *A. nidulans*, eine direkte Analyse von Mutationen und deren Auswirkungen. Mit Untersuchungen der Lichtrezeption, circadianen Rhythmik, sowie DNA Reperatur, Rekombination und der polaren Wachstumsmaschinerie wurden relevante Forschungsergebnisse erstmals in *N. crassa* beschrieben (Dunlap *et al.*, 2007; Bokovich *et al.*, 2004; Seiler & Plamann, 2003; Davis, 2000; Riquelme *et al.*, 1998).

Unter den 28 bisher morphologisch unterschiedlich beschreibenden Strukturen (Bistis *et al.*, 2003) können mehr als sechs als Hyphe bezeichnet werden (Riquelme *et al.*, 2011). Darunter zählen die Primärhyphen (*leading hyphae*, schnell wachsende Führungshyphen mit subapikalen Verzweigungen), Verzweigungen von Primärhyphen, Fusionshyphen und CATs (*conidial anastomosis tubes*), welche als Brücke zwischen Hyphe und den Konidien fungieren. Des Weiteren Lufthyphen (notwendig zur Makrokonidienbildung), *trunk* Hyphen (im Innern der Kolonie) und zur sexuellen Vermehrung benötigte Hyphen, Ascogone und Trichogyne. *N. crassa* weist mit bis zu 18  $\mu\text{m}/\text{min}$  eine unglaubliche Wachstumsgeschwindigkeit auf, mit der unterschiedlichste Habitate schnell erschlossen werden können (Collinge & Trinci, 1974).

Eine intensiv untersuchte Struktur von *N. crassa* stellt der Spitzenkörper dar, welcher aus einem Kern aus Mikrovesikeln und apikalen Makrovesikeln, sowie Ribosomen und Aktinmikrofilamenten besteht (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989; Riquelme *et al.*, 2007; Verdín *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass die Fusion sekretorischer Vesikel aus dem Spitzenkörper mit der Plasmamembran an der Hyphenspitze hier koordiniert wird. Mit dem Zeitalter der fluoreszent markierten Proteinen gelang es zwei unabhängigen Gruppen 2001 und 2002 auch dieses System erstmals in *N. crassa* zu etablieren (Freitag *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2002).

Zusammenfassend ist zu festzuhalten, dass filamentöse Pilze einige negative Aspekte, wie Kontamination von Lebensmitteln und der Pathogenität gegenüber Pflanzen

und Menschen, aber auch enorm Positives, wie dem gezielten Einsatz in der Biotechnologie, vereinen. Weiterhin stellen sie wie oben erwähnt exzellente Modellorganismen dar um zelluläre eukaryotische Prozesse zu erforschen und zu verstehen. Zu den Anwendungsgebieten zählen unter anderem die Entwicklung von Fungiziden, aber auch die gezielte Produktion von Enzymen, sowie natürlich der Grundlagenforschung, an der mehrere Laboratorien weltweit beteiligt sind.

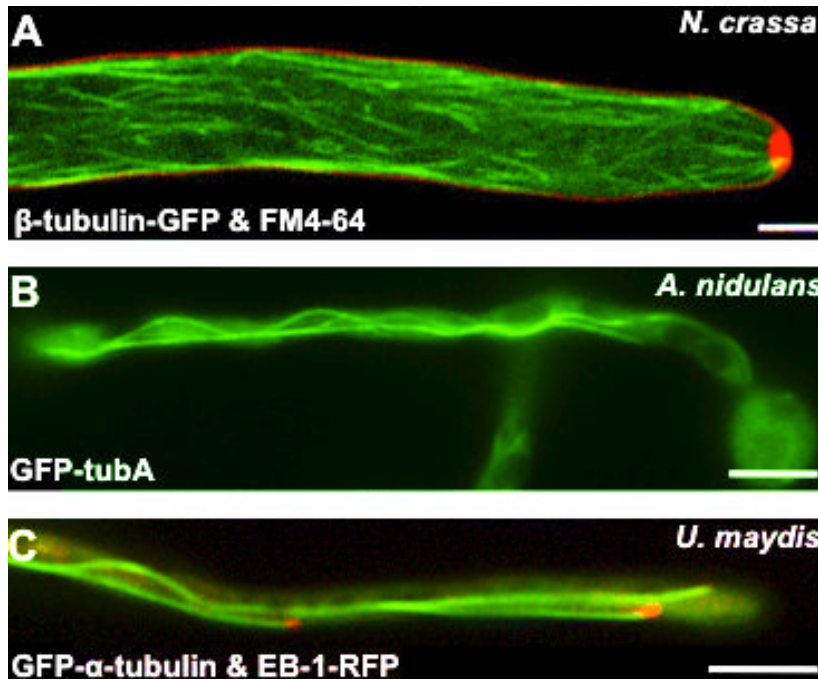
### Tubuline in Ascomyceten - eine intensiv studierte Proteinfamilie

Im Genom von *A. nidulans* kodieren zwei Gene für  $\alpha$ -Tubulin (*tubA*, *tubB*), zwei für  $\beta$ -Tubulin (*benA*, *tubC*) und eines für  $\gamma$ -Tubulin (*mipA*) (**Tab. 1**). Das vorrangig exprimierte  $\alpha$ -Tubulin, TubA, wird hauptsächlich im vegetativen Wachstum gebildet, wohingegen TubB sehr stark und fast ausschließlich während der sexuellen Entwicklung exprimiert wird (Kirk & Morris, 1993). Obwohl die Deletion von *tubB* nicht lethal ist, kann sich dieser Stamm nicht mehr sexuell reproduzieren, dieser Defekt konnte jedoch zum Teil durch Überexpression von *tubA* wiederhergestellt werden (Kirk & Morris, 1991; Kirk & Morris, 1993). Auch bei den beiden  $\beta$ -Tubulinen wird ein Tubulin, BenA, bevorzugt gebildet und TubC spielt lediglich eine nicht-essentielle Rolle während der Konidienbildung (Sheir-Neiss *et al.*, 1978; May *et al.*, 1985).  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline gehören zu den mit am stärksten konservierten eukaryotischen Proteinen überhaupt.

**Tabelle 1: Tubulin- Superfamilie in *A. nidulans*, *N. crassa*, *U. maydis* und *S. cerevisiae***

Tubulin	<i>A. nidulans</i>	<i>N. crassa</i>	<i>U. maydis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
$\alpha$ -Tubulin	TubA, TubB	Tba-1, tba-2	Tub1	Tub3, Tub1
$\beta$ -Tubulin	BenA, TubC	Tub-2	UM10558, UM05828	Tub2
$\gamma$ -Tubulin	MipA	Tbg	Tub2	Tub4

Mit Hilfe zahlreicher GFP- Fusionen wurde das Zytoskelett einiger filamentöser Pilze bereits detailliert untersucht und charakterisiert. Interessant ist hierbei, dass das MT- Netzwerk *N. crassas*, visualisiert durch  $\beta$ -Tubulin-GFP, deutlich komplexer ausgebildet ist, als in den beiden verwandten filamentösen Pilzen *A. nidulans* und *U. maydis* (Freitag *et al.*, 2004; Sampson & Heath, 2005; Mouriño-Perez *et al.*, 2006) (**Abb. 2**). Die zytoplasmatischen MT *N. crassas* sind meist einzelne, aber auch manchmal gebündelte, längsverlaufende Filamente, die helikale Biegungen aufweisen und sich auch untereinander verflechten können. Wohingegen in *A. nidulans* und *U. maydis* mit drei bis sieben die Anzahl der MT pro Hyphenkompartiment deutlich geringer ausfällt (Zhang *et al.*, 2003; Konzack *et al.*, 2005; Schuchardt *et al.*, 2005) und die MT (+) Enden vorrangig zur Hyphenspitze hin gerichtet sind, während in *N. crassa* gemischte MT- Polaritäten beobachtet werden (Mouriño-Perez *et al.*, 2006).

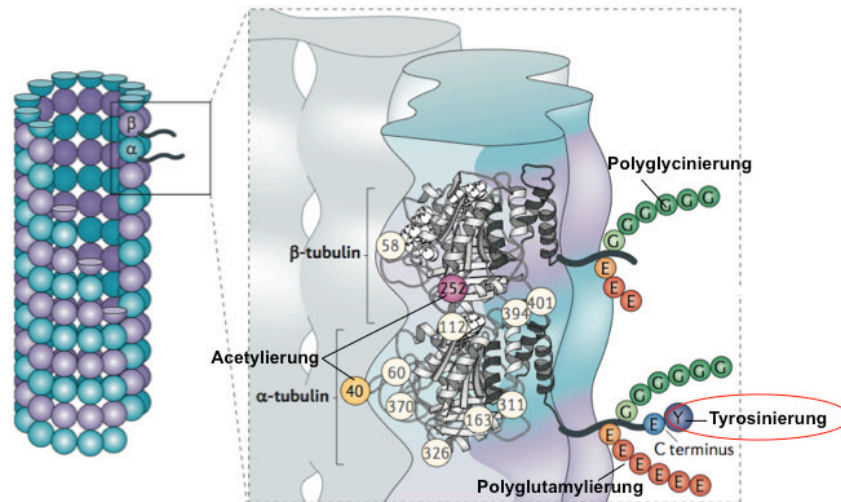


**Abbildung 2:** Ein Vergleich visualisiert das unterschiedlich ausgeprägte MT- Zytoskelett verschiedener pilzlicher Modellorganismen der Zellbiologie. (A) Die zahlreichen MT *N. crassa*s erstrecken sich netzwerkartig in den Hyphen, modifiziert nach Freitag *et al.*, 2004. Maßstab 5  $\mu\text{m}$ . (B) In *A. nidulans* Hyphen sind meist 3-8 MT- Stange in den Zellen zu beobachten, modifiziert nach Veith *et al.*, 2005. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . (C) Der pflanzenpathogene Basidiomyzete *U. maydis* weist ca. 3-5 MT auf, welche vorrangig mit dem (+) Ende zur Hyphenspitze ragen, was hier durch den (+) End-Markierer EB-1 visualisiert wurde, modifiziert nach Steinberg, 2007. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

### 3. Posttranslationale Modifikationen an Tubulinen definieren und beeinflussen die zahlreichen Funktionen von MT- Subpopulationen

Ein weiterer Mechanismus um die Spezifität der MT für spezielle Aufgaben zu gewährleisten, stellen posttranslationale Modifikationen (PTM) dar. Da, wie oben bereits erwähnt, die konservierte Struktur der  $\alpha\beta$ - Tubulindimere so wichtig für die MT- Assemblierung ist, sind die nach außen reichenden C- Termini Angriffspunkt für die meisten Modifikationen, die dann posttranslational die unterschiedlichen Tubulinisoformen definieren. Phosphorylierung, Acetylierung, Polyglycinierung, Polyglutaminierung und C-terminale Detyrosinierung gehören zu dem bisher beschriebenen Repertoire an PTM (Janke & Bulinski, 2011) (**Abb. 3**).

Wie die PTM spezifische Funktionen beeinflussen können ist bisher weitestgehend unbekannt, aber es wurde kürzlich in Neuronen gezeigt, dass ein unterschiedliches Verhältnis zwischen tyrosiniertem und detyrosiniertem  $\alpha$ -Tubulin in Axonen und Dendriten Kinesin-1 abhängigen Transport gerichtet zu Axonen navigiert (Konishi & Setou, 2009).



**Abbildung 3: Lokalisierung der unterschiedlichen PTM in polymerisierten  $\alpha\beta$ -Tubulindimeren.** Die C-Termini der Tubuline ragen nach außen und sind so zugänglich für modifizierende Enzyme. Polyglycylierung (grün) und Polyglutamylierung (rot) sind an Seitenketten des C-Terminus zu finden, wohingegen Acetylierung (gelb, pink) im Lumen der Tubuline stattfindet (die weißen Stellen repräsentieren potentielle Acetylierungspositionen). Zyklische Tyrosinierungs- und Detyrosinierungsreaktionen geschehen am C-terminal codierten Tyrosin  $\alpha$ -Tubulins (roter Kreis). Die Abbildung wurde modifiziert nach Janke & Bulinski, 2011.

Schon in den 1980er Jahren wurden in *A. nidulans* mittels 2D- Gelelektrophorese mehr Tubulinisoformen beobachtet als im Genom zu finden sind (Weatherbee & Morris, 1984). Da viele dieser Modifikationen schon in primitiven Eukaryoten wie *Gardia lamblia* konserviert sind (Campanati *et al.*, 1999), ist davon auszugehen, dass diese bereits in der frühen eukaryotischen Entwicklung entstanden sind (Weber *et al.*, 1997). In Pilzen gibt es bisher lediglich einen ersten Hinweis auf detyrosinierte MT (Zekert & Fischer, 2009), was unter anderem in dieser Arbeit nun näher untersucht werden sollte.

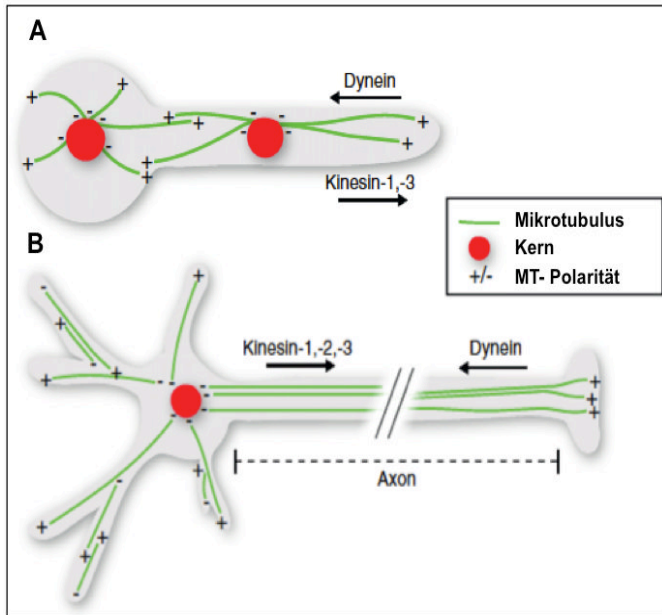
#### 4. Die Rolle molekularer Motoren

Molekulare Motoren sind Mechanoenzyme, die unterschiedlichste Bewegungsvorgänge in lebenden Organismen mit Hilfe des Zytoskeletts antreiben. Die am besten untersuchten Motoren konvertieren hierbei chemische Energie durch ATPase- Aktivitäten in mechanische Energie und sind dadurch an einer Vielzahl von zellulären Funktionen beteiligt, wie beispielsweise dem Vesikel-, Ribonukleinsäure- und Organelltransport, der Steuerung der Zytoskelettdynamik, Morphogenese, Spindelbildung, Kern- und Chromosomenbewegung und sogar der Signaltransduktion (Verhey & Rapoport, 2001). Auch gibt es Hinweise, dass die MT- abhängigen Motoren regulierend auf die dynamische Instabilität der Mikrotubuli wirken können (Uchida *et al.*, 2007).

Bislang wurden drei Superfamilien molekularer Motoren, Kinesin, Dynein und Myosin, charakterisiert. Kinesine und Dyneine benutzen MT und vermitteln so hauptsächlich den Langstreckentransport. Myosinmotoren hingegen wandern entlang Aktin und gewährleisten so primär Kurzstreckentransportvorgänge. Um das komplexe Zusammenspiel des

Zytoskeletts und der Motorproteine im Hinblick auf Vesikeltransport zu verstehen, werden momentan systematisch einzelne Komponenten der Transportmaschinerie analysiert.

Wie auch in Dendriten und Axonen in Neuronen höherer Eukaryoten, gibt es auch in *A. nidulans* Regionen, in denen spezifisch polarisierte MT- Orientierungen vorkommen (**Abb. 4**). Filamentöse Pilze sind daher ideale Modellsysteme um den konservierte MT- abhängige Transportvorgänge zu untersuchen, was in multizellulären und komplexeren Organismen deutlich vielschichtiger betrachtet werden muss (Egan *et al.*, 2012).



**Abbildung 4: Analogien in Transportmechanismen zwischen Neuronen und Pilzfilamenten.** (A) *A. nidulans* Keimlinge enthalten in der Region vom letzten Kern zur Hyphenspitze einheitlich orientierte MT mit dem (+) Ende in Richtung Wachstumsrichtung und dem (-) Ende an den SPBs/ MTOCs. Kinesin-1 und Kinesin-3 Motoren vermitteln den (+) End gerichteten Transport zum Apex, wohingegen Dynein Transporte zum (-) Ende vollzieht. (B) Neuronen von Säugern enthalten in den Axonen unipolar orientierte MT, in denen das (+) Ende in Richtung des synaptischen Spaltes ragt. Transporte zur Synapse hin werden durch Kinesin-1, -2 und -3 geregelt; der Transport in Richtung Zellkörper jedoch vorrangig durch Dynein, also (-) End gerichtet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Egan *et al.*, 2012.

#### 4.1. Die Superfamilie der Kinesine

Kinesine werden mittlerweile in 14 Familien eingeteilt, deren Nomenklatur erst kürzlich redefiniert wurde (Dagenbach & Endow, 2004; Lawrence *et al.*, 2004). Das Zuordnen eines Kinesins zu einer der zahlreichen Familien wird mit Hilfe der hoch konservierten Sequenz der Motordomäne definiert. Kinesine unterscheiden sich unter anderem durch die Direktionalität, welche anhand der Lage der Motordomäne im Protein determiniert wird. Kinesine mit der Motordomäne am aminoterminalen Ende (N-Typ) bewegen sich Richtung (+) Ende, am carboxyterminalen Ende lokalisierte Kinesinmotoren (C-Typ) zum (-) Ende und solche, deren Motor in der Mitte (I-Typ) liegt, destabilisieren MT. Es wurde aber auch gezeigt, das Kinesin-8 und Kinesin-14 sich sowohl entlang von MT bewegen, diese aber auch destabilisieren können (Varga *et al.*, 2006; Mayr *et al.*, 2007). Die Familien vollziehen unterschiedlichste Aufgaben, welche in Tabelle 2. aufgelistet werden (**Tab. 2**) (Verhey & Hammond, 2009).



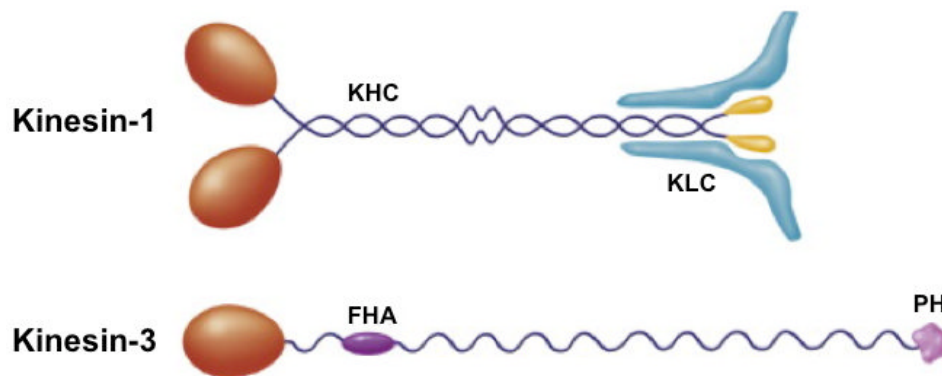
**Tabelle 2: Übersicht über Kinesine in unterschiedlichen Pilzmodellsystemen.**

Kinesin Superfamilie	<i>A. nidulans</i>	<i>N. crassa</i>	<i>U. maydis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
<b>Kinesinanzahl</b>	11	10	10	6	9
<b>Kinesin-1</b> (Vesikel-, Organell- und mRNA- Transport)	KinA	Nkin	Kin-1	-	Klp3
<b>Kinesin-3</b> (Vesikel-, Organell- und mRNA- Transport)	UncA, UncB	Nkin2, Nkin3	Kin-3	-	-
<b>Kinesin-4</b> (Chromosomenpositionierung)	AN6875	Nc06832	Kin-4	-	-
<b>Kinesin-5</b> (SPB- Positionierung)	BimC	Nc00927	Kin-5	Cin8, KIP1	Cut7
<b>Kinesin-6</b> (Spindelassemblierung und Zytokinese)	AN3124	Nc05180	Kin-6	-	Klp9
<b>Kinesin-7</b> (Kinetochor- MT-Befestigung und Chromosomenkongression)	KipA	Nc02626	Kin-7a, Kin-7b	KIP2	Tea2
<b>Kinesin-8</b> (Chromosomenkongression)	KipB	Nc06144	Kin-8	KIP3	Klp5, Klp6
<b>Kinesin-10</b> (Chromosomenpositionierung)	AN3721	Nc05028	-	-	-
<b>Kinesin-14</b> (SPB- Organisation und Vesikeltransport)	KlpA	Nc04581	Kin-14	Kar3	Pkl1, Klp2
<b>Orphans</b>	AN3970	-	Kin9	Smy1	Klp8

Die Anzahl an Kinesinen variiert von sechs in *S. cerevisiae* und neun in *S. pombe* und zehn und elf in *N. crassa* und *A. nidulans* (Schoch *et al.*, 2003)(**Tab. 2**). Höhere Eukaryoten enthalten deutlich mehr Kinesine; in Säugetieren beispielsweise codieren 45 Gene für Kinesine, von denen 38 spezifisch im Hirngewebe exprimiert werden und in Transportvorgängen in Axonen und Dendriten involviert sind (Miki *et al.*, 2001) und allein 15 für unterschiedliche Kinesin-1, -2 und -3 Mitglieder kodieren (Hirokawa *et al.*, 2009).

Die Struktur und Funktionalität der Motorproteine variiert stark zwischen den verschiedenen Familien. Konventionelles Kinesin (Kinesin-1), das erste identifizierte und auch bisher am besten charakterisierte Motorprotein, ist beispielsweise ein Tetramer, das aus zwei schweren Ketten (KHC), die für die Motoraktivität verantwortlich sind, und aus zwei leichten Ketten (KLC) besteht, die die Aktivität des Komplexes regulieren und diesen mit dem Vesikel oder Transportgut verbinden (Verhey *et al.* 1998; Schliwa & Woehlke, 2003)

**(Abb. 5).** Bei Kinesinen bewirkt die Hydrolyse ATPs eine kleine Konformationsänderung konservierter Strukturelemente in unmittelbarer Nähe der ATP- Bindestelle, was wiederum zu weiteren koordinierten Strukturveränderungen in der MT- Bindestelle führt, welche durch Wechselwirkung mit Elementen des C-Terminus mechanisch verstärkt werden. (Vale & Milligan, 2000; Schliwa & Woehlke, 2001). Chemische Energie wird auf diese Weise in gerichtete Bewegung umgesetzt. Auch wurde anhand einiger Beispiele gezeigt, dass Kinesine zum Teil autoinhibitorisch reguliert wirken können (Seiler *et al.*, 2000; Espeut *et al.*, 2008).



**Abbildung 5: Strukturbeispiele von Mitgliedern der Kinesin-1 und Kinesin-3 Superfamilie.** (A) Der Kinesin-1 Komplex wird aus zwei schweren Ketten (KHC) und zwei leichten Ketten (KLC) gebildet. (B) Kinesin-3 Mitglieder gehören zu den monomeren Motoren, welche am C-terminalen Ende eine PH- Domäne besitzen, die zur Bindung des jeweiligen Transportguts benötigt wird und zum anderen die FHA- Domäne, die in Protein- Protein- Interaktionen eine Rolle spielt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Hirokawa *et al.*, 2010.

Bisher wurde gezeigt, dass drei Kinesinfamilien (1, 3 und 7) im polaren Wachstum filamentöser Pilze involviert sind (Seiler *et al.*, 1997; Konzack *et al.*, 2005; Zekert & Fischer, 2009; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Mitglieder der Kinesin-1 Familie sind in unterschiedlichste Prozesse wie Vesikeltransport, Kernpositionierung, mitochondriale Motilität und Vakuolenverteilung involviert (Seiler *et al.*, 1997; Lehmler *et al.*, 1997; Requena *et al.*, 2001). Untersuchungen zeigen, dass Deletionen in solchen Kinesinen in drastischen Defekten resultieren. Das Entfernen des konventionellen Kinesins, Nkin, führt beispielsweise in *N. crassa* zu mehreren morphologischen Veränderungen der Hyphe, wie stark beeinträchtigtem polarem Wachstum und einem erhöhten Verzweigungsmuster. Besonders der anterograde Transport von Vesikeln zur Hyphenspitze ist in der *nkin*- Deletionsmutante stark reduziert, was dazu führt, dass kein Spitzenkörper aufgebaut werden kann (Seiler *et al.*, 1997; Seiler *et al.*, 1999). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine dramatische Reduktion von apikalen Vesikeln, was darauf hinweist, dass der anterograde Langstreckentransport am stärksten betroffen ist und zum unkoordiniertem Positionieren kleinerer sekretorischer Vesikel führt, was sich auch in einer stark verminderten Proteinsekretion ins Medium niederschlägt. Die retrograde Bewegung der Vesikel hingegen ist kaum betroffen, ganz im Gegensatz zu der Dyneinmutante, welche einen Spitzenkörper

ausbilden kann und deren anterograde Transportmaschinerie nicht beeinträchtigt ist, jedoch im antagonistischen Rücktransport schwere Defizite aufweist (Seiler *et al.*, 1997).

Entwicklungsspezifische Aufgaben der Motoren wurden bisher in filamentösen Pilzen nicht beschrieben, jedoch geben Ergebnisse dieser Arbeit und der Beobachtungen von MT-Subpopulationen in *A. nidulans* (Zekert & Fischer, 2009) Anlass dies im Detail zu untersuchen.

## 4.2. Kinesin-3 Familie

Gerade Kinesine, welche im Genom der Bäckerhefe nicht vorkommen, da dort der vesikuläre Transport primär entlang des Aktin- Zytoskeletts verläuft (Lillie & Brown, 1994), sind potenzielle Kandidaten für Analysen des gerichteten Langstreckentransports. Das erste Kinesin-3 das charakterisiert wurde, war das KIF1A Homolog Unc-104 in *C. elegans*, welches synaptische Vesikel und deren Vorläufer in Neuronen transportiert (Hall & Hedgecock, 1991). Die Motoren der Kinesin-3 Familie, früher Unc104/ Kif1A Familie genannt, sind, anders als die meisten anderen Motoren, wahrscheinlich vornehmlich monomer und wandern in Richtung des (+) Endes der MT (Al-Bassam *et al.*, 2003). Die Prozessivität der Motoren dieser Familie wird nicht, wie oben für das Kinesin-1 beschrieben, durch Dimerisierung, sondern durch eine sogenannte lysinreiche, positiv geladene Schleife (*K-loop*) gewährleistet, die mit dem negativ geladenen, glutamatreichen C-Terminus von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (*E-hook*) elektrostatisch sehr stark interagiert und somit einen Kraftschlag nach der ATP- Hydrolyse ermöglicht (Okada & Hirokawa, 2000). Es wird aber auch diskutiert, ob der Kinesin-3 Motor KIF1A möglicherweise *in vivo* durch schwache *coiled-coil* Interaktionen dimerisieren kann und sich prozessiv, ähnlich wie Kinesin-1 Motoren, entlang der MT bewegt und die Dimerisierung als regulatives Element dient (Tomishige *et al.*, 2002). Interessant ist hierbei, dass der positiv geladene *K-loop* für die im Vergleich zum konventionellen Kinesin extrem langen Laufstrecken des Kinesin-3 Motors verantwortlich zu sein scheint.

Kinesin-3 Motorproteine enthalten neben der konservierten Motordomäne auch zwei weitere charakteristische Bereiche; zum einen die FHA-Domäne (*forkhead associated*) und zum anderen die PH-Domäne (*pleckstrin homology*). Die FHA- Domäne ist in phosphorylierungsabhängigen Protein- Protein-Interaktionen, Signalwegen (Westerholm-Parvinen *et al.*, 2000) und der Regulation von Kinesinmotoren involviert (Lee *et al.*, 2004). Die PH-Domäne ermöglicht Lipidbindungen und die Bindung von membranösen Vesikeln. Die Lipidbindung selbst ist wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat abhängig, wodurch es zur Akkumulation des Motors an phosphatidylinositol-4,5-bisphosphatreichen Inseln (*rafts*) kommt, was den Beginn des Transports initiiert (Klopfenstein *et al.*, 2002). Zudem sind auch sogenannte *coiled coil* Motive in UncA zu finden, die  $\alpha$ - Helices bilden

können und so für proteininterne Wechselwirkungen, wie Faltung auf Sekundärstrukturebene und der Stabilität der tertiären und quartären Proteinstruktur, verantwortlich sind (Yu, 2002).

Das UncA- Motorprotein aus *A. nidulans* - ein Vertreter der Kinesin-3 Familie - besteht aus 1631 Aminosäuren und hat eine berechnete molekulare Masse von 182,7 kDa. Der offene Leserahmen besteht aus 4968 Basenpaaren und wird an der Stelle 65 bis 139 von einem Intron unterbrochen. Die N-terminale Motordomäne selbst enthält zwei MT-Bindestellen, ein ATP- Bindemotiv (*p-loop*) und zwei *switch*- Motive, die in die Nukleotidbindungen involviert sind (Song *et al.*, 2001). Weiterhin sind die für die Kinesin-3 Familie typischen FHA- und PH-Domänen vorhanden. In der Schwanzregion von UncA befinden sich auch zwei *coiled coil* Regionen (**Abb. 6 A**). Subzelluläre Lokalisierungen zeigen, dass UncA, überexprimiert durch den induzierbaren *alcA* Promotor, in kleinen motilen Vesikel sitzt, welche massiv an der Hyphenspitze akkumulieren, wohingegen unter einem natürlichen Expressionslevel deutlich weniger Vesikel markiert werden, die auch nicht am Apex akkumulieren, aber schon erahnen lassen, dass ein MT- Bündel bevorzugt für den Transport verwendet wird (Zekert & Fischer, 2009) (**Abb. 6 B,C**).

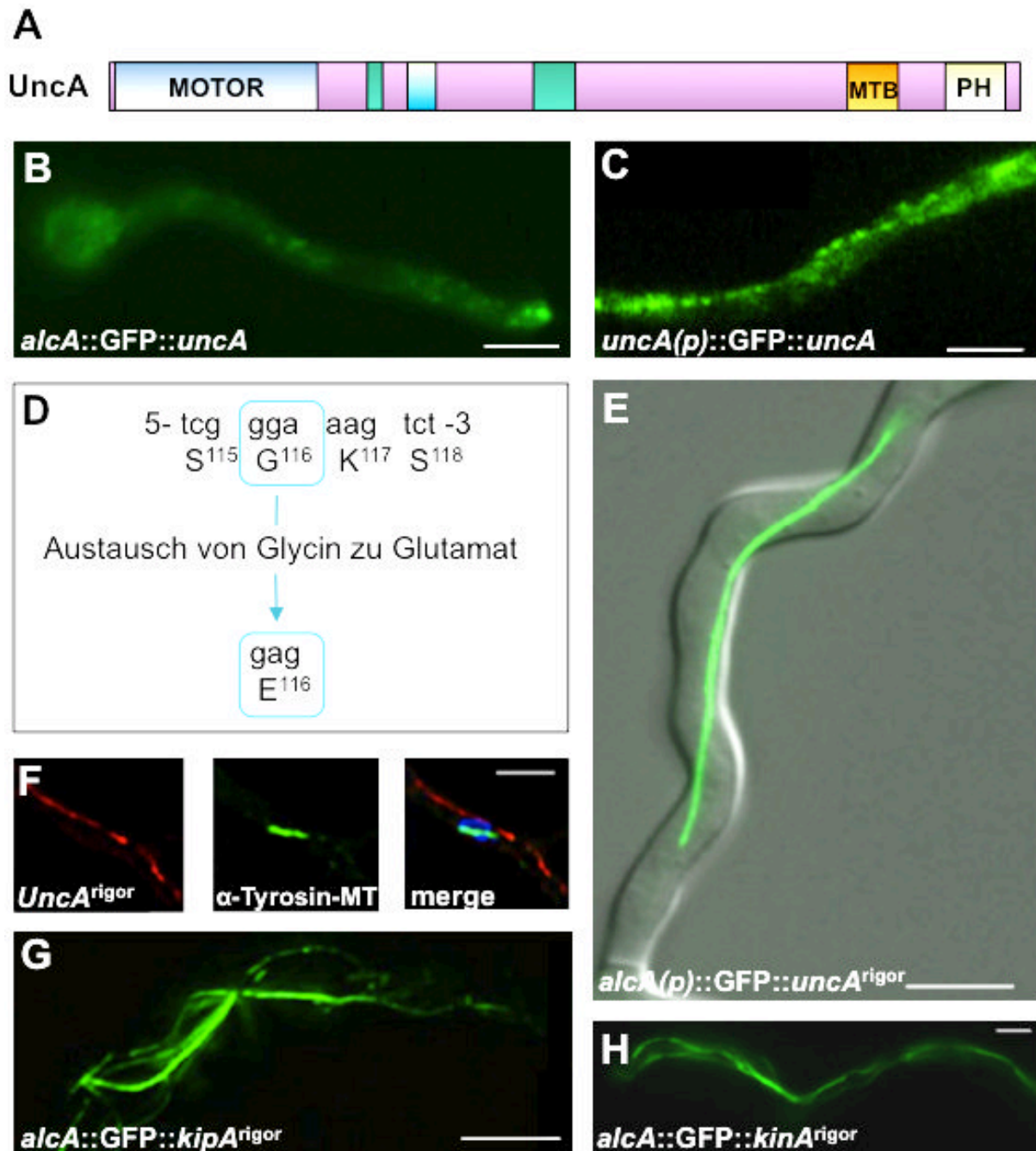
ATP- bindende Proteine besitzen, wie oben bereits erwähnt, im Motor eine Phosphatbindeschleife (*P-Loop*), die die Bindung von ATP ermöglicht und typischerweise aus einer glycinreichen Sequenz besteht (Saraste *et al.* 1990). Bei den konventionellen Kinesinen aus *A. nidulans* und *N. crassa* handelt es sich um die Aminosäuresequenz GQTGAGKS. Wird nun eines dieser Glycine, im Falle von UncA das Glycin116 zu Glutamat mittels ortsgerichteter Mutagenese (*site directed mutagenesis*) verändert, der so genannten *rigor* Mutation, verliert das Kinesin seine ATP- Hydrolysefähigkeit und damit seine Motilität (**Abb. 6 D**). Der Motor kann dadurch zwar noch an MT binden, aber durch die blockierte Phosphatbindeschleife nicht mehr entlang der MT wandern (Nakata & Hirokawa, 1995). Erstaunlicherweise ist die UncA<sup>rigor</sup> Variante, unabhängig von der Hyphenwachstumsphase des Pilzes, präferenziell auf nur einem einzelnen MT- Bündel zu finden (Zekert & Fischer, 2009) (**Abb. 6 E**). Es wurde auch gezeigt, dass das mRFP1-UncA<sup>rigor</sup> Fusionsprotein während der Kernteilung nicht an die mitotische Spindel, aber weiterhin spezifisch an diesen einzelnen, zytoplasmatischen MT bindet (**Abb. 6 F**).

Zur genaueren Analyse wie es zu der bevorzugten Bindung an diese MT-Subpopulation kommt, wurden unterschiedliche PTM in *A. nidulans* mit Hilfe von Immunfärbungen mit spezifischen Antikörpern in unserer Gruppe untersucht. Die am längsten bekannte tubulinspezifische Modifikation ist das zyklische Entfernen und erneutes Hinzufügen des C-terminalen Tyrosins des  $\alpha$ -Tubulins. Dieses Tyrosin kann durch die Tubulin- spezifische Carboxypeptidase (TCP) entfernt und durch das Enzym Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) in einer ATP- abhängigen Reaktion wieder angefügt werden und bestimmt so den Status des MT (Hallak *et al.*, 1977; Westermann & Weber, 2003). Es gibt

Hinweise darauf, dass die Akkumulation von detyrosinierten Mikrotubuli mit Tumorwachstum verbunden ist (Badin-Larçon *et al.*, 2004).

Zekert & Fischer zeigten 2009 erstmals indirekt, dass detyrosinierte MT in *A. nidulans* existieren und eine Subpopulation ausmachen. Es wurde beobachtet, dass gerade während der Mitose, die Spindel durch Antikörper gegen tyrosiniertes Tubulin markiert wurde, aber die durch UncA<sup>rigor</sup> gebundene MT- Subpopulation jedoch nicht. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Subpopulation offenbar aus detyrosinierten MT zusammengesetzt sein könnte (**Abb. 6 F**). Biochemische Analysen mit Antikörpern, die spezifisch gegen detyrosiniertes *A. nidulans*  $\alpha$ -Tubulin generiert wurden, haben bestätigt, dass im Wildtyp im Vergleich zu tyrosinierten Tubulin deutlich weniger detyrosinierte Tubuline durch den Antikörper erkannt werden, was bedeutet, dass es sich hier tatsächlich um eine kleine Subpopulation an detyrosinierten MT handeln könnte. Es wurde daraufhin ein *A. nidulans* Stamm so modifiziert, dass ausschließlich detyrosiniertes Tubulin gebildet wird und mit anschließenden biochemischen Tests konnte gezeigt werden, dass der spezifische Antikörper gegen detyrosiniertes Tubulin in diesem Stamm deutlich stärkere Signale aufweist als der Wildtyp. Auch Immunlokalisierungen mit dem detyr. Antikörper lassen das spezifische Binden an nur ein Bündel von MT erahnen (N. Zekert, persönl. Mitteilung).

Weder konventionelles Kinesin, KinA (Kinesin-1), Kinesin-7 KipA noch KipB (Kinesin-8) zeigten eine solche Spezifität (Konzack *et al.*, 2005; Rischitor *et al.*, 2004) (**Abb. 6 G,H**). Dies bestätigt, dass das beobachtete Verhalten von UncA<sup>rigor</sup> eine Besonderheit dieses Motors darstellt und nun detaillierter untersucht werden sollte.



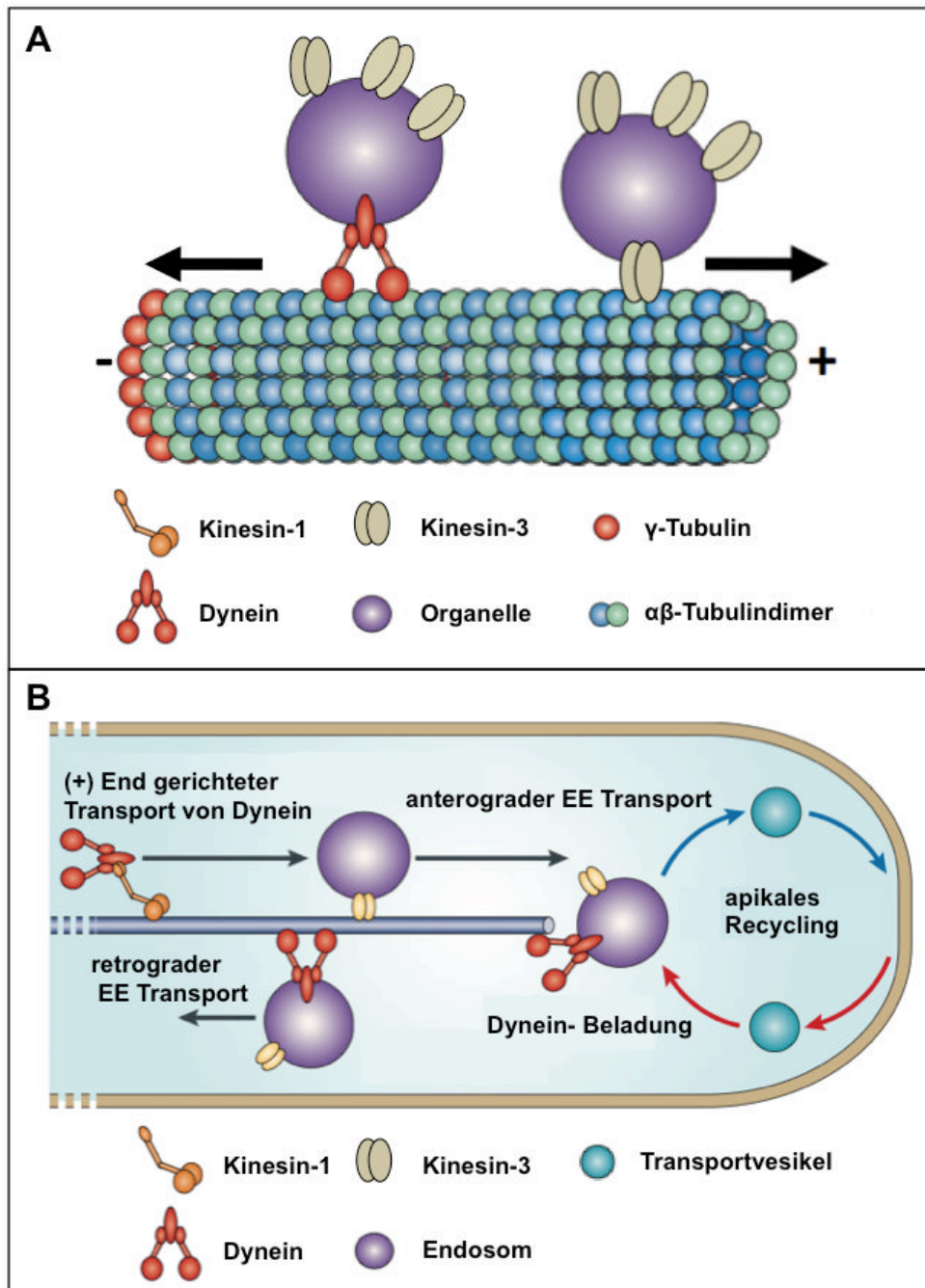
**Abbildung 6: UncA bevorzugt, anders als andere Kinesine, eine MT- Subpopulation in den Hyphen von *A. nidulans*.** (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Kinesin-3 Motors UncA. Nähere Erläuterung siehe Text. (B) Subzelluläre Lokalisierung von GFP-UncA, was hier durch den *alcA* Promotor überexprimiert wird, zeigt bidirektionale Vesikel und Akkumulationen an der Hyphenspitze (SNZ2). (C) Unter nativen Expressionsbedingungen sind deutlich weniger Vesikel zu beobachten und keine Ansammlungen am Apex. Hier ist auch schon zu erahnen, dass UncA ein MT- Bündel bevorzugt zum Transport verwendet. Abbildung entnommen aus Zekert & Fischer, 2009. (D) *rigor* Mutation in der Phosphatbindeschleife führt zum künstlichen und permanenten Binden des Motors an MT. (E) *UncA<sup>rigor</sup>* bindet interessanter Weise an eine MT- Subpopulation in den Hyphen. Abbildung entnommen aus Zekert & Fischer, 2009. (F) Ein Hyphenkompartiment während der Mitose zeigt, dass mit tyrosinierten Antikörpern die Mitosespindel markiert wird, die MT- Subpopulation, die durch mRFP-UncA<sup>rigor</sup> gebunden wurde, hingegen nicht. Dies diente als indirekter Hinweis für das Bevorzugen UncAs von detyrosinierten MT. Abbildung entnommen aus Zekert & Fischer, 2009. (G) GFP-KipA<sup>rigor</sup> zeigt keine solche Spezifität. Abbildung entnommen aus Zekert & Fischer, 2009. (H) Auch GFP-KinA<sup>rigor</sup> bindet unspezifisch an mehrere MT in den Hyphen. Maßstab jeweils 5 µm außer 10 µm in (D).

### 4.3. Kooperation von Kinesin-3 und Dynein im bidirektionalen Transport von Endosomen

In Neuronen höherer Eukaryoten vermittelt der bidirektionale Transport früher Endosomen (EE) die Kommunikation zwischen Zellkörper und den Synapsen (Howe & Mobley, 2005). Es wurde gezeigt, dass Kin-3, das *U. maydis* UncA Ortholog, EE anterograd in Richtung Hyphenspitze transportiert und für polares Wachstum notwendig ist (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Schuster *et al.*, 2011b). Dass Mutationen in Kinesin-3 zu starken Defekten in der anterograden, aber auch retrograden Organellenmotilität führt (Barkus *et al.*, 2008), ist erstaunlich, denn eine Rolle im retrograden Transport wurde für den (+) End- gerichteten Kinesin-3 Motor vorher nicht gezeigt. Die zentrale und essentielle Rolle des retrograden Transports durch Dynein wurde jedoch schon in mehreren Organismen beschrieben (Müller *et al.*, 2008; Ally *et al.*, 2009, Zekert & Fischer, 2009). Die Kolokalisierung von Kinesin-3 mit Organellen, die durch Dynein transportiert werden, ist ebenso schon länger bekannt (Koushika *et al.*, 2004; Ligon *et al.*, 2004). Kürzlich wurden sogar mit Hilfe stochastischer Messungen ermittelt, dass pro Organelle/ Endosom lediglich ein einzelner Dyneinmotor, aber auch drei bis fünf Kinesin-3 Motoren sitzen können (Schuster *et al.*, 2011b). In anterograden Transportprozessen von EE konnten nur Kinesin-3 Motoren beobachtet werden, durch das zufällige und transiente Binden von Dynein wurde dann jedoch gezeigt, dass sich daraufhin die Transportrichtung in Richtung MT (-) Ende verkehrt, einem ähnlichen kompetitiven Prozess wie beim "Tauziehen" (Schuster *et al.*, 2011b, Hendricks *et al.*, 2010). Die Kinesine bleiben aber weiterhin permanent passiv an das durch Dynein transportierte Endosom gebunden (**Abb. 7 A**). Schuster konnte auch quantifizieren, dass ein Dyneinkomet an den MT (+) Enden ungefähr aus 55 Dyneinmotoren besteht (Schuster *et al.*, 2011a). Das Akkumulieren des Dyneins in Form von Kometen an den MT (+) Enden ist demnach als ein Mechanismus zu verstehen, der die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass EE nach dem anterograden Transport von dem wartenden Dynein abgefangen werden um so das Abfallen des Organells/ Endosoms von dem MT zu verhindern (Schuster *et al.*, 2011a; Steinberg, 2012). Der Transport von Dynein selbst an das MT (+) Ende erfolgt mittels Kinesin-1 (Zhang *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2006) (**Abb. 7 B**).

*U. maydis* hat räumlich differenzierbare MT- Anordnungen, an den Zellenden sind unipolare MT- Orientierungen vorherrschend, so sind es in der Zellmitte ab dem Vorhandensein zytoplasmatischer MTOCs antipolare MT- Bündel (Lenz *et al.*, 2006). Interessanterweise wurde gezeigt, dass Kinesin-3 vorrangig an den antipolaren subapikalen Regionen Transportaktivitäten mit EE zeigt, wohingegen Dynein sein Transportgut entlang unipolar orientierter MT am Apex verteilt (Schuster *et al.*, 2011c). So ist es möglich, dass auch Kinesin-3 in Transportvorgängen Richtung Zellkern, also retrograd vom Apex, involviert

ist, wodurch der Transport von Endosomen entlang der gesamten Zelllänge gewährleistet wird (Egan *et al.*, 2012), da ein retrograder Langstreckentransport durch ein einzelnes am Vesikel gebundenes Dynein nicht bewältigt werden kann.



**Abbildung 7: Anterograde und retrograde Motilität von Organellen/ Endosomen durch das Zusammenspiel von Kinesin-3 und Dynein. (A)** Der Transport von frühen Endosomen erfolgt MT- abhängig durch Kooperation von Kinesin-3 und Dynein. Kinesin transportiert die EE in Richtung (+) Ende, sobald Dynein an den Komplex bindet, ändert sich die Transportrichtung zum (-) Ende hin, ähnlich wie beim Tauziehen. Dynein wird mit Hilfe von Kinesin-1 an die MT (+) Enden bewegt, wo bis zu 55 Dyneinmoleküle die Kometen an den MT- Enden bilden. **(B)** Modell des bidirektionalen Langstreckentransports von Endosomen in *U. maydis*. Der rasante Austausch von Membrankomponenten mit der Plasmamembran über Vesikel an der Hyphenspitze wird über den Spitzenkörper reguliert und auch mit Hilfe von EE retrograd recycelt. Abbildung modifiziert nach Steinberg, 2007.



#### 4.4. Die Rolle von *N. crassa* Kinesin-3 in der Mitochondrienmotilität

In *N. crassa* ist bisher deutlich weniger über Transportprozesse der Endosomen bekannt. Das Genom von *N. crassa* beinhaltet beide *A. nidulans*- Homologe von UncA und UncB, Nkin2 (Nc06733) und Nkin3 (Nc03715). Fuchs und Westermann zeigten 2005, dass Nkin2 am Transport von Mitochondrien in *N. crassa* beteiligt ist (Fuchs & Westermann, 2005). Folglich resultierte die Deletion von *nkin2* in mitochondrialen Motilitätsdefekten, welche durch Überexpression von Nkin3 kompensiert werden konnten. In *in vitro* assays wurde beobachtet, dass Nkin2, aber nicht Nkin3 mit Mitochondrien assoziiert ist. Interessant ist hierbei, dass in *A. nidulans* und *S. cerevisiae* Mitochondrien entlang von Aktin transportiert werden (Oakley & Rinehard, 1985; Suelmann & Fischer, 2000), wohingegen dies in *N. crassa* und *S. pombe* MT- abhängig ist (Yaffe *et al.*, 1996; Fuchs *et al.*, 2002).

Vom Golgiapparat abgegebene sekretorische Vesikel werden in *N. crassa* zum Spitzenkörper transportiert, welcher das Hyphenwachstum mit der kontrollierten Abgabe dieser Vesikel reguliert (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995). Interessanterweise kann der Spitzenkörper auch durch den Endozytose- Marker FM4-64 gefärbt werden, was darauf hinweist, dass der Spitzenkörper auch eine zentrale Rolle in Endozytoseprozessen spielt (Fischer-Parton *et al.*, 2000). In dieser Arbeit soll nun geklärt werden, ob Nkin2, zusätzlich neben der Mitochondrienmotilität, auch eine konservierte Rolle in endosomalen Transportmechanismen einnimmt wie in *A. nidulans* und *U. maydis* gezeigt wurde (Zekert & Fischer, 2009; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002).

#### 5. Vesikel- Transportmechanismen und Inhalte

Wie sich Vesikel generell, aber auch Endosomen im Speziellen zusammensetzen und welche Proteine sich in deren Innerem befinden, ist bisher kaum untersucht worden. Dass in sekretorischen Vesikeln unter anderem Exoenzyme und Komponenten zur Zellwand- und Membransynthese enthalten sind, wurde bereits 2006 von Bartnicki-Garcia beschrieben (Bartnicki-Garcia, 2006). Mit Hilfe von enzymatischen Sekretionsanalysen wurde eine Beteiligung von Kin-3 in der Sekretion von sauren Phosphatasen in *U. maydis* postuliert (Schuchardt *et al.*, 2005). Es gibt mehrere Hinweise, dass Kinesin-1 Motoren in sekretorischen Vorgängen involviert sind. Zum einen zeigte Seiler 1997, dass der Transport in *N. crassa* Kinesin-1 abhängig ist und eine Deletion in einer reduzierten Sekretion resultiert (Seiler *et al.*, 1997). Zum anderen wurde beschrieben, dass Kin-1 und nicht Kin-3 für die effiziente Sekretion von Chitinsynthasen in *U. maydis* notwendig ist (Schuster *et al.*, 2011d). Eine Fragestellung dieser Arbeit bestand auch darin, zu untersuchen, welche Vesikelpopulationen durch das Kinesin-3 UncA in *A. nidulans* transportiert werden.

Der Prozess des Membranverkehrs selbst ist weitestgehend geklärt: Nach der Bildung des Vesikels, erfolgt der aktive Transport durch Motorproteine, das Andocken an die Zielmembran und letztendlich die Fusion (Grosshans *et al.*, 2006). Um den jeweiligen Komponenten, den Vesikel-, Donor- und Akzeptormembranen, Identitäten zuzuweisen, sind Mitglieder der Rab- Familie (Ras- ähnlich GTPasen) notwendig. Die Rab- GTPasen rekrutieren dann Effektoren, die die spezifischen Funktionen, wie beispielsweise das Andocken von assoziierten Proteinen, wie beispielsweise den Motoren, vermitteln (Jordens *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde auch ein Rab3- vermittelter Prozess der Bindung UncAs an sein Transportguts untersucht.

## 6. Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass das Kinesin-3 UncA Vesikel entlang einer MT- Subpopulation in den Hyphen transportiert (Zekert & Fischer, 2009). Das ist das erste und einzige bisherige Beispiel für die Existenz verschiedener MT- Subpopulationen in filamentösen Pilzen und das zweite Beispiel für die MT- Spezifität eines Kinesin-3 Motors. Schon während meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass eine 86 Aminosäuren lange Region in dem Schwanzbereich von UncA die Spezifität für die wahrscheinlich detyrosinierten MT hervorruft. Hierfür sollten während meiner Promotion vertiefende Analysen, wie beispielsweise Mutagenesen, Lokalisierungsstudien und biochemische Expressionsanalysen durchgeführt werden, um die Rolle dieser MTB- Domäne näher zu charakterisieren. Anhand verschiedener chimärer Motorproteine, die beispielsweise aus dem Motor des konventionellen Kinesins KinA und dem Schwanzbereichs UncAs aufgebaut waren, sollte getestet werden, ob die MTB- Domäne die Spezifität auch in anderen, unspezifischen Kinesinen erzeugen kann.

Außerdem habe ich im Rahmen dieser Arbeit mit einem weiteren Ascomyceten, *N. crassa*, beschäftigt. Hierfür sollte mittels Lokalisierungsstudien analysiert werden ob auch hier eine Kinesin-3 Spezifität vorliegt und es sich um einen konservierten Mechanismus handeln könnte. Interessanterweise wurde 2005 publiziert, dass NKin2, das *N. crassa* UncA Homolog, in die mitochondriale Motilität involviert ist (Fuchs & Westermann, 2005), wohingegen Kinesin-3 in *A. nidulans* und *U. maydis* den endosomalen Transport gewährleistet (Zekert & Fischer, 2009; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Detailliertere Analysen sollten nun klären, welche Rolle Nkin2 im endosomalen Transport in *N. crassa* spielt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der intensiveren Analyse der Cargos, die durch UncA transportiert werden. Hierfür wurde mit Hilfe von Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, Y2H- Analysen, sowie gerichteten Interaktions- und Kolokalisierungstests versucht, neue Vesikelpopulationen und -inhalte zu charakterisieren.

## IV. Ergebnisse

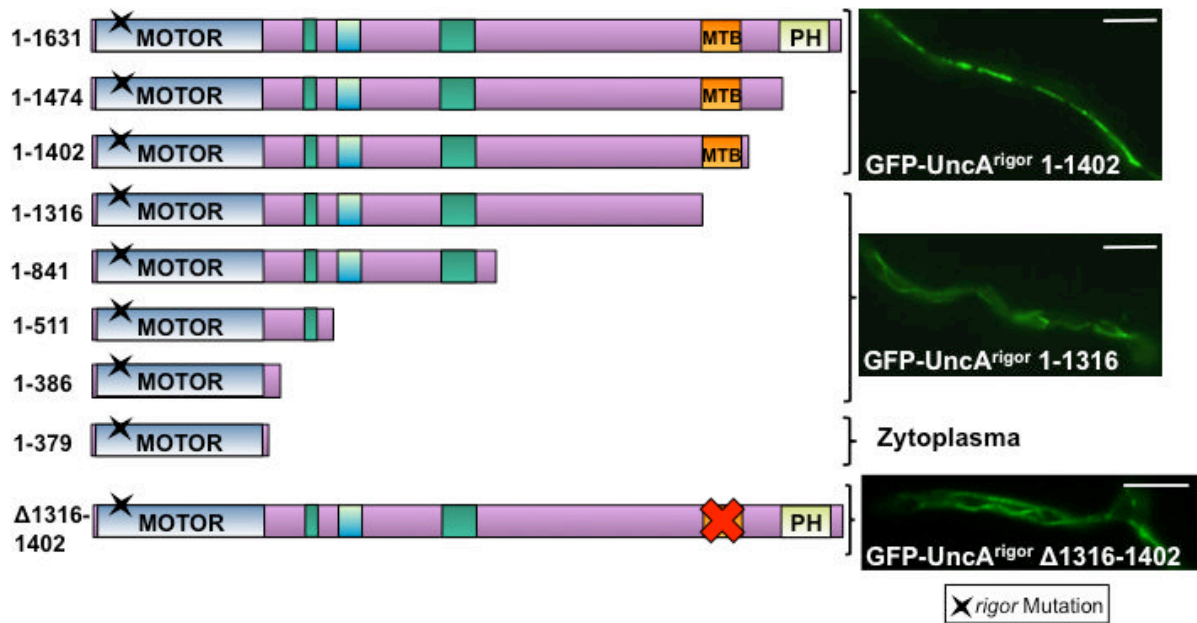
### Kapitel 1

#### Untersuchung der Spezifität von UncA für eine MT- Subpopulation

Da UncA interessanterweise eine MT- Subpopulation in der Hyphe von *A. nidulans* für den Transport bevorzugt, stellt sich zum einen die Frage, inwiefern die Tubuline modifiziert vorliegen können und zum anderen, wie diese Veränderung durch das Kinesin selbst erkannt werden kann. Potenzielle posttranslationale Modifikationen der Tubuline, welche die verschiedenen Subpopulationen definieren könnten, wurden in einem Parallelprojekt untersucht. Das Ziel meiner Arbeit jedoch war es, zu ermitteln, welches Motiv innerhalb des Motorproteins an der Erkennung modifizierter Mikrotubuli involviert ist.

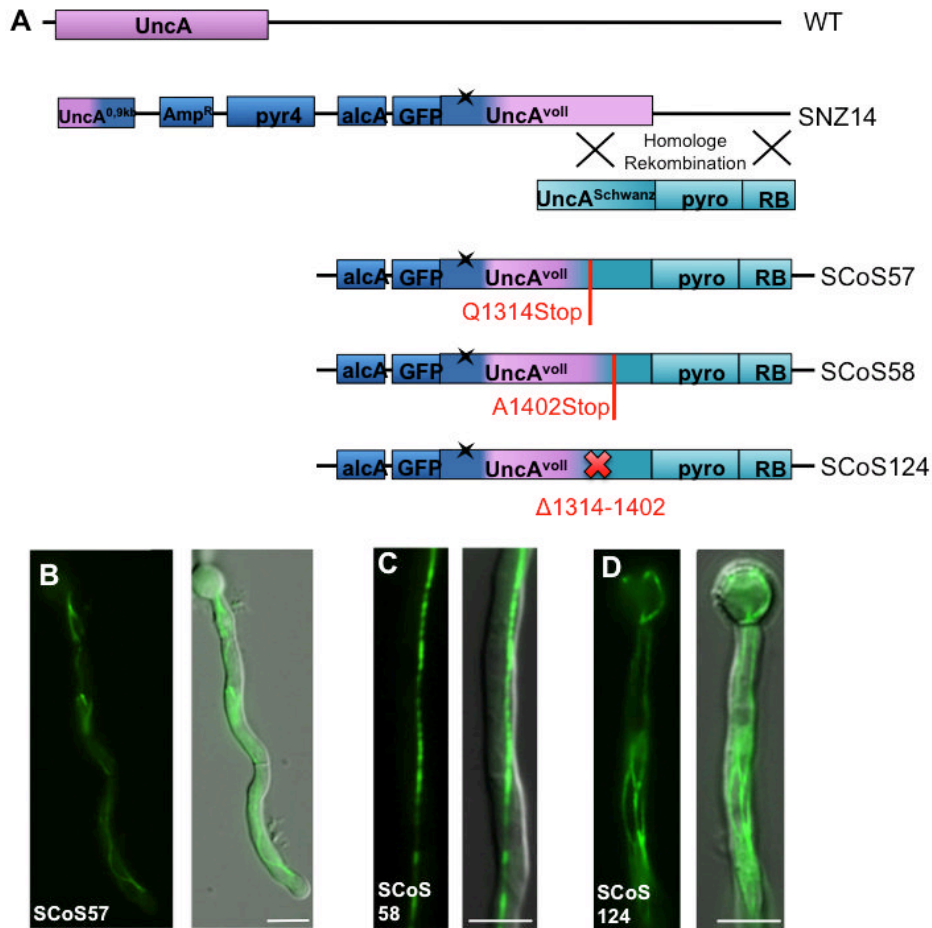
#### 1.1. Eine Region im Schwanzbereich UncAs wird für die MT- Spezifität benötigt

Bereits während meiner Diplomarbeit wurde mittels schrittweisen Verkürzens des UncA Proteins (Deletionsanalyse) eine Region in dem Schwanz des Motorproteins eingegrenzt, die für die Erkennung wichtig ist. Die Deletion dieser Region führte zu einem Verlust der Spezifität für die MT- Subpopulation. Hierfür wurden entsprechend verkürzte GFP-UncA<sup>rigor</sup>-Fusionen, welche unter der Expression des natürlichen *uncA* Promotors reguliert wurden, in den *uncA* Deletionsstamm transformiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Seidel, 2009)(**Abb. 8**). Anschließend konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass die spezifische Deletion dieser lediglich auf die Aminosäuren 1316-1402 eingegrenzten Mikrotubulibinderegion (MTB) in dem Verlust der MT- Spezifität des Kinesins resultierte.



**Abbildung 8: Deletionsanalyse von UncA offenbart, dass eine Region im Schwanz die MT- Spezifität vermittelt.** Schrittweises Verkürzen des UncA- Proteins führt zu einem Verlust der Spezifität für die MT- Subpopulation bei allen Konstrukten kleiner als 1316 Aminosäuren, alle Konstrukte länger als 1402 Aminosäuren wiesen hingegen noch immer die Spezifität auf. Aufgrund dessen wurde ausschließlich diese MTE- Region deletiert ( $\Delta 1316-1402$ ), was erneut in einem Spezifitätsverlust resultierte. Die Anzahl der Aminosäuren steht jeweils links der verkürzten Proteine. Motor = Motordomäne, Stern = *rigor* Mutation in der Phosphatschleife, FHA = *forkhead associated* Domäne, PH = *pleckstrin homology* Domäne, grüne Kästen schematisieren beide *coiled coil* Regionen, MTE = Mikrotubulibinderegion. Rechts sind repräsentative GFP- Lokalisierungen der jeweiligen Konstrukte in  $\Delta uncA$  unter der Expression des *uncA* Promotors. Maßstab entspricht jeweils 5  $\mu\text{m}$ ; modifiziert nach Seidel *et al.*, 2012.

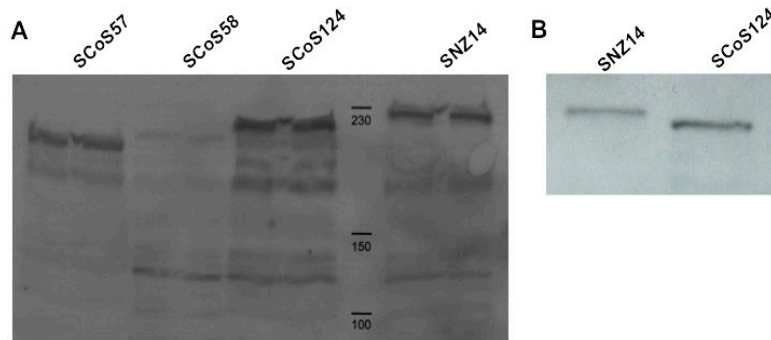
Da es im Zuge der Transformation der jeweiligen Vektoren, welche neben den GFP-UncA<sup>rigor</sup>- Fusionen auch Selektionsmarker beinhalten, zu Mehrfachintegrationen in das *A. nidulans* Genom kommen kann, wurde eine zusätzliche Strategie verfolgt, um ein komplett identisches Expressionslevel der jeweiligen Fusionsproteine gewährleisten zu können, da Überexpression von UncA zu einem Verlust der Spezifität führt (Seidel, 2009). Hierfür wurden zusätzlich in den bereits mit GFP-UncA<sup>rigor</sup> transformierten Stamm SNZ14, der die homolog integrierte *alcA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor 0,9kb</sup>* Kasette enthält, mittels erneuter homologer Rekombination gezielte Stopkodons in den *uncA* Leserahmen eingefügt. Dies wurde mit Hilfe einer Kasette erreicht, welche die letzten beiden Kilobasen des *uncA* Gens (mit den jeweiligen Punktmutationen), sowie dem *pyro* Selektionsmarker und eine Kilobase der rechten Flanke des *uncA* Lokus enthielt (**Abb. 9 A**). Die integrierte Punktmutation wurde durch Sequenzierung des modifizierten Abschnittes bestätigt (MWG, Ebersberg).



**Abbildung 9: Komplementation von SNZ14 zur Untersuchung der Rolle der MTB- Region unter Gewährleistung gleicher Proteinlevel zur Bestätigung der vorhergehenden Deletionsanalyse in  $\Delta$ *uncA*.** (A) Schematische Darstellung der gezielten Rekombination des *uncA* Lokus des GFP-*UncA*<sup>rigor</sup> exprimierenden Stammes SNZ14 mit 3 verschiedenen modifizierten Komplementationskassetten zur Analyse der Konsequenz für die Spezifität zu der präferierten MT- Subpopulation hin. (B) GFP-*UncA*<sup>1-1316</sup> (SCoS57) bindet unspezifisch mehrere MT. (C) GFP-*UncA*<sup>1-1402</sup> (SCoS58) lokalisiert an nur einem MT- Bündel. (D) Gezielte Deletion der MTB- Region in GFP-*UncA* <sup>$\Delta$ 1316-1402</sup> (SCoS124) führt zu einem Verlust der Spezifität. Maßstab entspricht jeweils 5  $\mu$ m.

Die vorhergehende Deletionsanalyse in  $\Delta$ *uncA* bestätigend, lokalisierte auch in dem modifizierten Stämmen von SNZ14, *UncA*<sup>1-1316</sup> (SCoS57) unspezifisch und *UncA*<sup>1-1402</sup> (SCoS58) wiederum spezifisch entlang der MT- Subpopulation (Abb. 9 B,C). Auch die Deletion der kompletten MTB- Region (Aminosäuren 1316-1402) resultierte in einem Verlust der MT- Subpopulationserkennung (Abb. 9 D) und zeigt erneut, dass die MTB- Region notwendig ist, die Spezifität des Kinesins zu gewährleisten.

Mittels Western Blots konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die jeweiligen GFP-Fusionsproteine tatsächlich in korrekter Länge exprimiert werden (Abb. 10 A). Weiterhin waren auch die Expressionslevel der beiden kritischen Konstrukte GFP-*UncA*<sup>voll</sup> und GFP-*UncA* <sup>$\Delta$ 1316-1402</sup> vergleichbar (Abb. 10 B), was wichtig ist, da es aufgrund erhöhter Proteininstabilität, die durch die Verkürzung des Proteins eventuell entstehen könnte, zu dem Verlust der Spezifität hätte kommen können.



**Abbildung 10: Vergleich der Expressionslevel der verschiedenen *UncA*<sup>rigor</sup> Deletionskonstrukte in SNZ14. (A) Western Blot mit GFP-*UncA*<sup>1-1316</sup> (SCoS57)(171 kDa), *UncA*<sup>1-1402</sup> (SCoS58)(181 kDa), GFP-*UncA*<sup>Δ1316-1402</sup> (CoS124)(197kDa) und *UncA*<sup>voll</sup> (SNZ14)(206kDa) (B) Vergrößerung eines Western Blots zum Vergleich der Expression der beiden kritischen Konstrukte GFP-*UncA*<sup>voll</sup> und GFP-*UncA*<sup>Δ1316-1402</sup>. Die Detektion wurde mit anti- GFP Antikörpern (1:4000) und anti- Hase IgG Peroxidase gekoppelten Sekundäntikörpern (1:4000) durchgeführt. 285 µg *A. nidulans* Gesamtproteinextrakt wurden jeweils geladen.**

Um die Funktionalität des *UncA*<sup>Δ1316-1402</sup> Proteins zu analysieren, wurde der Stamm, dem die MTB- Region fehlt (SCoS75), mit dem Wildtyp und *ΔuncA* verglichen. Auffallend war, dass *UncA*<sup>Δ1316-1402</sup> einen ähnlich kompakten Kolonienphänotyp wie der Deletionsstamm aufwies (**Abb. 11**). Eine N-terminale GFP- Fusion des *UncA*<sup>Δ1316-1402</sup> Konstruktes zeigte keine vereinzelt Vesikel in den Hyphen, sondern lediglich schwaches zytoplasmatisches Hintergrundrauschen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die MTB- Region für die Funktion von *UncA* notwendig ist.

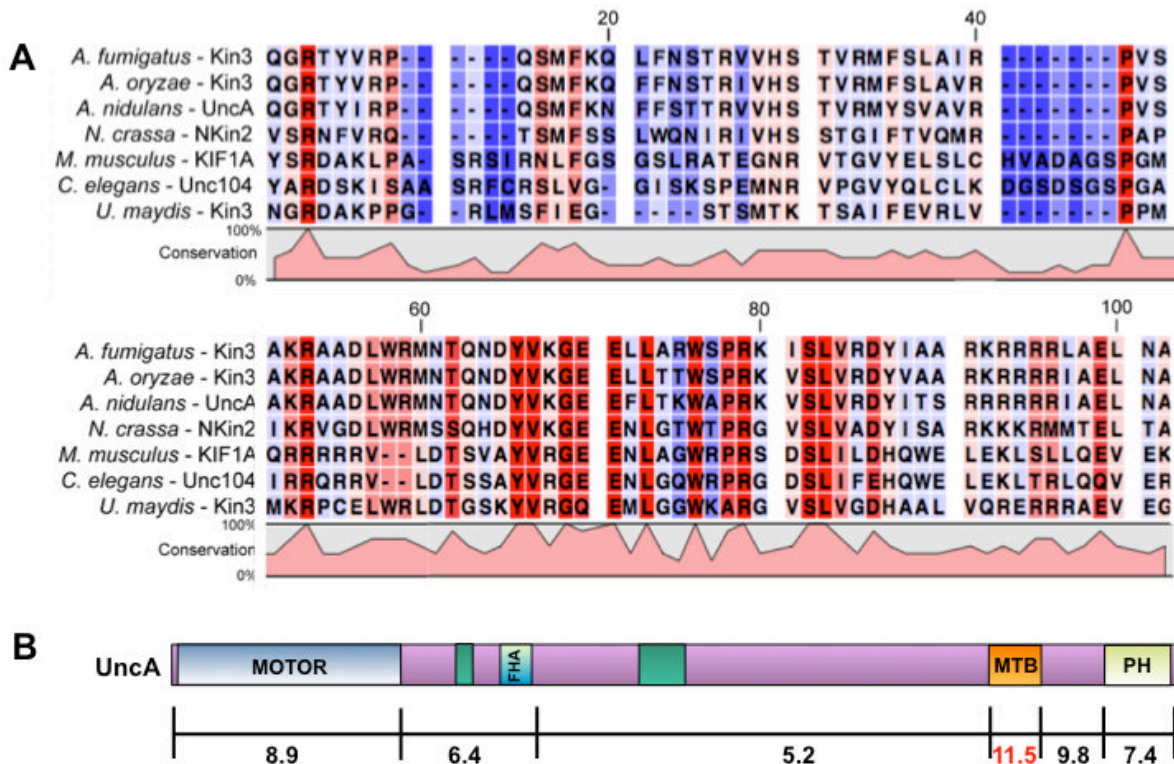


**Abbildung 11: Wachstumsvergleich auf Kolonieebene von *ΔuncA*, *UncA*<sup>Δ1316-1402</sup> und WT (TN02A3).** Das Fehlen der MTB- Region resultiert in einem ähnlichen polaren Wachstumsdefekt wie die *uncA* Deletion.

Ein Sequenzvergleich dieser Region zwischen verschiedenen Pilzen und höheren Eukaryoten deckte auf, dass hier zahlreiche Aminosäuren konserviert sind (**Abb. 12 A**). Die spezifische Deletion von sechs aufeinander folgenden Argininen, welche sich am Ende der MTB- Region befinden und zumindest in den *Aspergillen* stark konserviert sind, führte nicht zu einem Verlust der Spezifität.

Eine weitere interessante Eigenschaft der MTB- Region stellt eine positive Ladung bei einem pH Wert von 7 dar (**Abb. 12 B**). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass der positiv

geladene Bereich die Bindung zu dem stark negativ geladenen, der an der Oberfläche des polymerisierten MT exponierten C- Terminus des  $\alpha$ - Tubulins direkt vermitteln könnte.



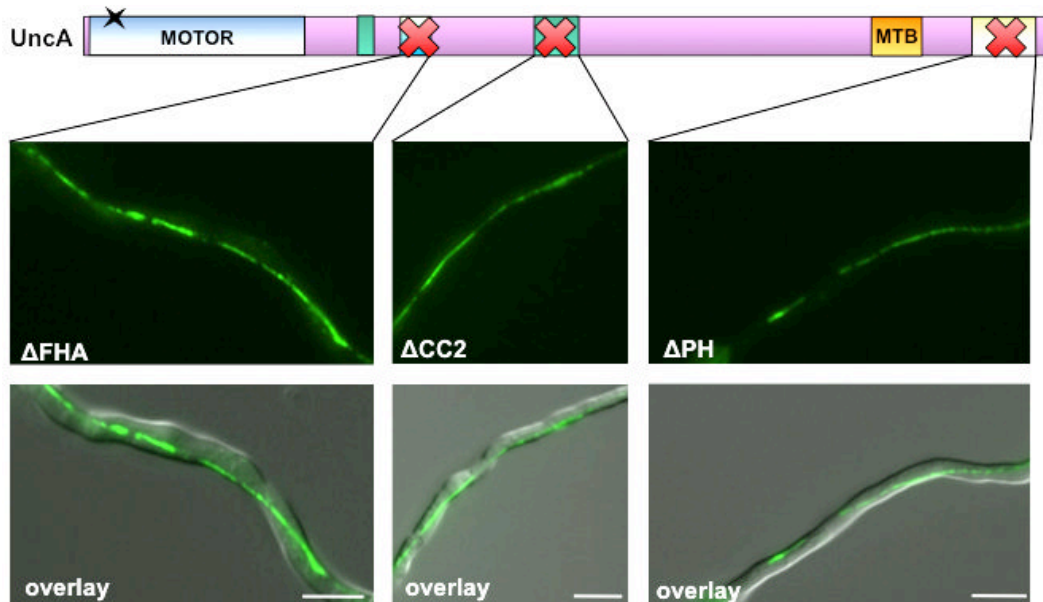
**Abbildung 12: Charakterisierung der MTB- Domäne in der Schwanzregion des Kinesin-3 UncA zeigt, dass einige Aminosäuren stark konserviert sind und die MTB- Region selbst positiv geladen ist. (A)** Sequenzvergleich der MTB-Region mit UncA Orthologen in verschiedenen Pilzen und höheren Eukaryoten. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programmes *CLC Sequence Viewer* erstellt. **(B)** Kalkulation der isoelektrischen Punkte definierter Regionen UncAs. Die Kalkulation erfolgte unter der Webseite <http://isoelectric.ovh.org>.

## 1.2. Andere Proteindomänen von UncA sind nicht für die MT- Spezifität verantwortlich

Um die Beteiligung anderer Domänen UncAs auszuschließen, wurden auch diese auf die gleiche Weise einzeln deletiert und die Konstrukte entsprechend lokalisiert. Das Fehlen der *Forkhead Associated* Domäne (FHA), die eine Rolle in phosphorylierungsabhängigen Protein- Protein-Interaktionen, Signalwegen (Westerholm-Parvinen *et al.*, 2000) und der Regulation von Kinesinmotoren spielt (Lee *et al.*, 2004), resultierte nicht in einem Verlust der MT- Spezifität. Ebenso wenig hat weder die Deletion der *coiled coils*, die für Protein- Protein-Interaktionsvermittlung bekannt sind, noch der *Pleckstrin Homology* Domäne (PH), zu einem Verlust der Spezifität geführt (**Abb. 13**). Die PH- Domäne vermittelt die Bindung von membranösen Vesikeln (Klopfenstein *et al.*, 2002), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat abhängig ist. Dadurch kommt es zur Akkumulation des Motors an

phosphatidylinositol-4,5-bisphosphatreichen Inseln (rafts), was letztendlich den Beginn des Transports initiiert.

Diese Ergebnisse unterstreichen erneut die einzigartige Rolle der MTB- Region gerade in dem Prozess des Erkennens der MT- Subpopulation.



**Abbildung 13: Deletionen anderer Domänen in UncA führen nicht zu einem Verlust der MT- Spezifität.** FHA = *Forkhead Associated* Domäne, CC = *coiled coils*, MTB = Mikrotubulibinderegion und PH = *Pleckstrin Homology* Domäne. Maßstab entspricht jeweils 5  $\mu\text{m}$ .

### 1.3. Chimäre Motorproteine bestätigen die Rolle der Schwanzdomäne von UncA in der Erkennung der MT- Subpopulation

Die Deletionsanalyse hat gezeigt, dass die MTB für die Erkennung notwendig ist. Jetzt sollte untersucht werden ob sie auch ausreichend ist, diese Spezifität auch in anderen, unspezifische Kinesine erzeugen zu können. Hierfür wurde ein erstes künstliches chimäres Fusionsprotein hergestellt, was aus der Motordomäne des konventionellen Kinesins, KinA, und dem Schwanz UncAs generiert wurde und unter der Kontrolle des natürlichen *uncA* Promotors exprimiert wurde. Da die Überexpression von UncA zu einem dramatischen Verlust der Spezifität von UncA führt, wurden alle Lokalisierungsexperimente unter der Expression des natürlichen *uncA* Promotors reguliert (Seidel, 2009). Weiterhin wurde mittels Southern Blot ausgeschlossen, dass eine homologe Integration in den *kinA* Genort stattgefunden hat.

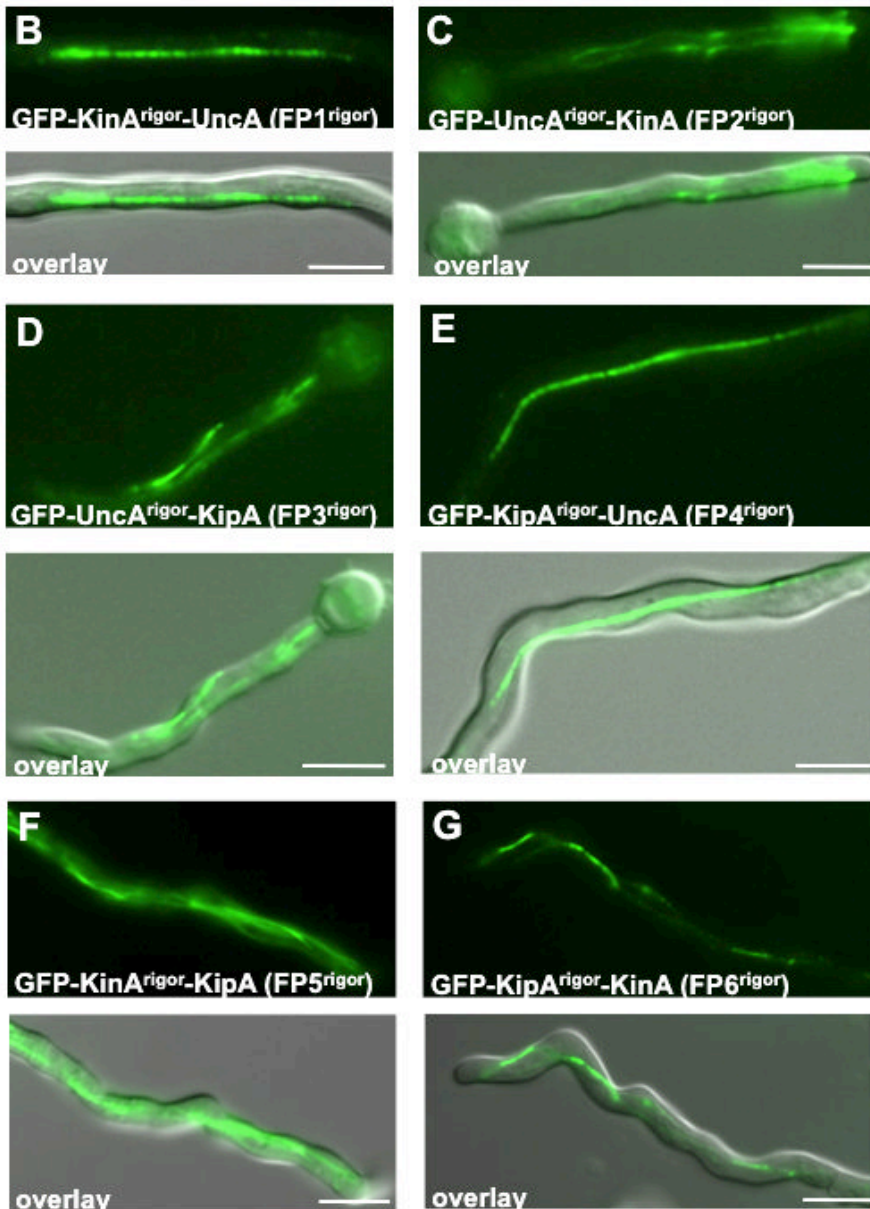
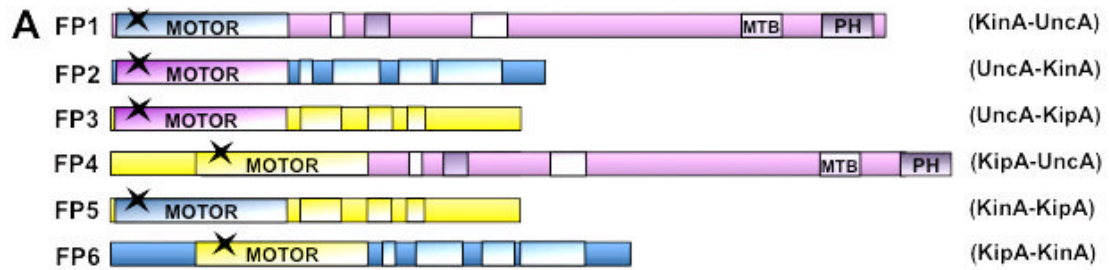
Das GFP-KinA-UncA Fusionsprotein, welches in den *uncA* Deletionsstamm SNZ9 transformiert wurde, zeigte sowohl Akkumulationen an der Hyphenspitze, sowie sich schnell bewegende Punkte, was zum einen bedeutet, dass das Fusionsprotein funktionell ist und zum anderen, dass dessen Expressionslevel ausreicht, um den Deletionsphänotyp von UncA zu kompensieren (Seidel, 2009). Anschließend wurde in das KinA-UncA Fusionsprotein die



*rigor* Mutation integriert und dessen Lokalisierung untersucht. Interessanterweise hat auch dieses Konstrukt die MT- Spezifität aufgewiesen und lediglich eine Subpopulation in *A. nidulans* gebunden (Seidel, 2009) (**Abb. 14 B**). Dies deutet darauf hin, dass die Region in dem Schwanz des Motorproteins an der MT- Erkennung involviert ist, und nicht die Motordomäne, welche durch das Vorhandensein zweier ATP- und Mikrotubulibindestellen wahrscheinlicher gewesen wäre. Auf diese Ergebnisse aufbauend, wurden anschließend in meiner Dissertation weitere Motorfusionsproteine konstruiert, um die Rolle des UncA Schwanzbereichs vergleichend zu anderen Kinesinen näher zu untersuchen (**Abb. 14 A**).

Hierfür wurde das komplementäre Chimär aus UncA- Motor und KinA- Schwanz (SCoS44, FP2) generiert, um zu zeigen, ob die Spezifität tatsächlich von der Schwanzdomäne UncAs bestimmt wird. Die *rigor* Variante dieses Fusionsproteins lokalisierte unspezifisch an mehreren MT in den Hyphen (**Abb. 14 C**). Auch andere Fusionsproteine mit KipA<sup>rigor</sup>-UncA (SCoS67, FP3), UncA<sup>rigor</sup>-KipA (SCoS74, FP4), KinA<sup>rigor</sup>-KipA (SCoS76, FP5) und KipA<sup>rigor</sup>-KinA (SCoS79, FP6) Modulen, jeweils unter der Kontrolle des *uncA* Promotors exprimiert, waren nur dann spezifisch für die MT Subpopulation, wenn die Schwanzdomäne von UncA involviert war (**Abb. 14 D-G**). Interessant war hierbei auch, dass oftmals auch durch die Chimäre lediglich 2, 3 oder mehrere MT gebunden wurden. Vergleichend mit den unveränderten KinA<sup>rigor</sup> und KipA<sup>rigor</sup> sind deutlich weniger MT durch die Chimäre gebunden. Es sollte jedoch auch beachtet werden, dass KinA<sup>rigor</sup> und KipA<sup>rigor</sup> möglicherweise auch selbst nicht komplett alle MT in der Hyphe binden, entsprechende Quantifizierungen wurden bisher noch nicht durchgeführt.

Das spezifische Einbringen der MTB- Region UncAs an zwei verschiedenen Stellen (G732 und N904) der Schwanzregion des konventionellen Kinesins, KinA, führte nicht dazu, dass sich das unspezifische Bindungsverhalten der KinA<sup>rigor</sup> Version änderte. Weiterhin wurde auch versucht die MTB- Region an die Motordomäne UncAs direkt zu fusionieren. Das Konstrukt wurde dann N-terminal mit GFP markiert und unter der Kontrolle der beiden *alcA* und *uncA* Promotoren exprimiert. Beide Fusionsproteine haben an mehrere MT gebunden und zeigten keine MT- Spezifität. Zusammenfassend ist also zu konstatieren, dass die MTB- Region, eingebettet in den Schwanz von UncA, ausreichend ist, die Spezifität des Kinesin-3 hervorzurufen. Jedoch ist die Expression der MTB-Region alleine nicht ausreichend diese MT- Spezifität zu vermitteln.



**Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Analysen chimärer Kinesine bestätigen, dass der Schwanz UncAs ausreicht um die MT- Spezifität auch in anderen Kinesinen zu erzeugen. (A)** Übersicht der gesamten in dieser Arbeit modulierten Chimäre aus UncA (lila), KinA (blau) und KipA (gelb). **(B-G)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Chimäre, welche N-terminal mit GFP markiert und unter der Kontrolle des *uncA* Promotors exprimiert wurden. Lediglich die Fusionsproteine FP1<sup>rigor</sup> und FP4<sup>rigor</sup>, welche den UncA Schwanz enthielten, haben an nur ein MT- Bündel gebunden. Die anderen Konstrukte haben oftmals mehrere, jedoch auch nicht alle MT erkannt und 2-4 MT gebunden. Maßstab entspricht jeweils 5  $\mu$ m.

### 1.4. Der Schwanzbereich UncAs interagiert direkt mit $\alpha$ -Tubulin

Aufgrund dessen, dass die MTB- Region im Schwanzbereich UncAs möglicherweise im Stande ist, mit MT direkt zu interagieren und so die Spezifität vermitteln kann, wurden Tests im Hefe- Zwei- Hybridsystem (Y2H) durchgeführt. Bei dieser Technik zum Verifizieren von Protein- Protein- Interaktionen führt die Interaktion der beiden Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4, die Bindedomäne (BD) und Aktivierungsdomäne (AD), welche mit den zu testenden Proteinen gekoppelt sind, bei positiver Interaktion zur Expression sogenannter Reportergene.

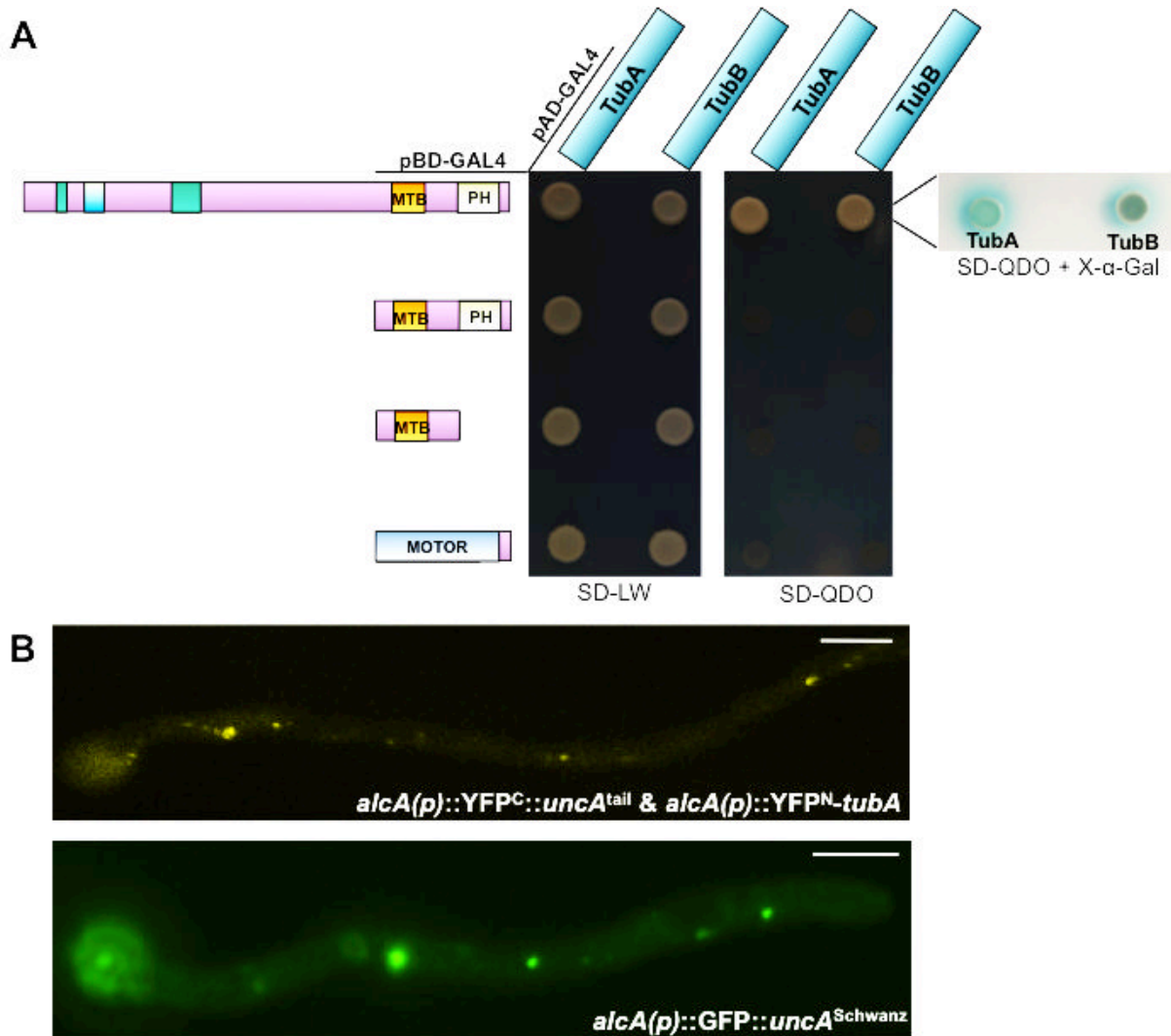
Hierfür wurde der vollständige Schwanzbereich von UncA, direkt beginnend nach der Motordomäne bis hin zum Stopkodon (352-1931aa) in dem *S. cerevisiae* Stamm AH109 mittels des Vektors pGBKT7 exprimiert (yCoS8). Dieser Stamm wurde wiederum mit dem kompatiblen Stamm Y187 gekreuzt, der jeweils die volle Länge der beiden  $\alpha$ -Tubuline, *tubA* (yCoS1) oder *tubB* (yCoS2) in dem Vektor pGADT7, exprimiert. Beide *A. nidulans*  $\alpha$ -Tubuline zeigten eine Interaktion mit dem Schwanzbereich von UncA (**Abb. 15 A**).

Außerdem wurde die UncA<sup>Schwanz</sup>- TubA und TubB Interaktion in *S. cerevisiae* dahingehend untersucht, ob mit künstlich detyrosinierten  $\alpha$ -Tubulinen (TubA<sup>Y</sup> und TubB<sup>Y</sup>) eine Verstärkung der Interaktion zu beobachten ist. Die Interaktion war zwar auch positiv, aber war eine Quantifizierung der Interaktionsstärke nicht möglich, da alle vier Interaktionen unter einer adäquaten Detektionsgrenze lagen.

Um die genaue Interaktionsstelle mit  $\alpha$ -Tubulin spezifischer einzugrenzen, wurden entsprechend verschiedenen Längen von UncA exprimiert und in *S. cerevisiae* exprimiert. Jedoch zeigte sich in Y2H- Untersuchungen, dass lediglich die volle Länge des Schwanzes mit den beiden  $\alpha$ -Tubulinen eine positive Interaktion zeigte. Selbst Interaktionstests mit der UncA Motordomäne, welche zwei MT Bindestellen enthält, waren negativ (**Abb. 15 A**). Was bedeuten könnte, dass die Motordomäne nicht fähig ist das monomere  $\alpha$ -Tubulin im Y2H zu binden, oder, dass der Schwanzbereich für eine ordnungsgemäße Funktion der Motordomäne essentiell ist. Auch Interaktionstests zwischen dem Motor und dem Schwanz selbst waren negativ, was darauf hindeutet, dass ein intramolekulares Falten zwischen Motor und Schwanz nicht die Aktivität oder Spezifität reguliert.

Da diese Interaktionstests durch das *S. cerevisiae* Zwei- Hybrid- System künstlich im Kern stattfinden, ist es nicht auszuschließen, dass es, durch in *S. cerevisiae* kodierte Proteine, die eine Interaktion "überbrücken" könnten, zu einer falsch positiven Interaktion gekommen sein könnte. Deshalb wurde die Interaktion zusätzlich mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in *A. nidulans* verifiziert. Die jeweiligen Transformanten, welche die *alcA::YFP<sup>N</sup>::tubA<sup>3,1kb</sup>* und *alcA::YFP<sup>C</sup>::uncA<sup>Schwanz</sup>* Plasmide homolog integriert hatten, zeigten punktartige Akkumulationen unterschiedlicher Größe, welche sich teilweise anterograd und retrograd bewegt haben (**Abb. 15 B**). Dies lässt darauf schließen, dass der

Schwanz von UncA noch immer an seine spezifischen Vesikel, welche neben Kinesin-3 aber auch durch Dynein transportiert werden können (Zekert & Fischer, 2009), binden kann. Wahrscheinlich findet die beobachtete Interaktion auch mit freiem zytoplasmatischen  $\alpha$ -Tubulin statt und nicht mit dem in MT polymerisiertem Tubulin. Zur Untersuchung der Hypothese des möglichen Bindens des UncA Schwanzbereiches an Vesikel, wurde zusätzlich eine N-terminale GFP- Fusion des UncA- Schwanzes untersucht und offenbarte das selbe Lokalisierungsmuster wie die positive Interaktion im BiFC (**Abb. 15 B**).



**Abbildung 15: Der Schwanzbereich von UncA kann  $\alpha$ -Tubulin direkt binden. (A)** Y2H-Analyse zur Bestimmung der Interaktionsdomäne. Auf der linken Seite sind die Konstrukte schematisch dargestellt, welche zur Interaktion getestet wurden. Nur der komplette Schwanz UncAs konnte mit den beiden  $\alpha$ -Tubulinen TubA (yCoS1) und TubB (yCoS2) interagieren. Die Transformanten wurden zum einen auf Selektionsmedium SD-LW (SD-Leu-Trp) getropft um die Kotretransformation beider Plasmide zu bestätigen und zum anderen auf dem Hochstringenzmedium SD-QDO (SD-Leu-Trp-Ade-His) zur Selektion positiver Interaktionen. Die Platten wurden bei 30°C für 2 Tage inkubiert. Die Stärke der Interaktion ist im X- $\alpha$ -Gal Test zu sehen. **(B)** BiFC mit YFP<sup>C</sup>-UncA<sup>Schwanz</sup> und YFP<sup>N</sup>-TubA bestätigt die Interaktion in *A. nidulans*. Unten ist die GFP- Fusion des UncA- Schwanzes im WT in Form von kleinen Vesikeln, die bidirektionale Motilität zu sehen. Maßstab entspricht jeweils 5  $\mu$ m.

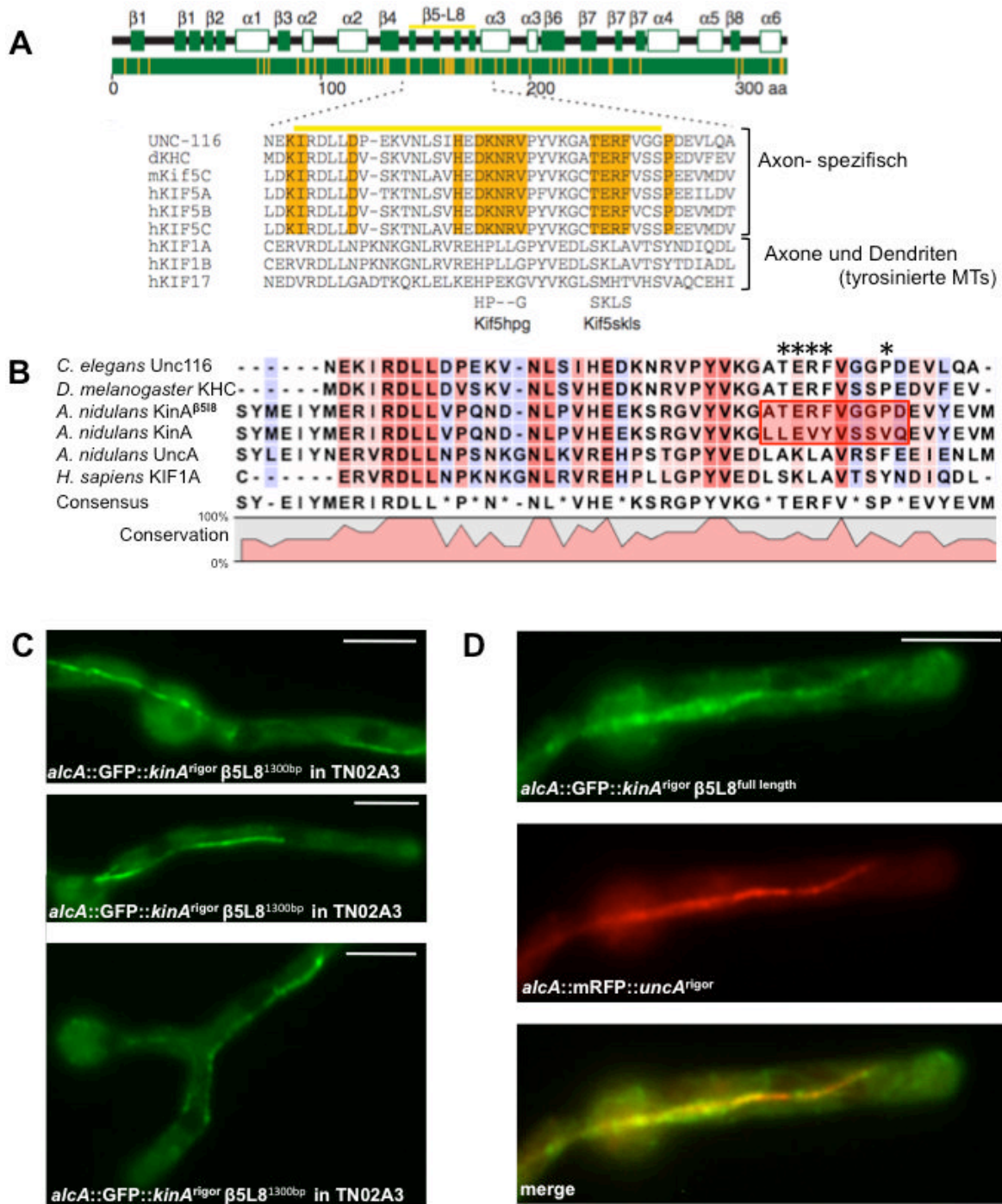
### 1.5. Eine künstliche $\beta$ 5L8- Schleife in der Motordomäne von KinA ist für die Spezifität für die selbe MT- Subpopulation verantwortlich

In Neuronen von Ratten konnte 2009 gezeigt werden, dass Kinesin-1 zwischen detyrosinierten und tyrosinierten MT mittels spezifischer Sequenzen in der sogenannten  $\beta$ 5L8- Schleife der Motordomäne unterscheiden kann (Konishi & Setou, 2009) (**Abb. 16 A**). In diesen Neuronen bevorzugen manche Kinesine Axone als Ziel (unidirektional), wohingegen bidestinale Kinesine sowohl Axone als auch Dendriten als Bestimmungsort wählen. Die Tubuline der MT in Dendriten sind hauptsächlich tyrosiniert und in den Axonen detyrosiniert, so können die unterschiedlichen Kinesine ihre Strecken differenzieren. Bei Austausch einer spezifischen TERF Aminosäuresequenz durch SKLS in der  $\beta$ 5L8- Schleife der Motordomäne kommt es zu einem Verlust der axonspezifischen Aktivität von Kinesin-1 in Neuronen des Hippocampus im Ratten- Modell (Konishi & Setou, 2009).

Um einen weiteren Hinweis auf die Existenz von Detyrosinierung als mögliche PTM von  $\alpha$ -Tubulin in *A. nidulans* zu erlangen, wurde untersucht, ob dieses Motiv als Marker für detyrosinierte MT dienen könnte. Hierfür wurde das konventionelle Kinesin, KinA, an der korrespondierenden Stelle im Motor durch ortsgerichtete Mutagenese so modifiziert, dass es anschließend das für die Spezifität identifizierte TERF- Aminosäuremotiv in der  $\beta$ 5L8 Schleife enthielt (**Abb. 16 B**).

Das veränderte KinA wurde N-terminal mit GFP fusioniert und in TN02A3 transformiert (SCoS128). Das Einbringen der zusätzlichen *rigor* Mutation war notwendig, um das permanente Binden an MT zu gewährleisten, da KinA unmodifiziert lediglich im Zytoplasma lokalisiert und wahrscheinlich nur kurze transiente Bindungen zu MT aufbaut. KinA<sup>rigor</sup> zeigt normalerweise keine Präferenz für MT- Subpopulationen und bindet deshalb an alle MT in den Hyphen. Erstaunlicherweise führte das Einbringen der  $\beta$ 5L8 Schleife in KinA<sup>rigor</sup> tatsächlich zu der Erkennung lediglich einer Subpopulation durch KinA<sup>rigor</sup> $\beta$ 5L8 (**Abb. 16 C**).

Anschließend kam natürlich die Frage auf, ob es sich hierbei um die gleiche Subpopulation an MT handelt, wie diese, die durch UncA<sup>rigor</sup> erkannt wird. Deshalb wurde das GFP-KinA<sup>rigor</sup> $\beta$ 5L8 in den mRFP-UncA<sup>rigor</sup> exprimierenden Stamm SNZ54 transformiert und kolokalisiert. Es konnte eine klare Kolokalisierung beobachtet werden (SCoS144) (**Abb. 16 D**). Dies ist ein weiterer Hinweis für das Vorhandensein von PTM und im Speziellen von detyrosinierten MT in *A. nidulans*.



**Abbildung 16: MT- Spezifität kann mit Hilfe einer Modifikation der  $\beta 5L8$ - Schleife in der Motordomäne des konventionellen Kinesins, KinA, erzeugt werden. (A)** Proteinsequenzvergleich der  $\beta 5L8$ - Schleife zwischen unidestinalen Kinesinen, die Axone als Ziel bevorzugen und bidestinalen Kinesinen, welche sowohl Axone als auch Dendriten, die vorwiegend tyrosiniertes Tubuline enthalten, als Bestimmungsort wählen. Bei Austausch der TERF Aminosäuresequenz mit SKLS kommt es zu einem Verlust der axonspezifischen Aktivität von Kinesin-1 in Neuronen des Hippocampus in Ratten, modifiziert nach Konishi & Setou, 2009. **(B)** Proteinsequenzvergleich mit uni- (Unc-116 und KHC) und bidirektionalen Kinesinen (KIF1A) zur Einordnung der beiden *A. nidulans* Kinesine KinA und UncA. Die korrespondierende TERF Stelle (Sterne) in der  $\beta 5L8$ - Schleife wurde analog mittels Mutagenese in KinA modifiziert (roter Kasten). **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Analysen des N-terminal mit GFP gekoppelten, modifizierten KinA<sup>rigor</sup> $\beta 5L8$  zeigen, dass das sonst unspezifische KinA<sup>rigor</sup> modifiziert nun selektiv an eine MT- Subpopulation bindet (SCoS128). **(D)** Kolokalisierung des GFP-KinA<sup>rigor</sup> $\beta 5L8$  Fusionsproteins mit mRFP-UncA<sup>rigor</sup> (SCoS144). Beide Kinesine bevorzugen dasselbe MT-Bündel in *A. nidulans*. Maßstab entspricht jeweils 5  $\mu$ m.

## Kapitel II

### Charakterisierung der Cargos von UncA

Zur Analyse der Komponenten, die durch UncA transportiert werden, wurden mehrere Strategien verfolgt. Es sollten mit Hilfe von Interaktions- und Koloalierungstests, Saccharosedichtegradientenzentrifugation, sowie Y2H- Analysen neue Vesikelpopulationen und -inhalte charakterisiert wurden. Ein Verständnis der transportierten Cargos könnte helfen die zellbiologische Rolle von UncA zu verstehen.

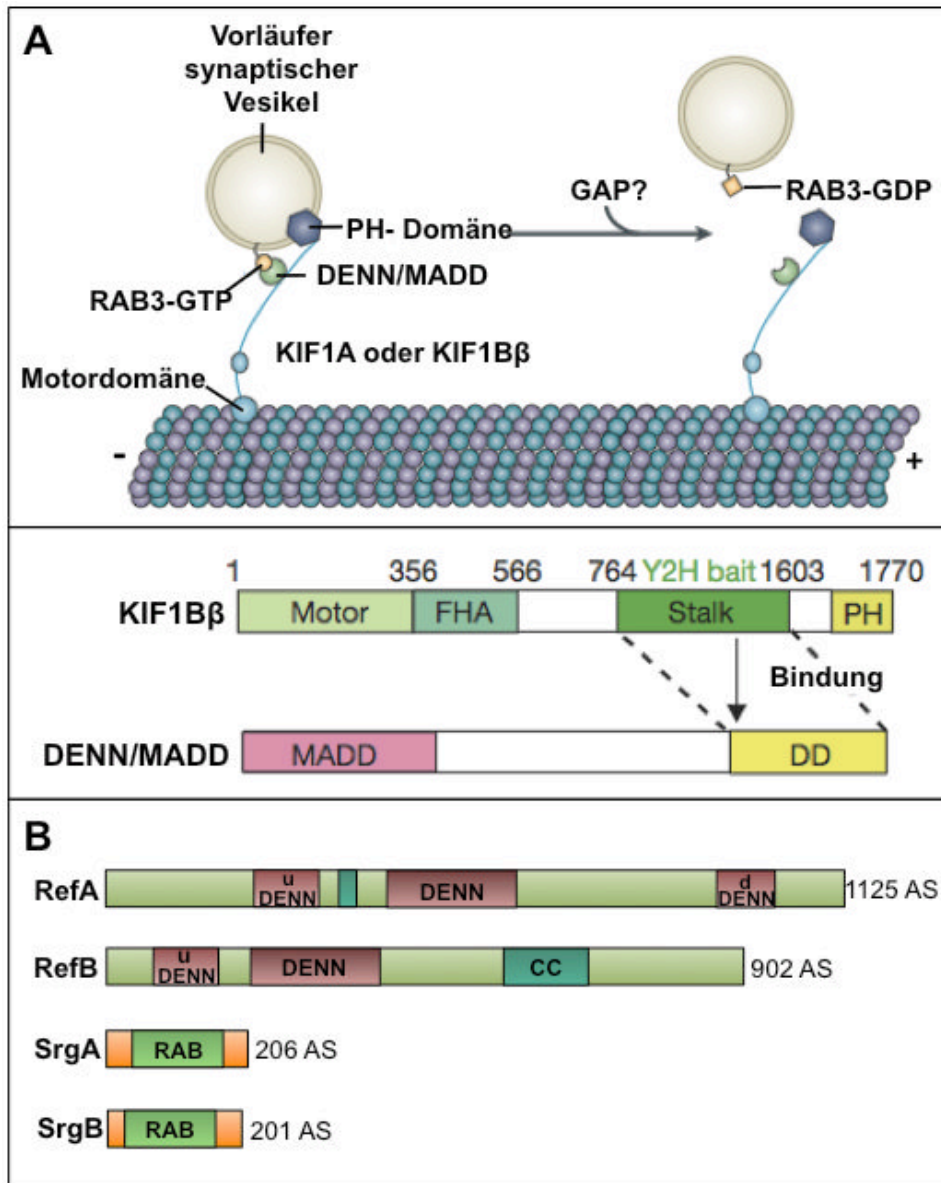
#### 2.1. Gezielte Analyse potentieller UncA- Interaktoren, erweitert das Wissen über die Zusammensetzung der transportierten Vesikel

Zunächst wurde im *A. nidulans* Genom nach Proteinen gesucht, für die eine Rolle im Kinesin-3 vermittelten Transport in anderen Organismen zeigten. Daraufhin wurden DENN/MADD vermittelte Rab3-Kinesin-3 Interaktionen untersucht, wobei DENN/MADD Protein als Rab GTPasen Austauschfaktoren beschrieben werden (Marat *et al.*, 2011). Ebenfalls wurden auch einige endosomale Komponenten subzellulär lokalisiert und im BiFC-System auf eine UncA- Interaktion hin untersucht. Zum anderen erfolgten Interaktionsstudien zwischen UncA und in unserem Labor etablierten Markern für sekretorische Vesikel. Auch der in *U. maydis* beschriebende Kin-3 abhängige Transport von mRNA-Bindeproteinen (Baumann *et al.*, 2012) wurde hier analog in *A. nidulans* untersucht.

##### 2.1.1. Rab-3 markierte Vesikel werden von UncA transportiert

Die beiden Kinesin-3 Motoren KIF1A und KIF1B $\beta$  sind für den Transport von synaptischen Vesikelvorläufern in Neuronen essentiell (Okada *et al.*, 1995). Diese Vorläufer werden im Zellkörper gebildet und entlang des Axons transportiert und dann in reife synaptische Vesikel via Endozytose einsortiert. Zur Regulation des Erkennens und Ladens der Vesikel durch KIF1A werden so genannte DENN/MADD Proteine (*differentially expressed in normal and neoplastic cells/ MAP kinase activating death domain*) benötigt. Diese interagieren durch deren *death domain* direkt mit dem Schwanz des Kinesin-3 Motors und gleichzeitig mit Rab3 und vermitteln so indirekt die Bindung zwischen Kinesin und dessen Transportgut (Niwa *et al.*, 2008). Denn Rab3 ist wiederum eine kleine GTPase, welche an der Oberfläche synaptischer Vesikel sitzt und die Vesikel durch Exozytoseprozesse regulieren kann (Stettler *et al.*, 1994; Geppert *et al.*, 1997). Der GTP/ GDP-Zustand des Rab-3, welcher dann die Aktivität der GTPase bestimmt, wird über DENN/MADD Proteine reguliert, die somit als Effektoren der Rab3- Aktivität agieren und wiederum das Binden an das Motorprotein vermitteln (**Abb. 17 A**).

Um zu analysieren, ob in *A. nidulans* das Erkennen der spezifischen durch Kinesin-3 transportierten Vesikel durch einen ähnlichen Mechanismus vermittelt wird, wurde im Genom nach den entsprechenden Homologen gesucht. Die beiden identifizierten DENN/MADD Kandidaten, AN4349 und AN0575 (**Abb. 17 B**) wurden RefA (AN4349) und RefB (AN0575) genannt (Ref steht für *Rab GTPase exchange factor*).



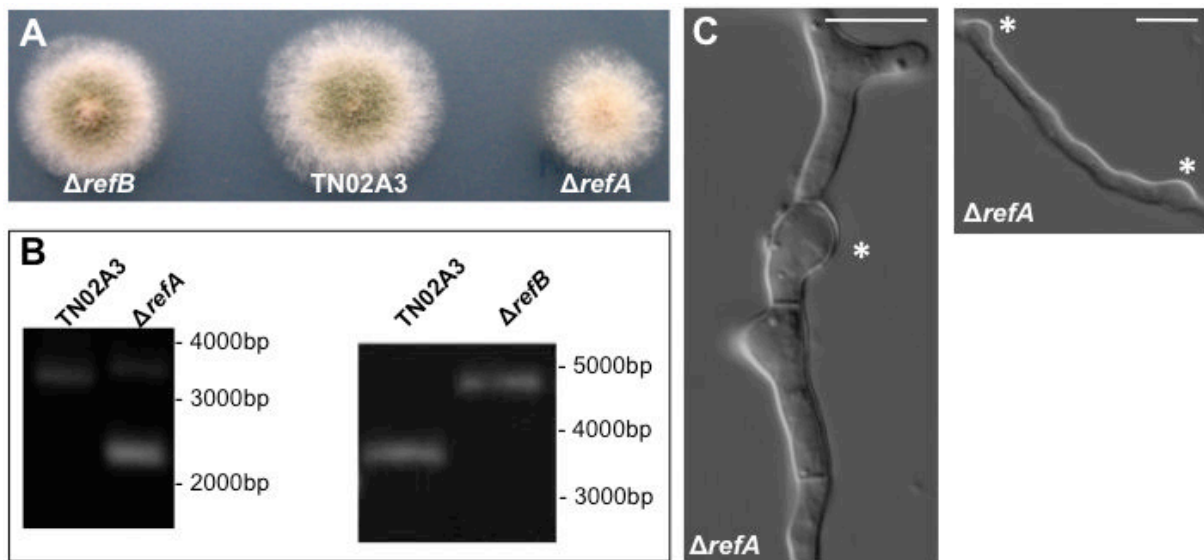
**Abbildung 17: DENN/MADD vermittelt in Neuronen die Bindung zwischen Kinesin-3 Motor und dessen Transportgut und reguliert so den Prozess des Erkennens und Laden.** (A) Oben: Schematische Darstellung der Rab3- DENN/MADD- Kinesin-3 Interaktion und der GAP- Funktion des DENN/MADD für die kleine GTPase Rab3. Unten: DENN/MADD interagiert direkt mit dem Schwanz von KIF1Bβ über die *death domain*, modifiziert nach Niwa *et al.*, 2008. (B) Überblick der entsprechenden DENN/MADD- Homologe RefA (AN4349) und RefB (AN0575) und der Rab3- Homologe SrgA (AN6974) und SrgB (AN4281) in *A. nidulans*.

Die DENN/MADD Proteine weisen jeweils eine DENN- Domäne auf, die von uDENN (*upstream*) und dDENN (*downstream*) Motiven umgeben wird; die dDENN- Domäne konnte jedoch im Falle von RefB nicht annotiert werden. Es ist bekannt, dass die dreiteiligen DENN-



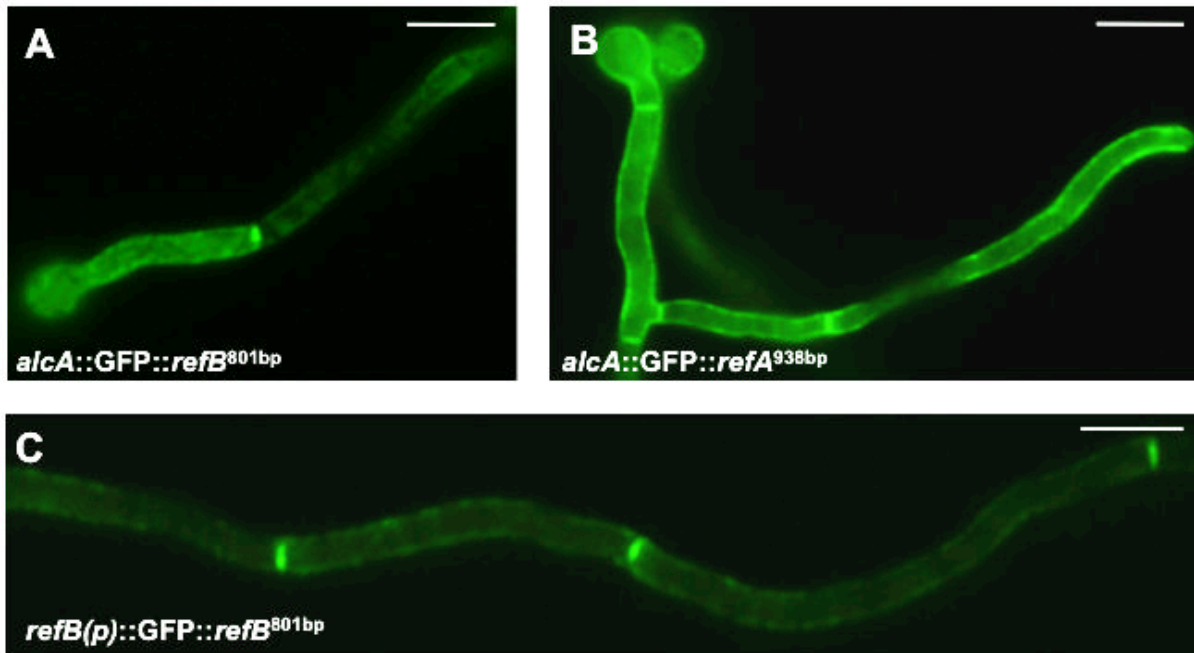
Domänen in verschiedenen Proteinen gefunden werden, die in Rab- vermittelten Prozessen oder an der Regulierung von MAPK Signalwegen (*mitogen- activated protein kinase*) involviert sind (Levivier *et al.*, 2001).

Beide Gene wurden deletiert und weisen Wachstumsdefekte auf (**Abb. 18 A,B**).  $\Delta refA$  (SCoS93) wächst kompakter und weist deutlich weniger Sporen auf als der Wildtyp, aber auch die Deletion von *refB* (SCoS95) führt zu einem verlangsamten Wachstum, jedoch ist hier der Effekt geringer als in  $\Delta refA$ . In den Hyphen des *refA* Deletionsstammes sind auffällige, abnormale Schwellungen zu beobachten und kurvigeres Auswachsen der Keimlinge, was auf eine Rolle im polaren Wachstum hindeutet (**Abb. 18 C**).



**Abbildung 18: Deletion der beiden DENN/MADD- Homologe in *A. nidulans* führt zu Wachstums- und Polaritätsdefekten. (A)** Wachstumsvergleich von  $\Delta refB$ , TN02A3 und  $\Delta refA$ . **(B)** Southern Blots mit LB- Sonden bestätigen die Deletionen. Die gDNA wurde im linken Blot mit *SacI* verdaut und es wurde im WT eine Bande bei 3034bp und bei  $\Delta refA$  zwei Banden bei 2241bp und 3253bp erwartet. Der  $\Delta refB$  Southern Blot rechts wurde mit *PvuII* geschnittener gDNA durchgeführt und es wurde eine Bande bei 3168bp im WT und bei 4290bp in der Deletion prognostiziert. **(C)** Auffällige Schwellungen (Sterne) und generell kurvigeres Wachstum sind in den Keimlingen von  $\Delta refA$  zu beobachten. Der Maßstab entspricht 5  $\mu$ m.

Subzelluläre Lokalisierungen durch N-terminale GFP- Fusionen unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA* Promotors sollten erste Hinweise auf die Funktion dieser Proteine geben. Diese zeigten, dass beide Proteine zum einen in der Plasmamembran und an den Septen sitzen, sich zum anderen aber auch als kleine Vesikel, die sich entlang der Hyphen bewegen (**Abb. 19 A,B**). Um falsche Lokalisierungsmuster oder Artefakte, verursacht durch die Überexpression, auszuschließen, wurde die Expression zusätzlich unter dem natürlichen Promotor untersucht und wies die gleiche Verteilung auf (**Abb. 19 C, Film 1**).

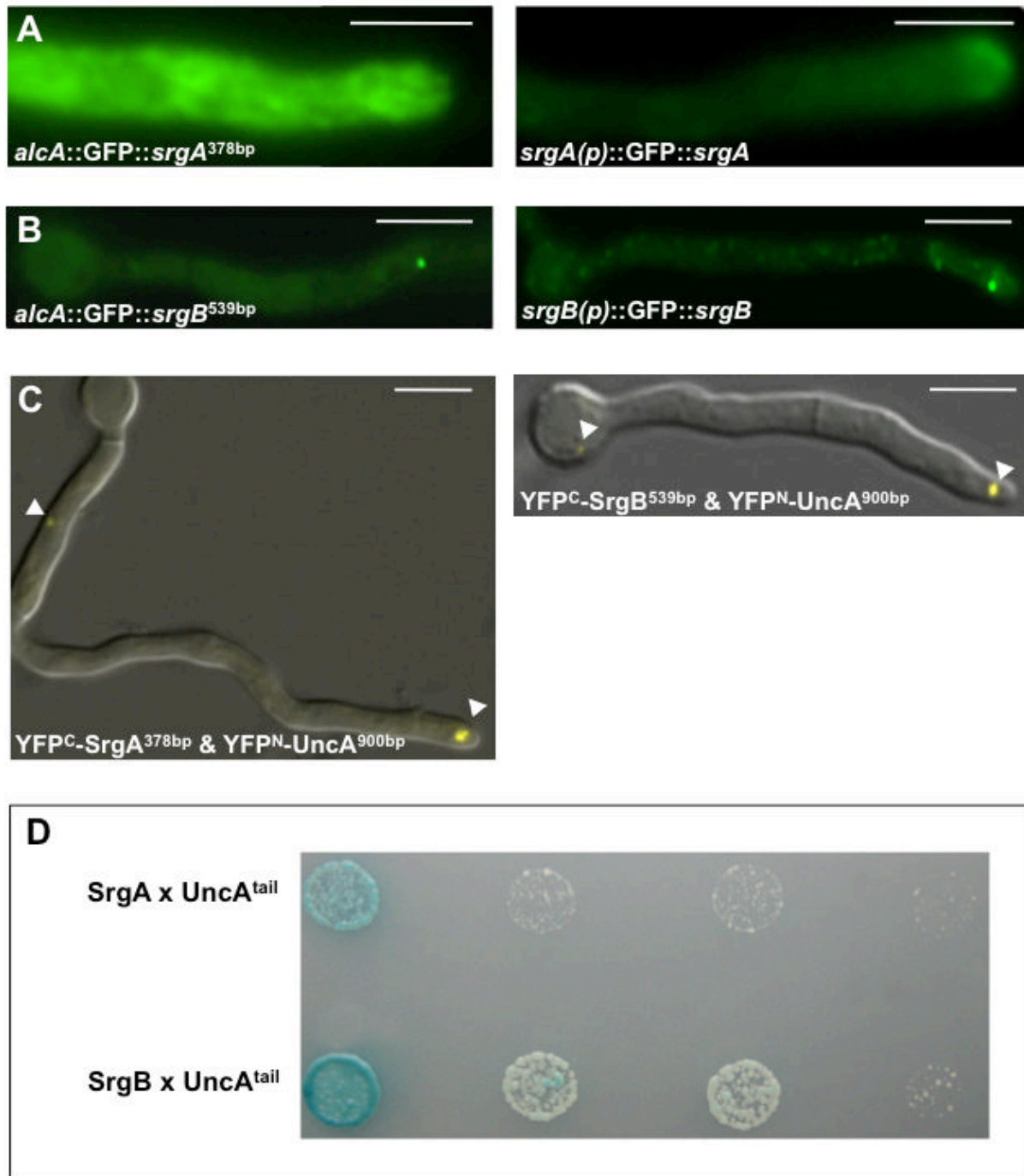


**Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisierung der DENN/MADD Proteine in *A. nidulans*.** (A,B) N-terminale GFP- Fusionen unter der Kontrolle des *alcA* Promotors zeigen Signale an der Plasmamembran und an Septen, sowie kleine, sich rasant bewegende, Punkte. (C) GFP-RefB unter natürlicher Expression zeigt ein identisches Muster. Der Maßstab beträgt jeweils 5 µm.

Um eine Interaktion mit dem Kinesin-3 Motor UncA zu untersuchen, wurden Y2H- und BiFC-Analysen durchgeführt. Beides war jedoch negativ und eine direkte Regulation von UncA durch DENN/MADD Proteine konnte ausgeschlossen werden. Auch Interaktionstests mit den beiden Rab3- Homologen, SrgA und SrgB, zeigen keine konservierte DENN/MADD- Rab3 Interaktion wie in Neuronen gezeigt wurde (Niwa *et al.*, 2008).

Auch die beiden Rab3- Homologe SrgA (AN6974) und SrgB (AN4281) (**Abb. 17 B**) wurden im Rahmen dieser Arbeit N-terminal mit GFP markiert und mit *alcA* und auch mit dem natürlichen Promotor exprimiert. Die überexprimierten Stämme zeigten jeweils extrem schnelle Bewegungen von zahlreichen kleinen Vesikeln entlang der Hyphe. Wohingegen mit natürlichem Expressionslevel im Fall von SrgB (*S. cerevisiae* YPT1 Homolog) einzelne Vesikel zu beobachten waren (**Abb. 20 A**). Natürlich exprimiertes GFP-SrgA (*S. cerevisiae* SEC4 Homolog) lokalisierte, genauso wie in *N. crassa* (persönliche Mitteilung E. Sanchez-Leon Hing) verstärkt an der Hyphenspitze (**Abb. 20 B**). Eine Interaktion mit dem Schwanz von UncA konnte sowohl im BiFC- als auch im Y2H- System mit beiden Kandidaten verifiziert werden (**Abb. 20 C**).

Demnach findet keine DENN/MADD vermittelte Interaktion, wie es in Neuronen gezeigt wurde (Niwa *et al.*, 2008), statt, sondern ein direkter Kontakt des Kinesin-3 Schwanzes mit den Rab3- GTPasen, die in der Membran der Vesikel sitzen.



**Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisierung der beiden Rab3 Homologe in *A. nidulans* mit unterschiedlichen Expressionslevel (*alcA* und natürlicher Promotor) und deren positive Interaktion mit dem UncA- Schwanzbereich. (A)** GFP-SrgA lokalisiert überexprimiert in Form von vielen Vesikeln, die sich rasant durch die Hyphe bewegen (links). Unter der Expression des natürlichen Promotors jedoch sieht man lediglich eine schwache Akkumulation an der Hyphenspitze (rechts). **(B)** GFP-SrgB bindet jeweils schnell bewegende Vesikel unter der Regulation des *alcA* Promotors (links), deren Anzahl unter natürlicher Expression deutlich geringer ist und daher diese dann deutlich besser zu verfolgen sind (rechts). **(C)** BiFC mit der YFP-N Hälfte fusioniert mit dem UncA- Schwanz zeigt mit beiden Rab3- Homologen, jeweils fusioniert mit der YFP-C Hälfte, ein deutliches punktförmiges Signal an den Hyphenspitzen, aber auch vereinzelt Akkumulationen in distalen Hyphenkompartimenten (Pfeile). Der Maßstab beträgt jeweils 5  $\mu\text{m}$ . **(D)** Y2H- Analysen bestätigen die Interaktion. Hier wurde eine Verdünnungsreihe der Kotreformanten auf das Hochstringenzmedium SD-QDO mit X- $\alpha$ -GAL getropft. Die Platten wurden bei 30°C für 2 Tage inkubiert.

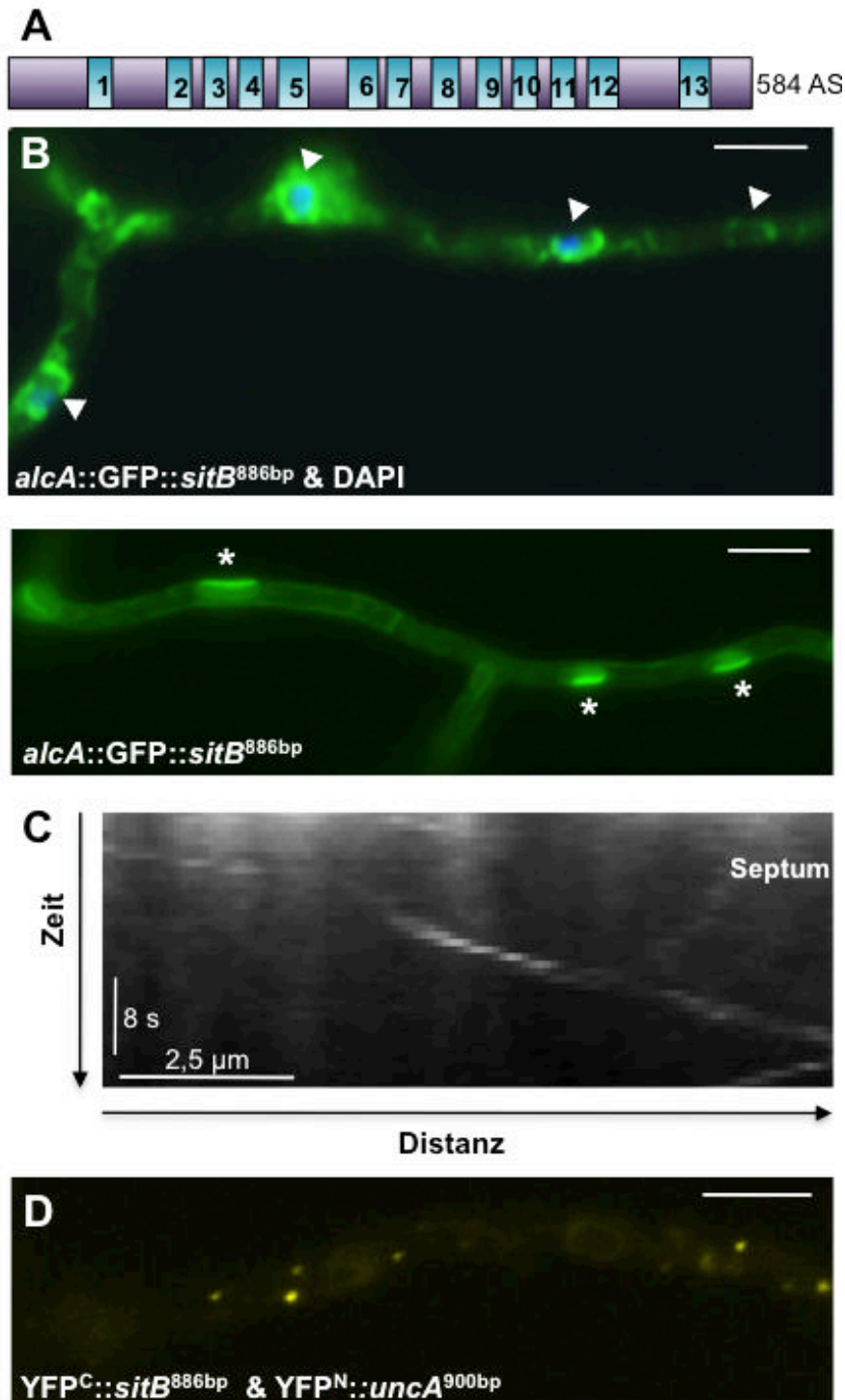
### 2.1.2. UncA spielt eine Rolle im Transport eines in Form von Endosomen recycelten Transmembrantransporters

Um weitere Proteine, die von UncA direkt oder auch indirekt über Endosomen transportiert werden, zu finden, wurden gezielt Kandidaten ausgewählt, anschließend mit GFP- Fusionen lokalisiert und mit BiFC auf eine Interaktion mit UncA hin getestet.

Bei einem der Kandidaten handelt es sich um einen transmembranen Siderophortransporter SitB (AN5378), dem *S. cerevisiae* SIT1 - *siderophore iron transport*-Homolog in *A. nidulans*. Es gibt mehrere Möglichkeiten der Zelle zur Eisenaufnahme: Zum einen über niedrige und hohe Affinitäts- Transportsysteme, wie zum Beispiel Metalloreduktasen (Dix *et al.*, 1994; Stearman *et al.*, 1996), zum anderen aber auch mittels Exkretion von Siderophoren. Siderophore sind Eisen- chelatierende Moleküle, die mit dem am häufigsten vorkommenden, aber unlöslichen  $\text{Fe}^{3+}$ , was in dieser Form für die Zelle aber nicht zugänglich ist, komplexieren. Sie werden erst eisenfrei sekretiert, komplexieren dann außerhalb der Zelle mit Eisen und werden dann wieder mittels spezifischen Siderophortransportern aufgenommen. Solche Transportvorgänge werden unter anderem durch Vertreter der ARN Transporterfamilie bewerkstelligt, die spezifisch Eisen- Siderophor-Chelate erkennen und bei Eisenmangel induziert werden können (Yun *et al.*, 2000a; Yun *et al.*, 2000b). Es wurde gezeigt, dass zwei Transporter dieser Familie in endosomähnlichen intrazellulären Vesikeln und in der Plasmamembran lokalisieren (Kim *et al.*, 2002). Weiterhin wurde konstatiert, dass sich die Lokalisierung, abhängig von der Eisen-Siderophorkonzentration, verändert. Ohne Substrat werden die Transporter vom Golgi direkt in Endosomen kompartmentiert und nicht zur Plasmamembran befördert, wohingegen dies genau bei niedrigen Konzentrationen der Fall ist. Bei hohen Eisen-Siderophorkonzentrationen findet ein schneller Zyklus zwischen Exposition an der Plasmamembran und schnell erfolgender Endozytose statt (Kim *et al.*, 2002).

Lokalisierungsexperimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob UncA auch bei diesen Transportvorgängen involviert sein könnte. Hierfür wurde mit der Überexpression des Transporters, welcher von 13 Transmembrandomänen durchzogen ist, begonnen (**Abb. 21 A**). Das GFP-SitB Fusionsprotein lokalisierte in Strukturen, die den Zellkern umgeben, wahrscheinlich dem ER (**Abb. 21 B**, Pfeile), in der Plasmamembran, an den Septen und in sich schnell bewegenden Vesikeln (**Film 2**). Es wurde auch beobachtet, dass das Signal auf einer Seite, des den Zellkern umgebenden ERs oftmals intensiver erschien (**Abb. 21 B**, Sterne). Ein Kymograph zeigt die bidirektionale Motilität eines exemplarischen Vesikels, das durch GFP-SitB markiert wurde. Und mittels BiFC konnte eine Interaktion mit UncA nachgewiesen werden. Das BiFC zeigt sich rasant bewegende Vesikel und Akkumulationen

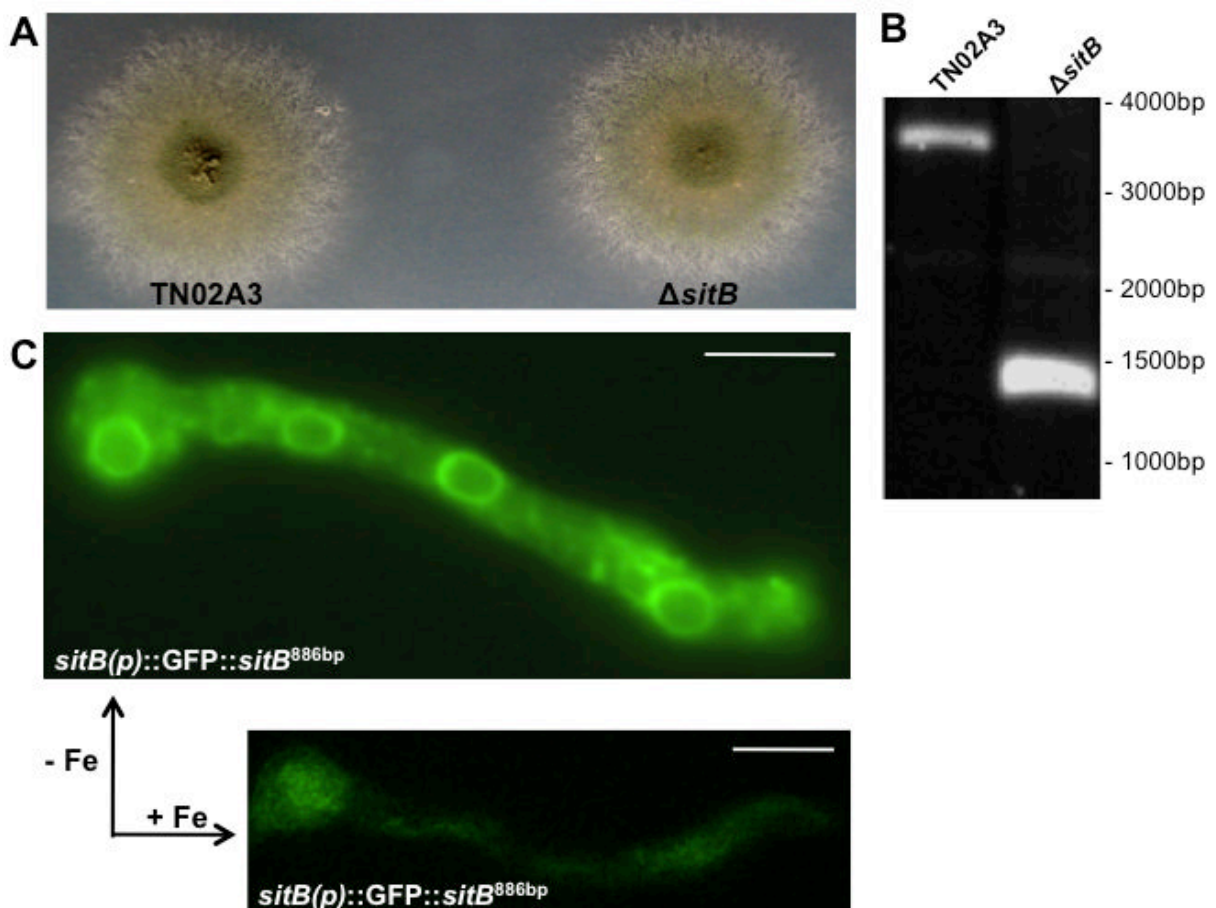
um den Zellkern, jedoch kein Signal entlang der Plasmamembran (**Abb. 21 C**). Demnach ist UncA an dem Transport der in Endosomen internalisierten Transporter beteiligt.



**Abbildung 21: Lokalisierung des Siderophortransporters SitB und dessen Interaktion mit UncA.** (A) Schematische Darstellung der 13 Transmembrandomänen, die den Transporter durchziehen und die Lokalisierung in der Plasmamembran bewerkstelligen. (B) Überexpression von GFP-SitB und DAPI Kofärbung zeigt Akkumulationen um den Zellkern (Pfeile), welche oftmals an einer Seite des Zellkerns intensiver erschienen (unten, Sterne), auch sind Signale in Plasmamembran, Septen und in kleinen sich bewegenden Vesikeln zu sehen. (C) Die bidirektionale Motilität der Vesikel wurde mit dem Kymographen visualisiert. (D) BiFC zwischen SitB und UncA, beides überexprimiert durch *alcA*, zeigt schnell bewegende Vesikel und schwache Signale um den Zellkern. Der Maßstab beträgt jeweils 5 µm.

Zur näheren Analyse wurde der Transporter deletiert, zeigte jedoch keinen offensichtlichen Wachstumsdefekt, was zu erwarten war, da zum einen Medium verwendet wurde, in dem kein Eisenmangel herrschte und zum anderen, da es wie oben bereits erwähnt, alternative Eisen- Aufnahmemöglichkeiten der Zelle gibt (**Abb. 22 A, B**).

Daraufhin wurde die Lokalisierung des Transporters unter dem natürlichen Promotor mit und ohne Eisenstress durchgeführt, um die Beobachtung der Eisen- Siderophor-Chelatkonzentration abhängigen Lokalisierungsmusters der *ARN* Transporter in *S. cerevisiae* von Kim *et al.* (2002) auch in *A. nidulans* zu untersuchen. Es wurde beobachtet, dass unter Eisenrestriktion eine vergleichbare Verteilung der Signale zu beobachten war, wie durch die Überexpression erzielt wurde, unter Eisenüberfluss konnte jedoch kaum eine Expression detektiert werden (**Abb. 22 C**). Demnach liegt auch in *A. nidulans* eine konzentrationsabhängige Expression des *SIT1* Homologs vor.



**Abbildung 22: Deletion des putativen Siderophortransporters SitB zeigt keine Polaritätsdefekte, jedoch eine Eisen- konzentrationsabhängige Lokalisierung. (A)** Wachstumsvergleich zeigt auf Minimalmedium keine Polaritätsdefekte. **(B)** Southern Blot zur Bestätigung der Deletion. Die *SacI* und *XmaI* verdauete DNA wurde mit einer RB- Sonde hybridisiert. Beim WT wurde eine Bande bei 3437bp und in  $\Delta sitB$  bei 1296bp erwartet. **(C)** Eisen- konzentrationsabhängige Lokalisierung des GFP-SitB exprimiert unter dem natürlichen Promotor. Der Maßstab beträgt jeweils 5  $\mu$ m.

### 2.1.3. UncA ist an der Überführung von Vesikeln vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt

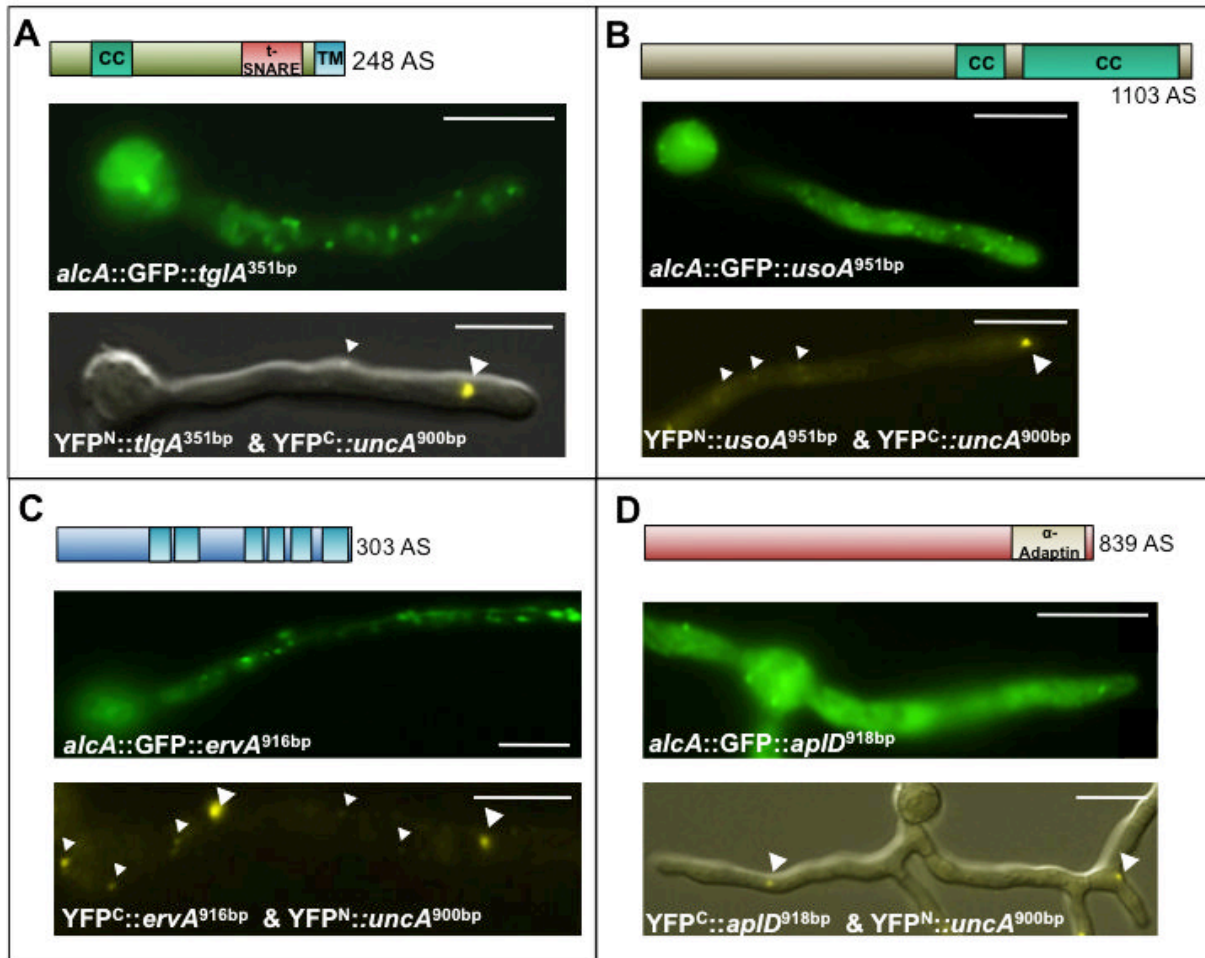
Weiterhin wurden bereits bekannte endosomale Proteine, wie TlgA (t-SNARE), welches unter anderem zusammen mit Tlg2 in *S. cerevisiae* einen Komplex bildet, der die Fusion endosomal -abgeleiteter Vesikel mit dem Golgi Apparat vermittelt (Coe *et al.*, 1999), im Folgenden untersucht. Die Lokalisierung in zahlreichen sich schnell bewegenden Vesikeln ähnelte stark dem bereits in *A. nidulans* etablierten Endosomenmarker TlgB (Zekert & Fischer, 2009) (**Abb. 23 A**). Die Interaktion mit UncA, die durch BiFC bestätigt wurde, findet in einzelnen, punktuellen Akkumulationen nahe der Hyphenspitze statt.

UsoA, ein weiteres untersuchtes Protein, spielt in *S. cerevisiae* eine zentrale Rolle in der Anbindung sekretorischer Vesikel, die sich vom ER abschnüren, an frühe Golgimembranen (Cao *et al.*, 1998). Das GFP-UsoA Fusionsprotein lokalisiert in *A. nidulans* in sich schnell bewegenden Vesikeln und zeigt im BiFC auch mehrere kleine motile Punkte und nahe der Hyphenspitze eine stärkere punktförmige Akkumulationen (**Abb. 23 B**). Die Lokalisierung ähnelt sehr stark dem Uso1 Homolog in *N. crassa* (persönliche Mitteilung E. Sanchez Leon- Hing).

In dem Transport zwischen ER und Golgi involviert ist auch das *S. cerevisiae* ERV29 Homolog AN1117, welches von sechs Transmembrandomänen durchzogen wird (**Abb. 23 C**, oben). AN1117 wurde wegen der Homologie zu EVR29 ab sofort als ErvA bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass ERV29 eine Rolle im Sammeln sekretorischer Vesikel im ER spielt und diese zu transportfähigen COPII Vesikel packt, welche dann zum Golgi Komplex transportiert werden (Belden & Barlowe, 2001). Durch GFP- Fusion konnte auch hier bidirektionale Motilität einzelner ErvA- markierter Vesikel beobachtet werden (**Film 3**). Eine Interaktion mit UncA, mittels BiFC visualisiert, ist in Form von Vesikeln zu sehen (**Abb. 23 C**).

Ein ganz ähnliches Lokalisierungsmuster weist ein weiterer untersuchter Kandidat, AN4207, auf. Hierbei handelt es sich um ein in *S. pombe* bereits beschriebenes Apl4 Homolog, welches für ein Adaptin codiert, das wiederum eine Untereinheit des Adaptor Komplexes 1 (AP1) ist. Der AP1 Komplex ist ein Adaptor, der in Chlathrin- vermitteltem Membrantransport und vorrangig an dem Transportprozessen von Endosomen zum Trans-Golgi- Netzwerk (TGN) involviert (Ma *et al.*, 2009). Aufgrund der Homologie zu Apl4 wurde AN4207 im Folgenden als ApID bezeichnet. Eine Interaktion zwischen ApID und UncA mit Hilfe des BiFC- Systems ist in einzelnen Vesikel zu beobachten (**Abb. 23 D**).

Somit konnte gezeigt werden, dass UncA in vielen zellulären Transportvorgängen wie ER- Golgi, Endosomen- TGN und Endosomen- Langstreckentransport mitwirkt.



**Abbildung 23: GFP-Lokalisierungen unter der Expression des *alcA* Promotors und BiFC-Analysen mehrerer UncA- Interaktoren in *A. nidulans*.** (A) GFP-TlgA, ein Endosomenmarker mit einer t-SNARE- Domäne, lokalisiert in zahlreichen motilen Vesikeln und zeigt bei BiFC-Analysen mit UncA vereinzelt Akkumulationen, gerade in der Nähe der Hyphenspitze (Pfeile). (B) UsaA, N-terminal fusioniert mit GFP, bindet auch an zahlreiche Vesikel, die sich entlang der Hyphe bewegen. BiFC- Untersuchungen mit UncA zeigen eine Interaktion zum einen am Apex, zum anderen aber auch in vielen Punkten, die sich in der Zelle bewegen (Pfeile). (C) ErvA, ein Protein, welches potentiell in ER- Golgi Transportvorgängen involviert ist, zeigt Vesikel bidirektionaler Motilität. BiFC- Analysen bestätigen eine Interaktion mit UncA in beweglichen Vesikeln (Pfeile). (D) AplD, wahrscheinlich ein Protein des AP1-Komplexes, lokalisiert auch in Vesikeln und zeigt einzelne Akkumulationen mittels BiFC mit UncA (Pfeile). Der Maßstab beträgt jeweils 5  $\mu\text{m}$ .

#### 2.1.4. Sekretorische Vesikel und auch RNA werden durch UncA bewegt

Weitere BiFC- Analysen mit unterschiedlichen, in unserem Labor bereits etablierten Vesikelmarkern (Grün, 2011), erweiterten das Repertoire des bisher beschriebenen Transportguts UncAs. Als exemplarische Komponenten der Exo- und Endozytose wurden das v-SNARE Protein SynA (AN8769) und die schwere Kette des Clathrinmoleküls ChcA (*clathrin heavy chain*, AN4463), das in rezeptorabhängigen Endozytosevorgängen mitwirkt, untersucht (Grün, 2011).

Das *A. nidulans* Synaptobrevin- Homolog SynA gehört zu den v-SNARE Proteinen, die eine Schlüsselrolle bei Membranfusionen spielen. SynA, das durch Exozytose in die



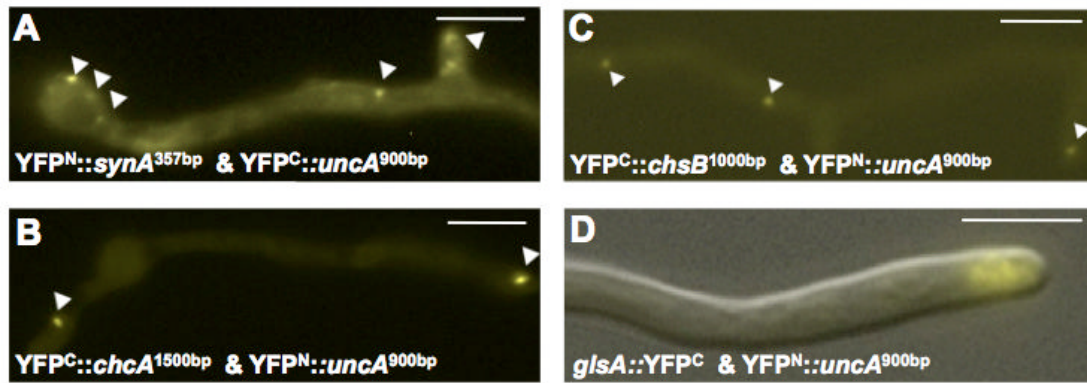
Plasmamembran eingebaut wird, wird von dort durch Endozytose am Subapikalen Ring recycelt und MT- abhängig bei Bedarf von Kinesin-3 an die Hyphenspitze oder posterior in Richtung Zellkörper durch Dynein transportiert (Taheri- Talesh, 2008; Lenz *et al.*, 2006). Demnach sind Endozytose und Exozytose verlinkt.

Bei beiden Kandidaten, ChcA und SynA, konnte eine positive Interaktion mit UncA mittels BiFC nachgewiesen werden. Speziell die Interaktion mit SynA war sehr stark und resultierte in zahlreichen bidirektional laufenden Vesikeln, die oftmals an der Hyphenspitze akkumulierten (**Abb. 24 A, Film 4 a , b**). Die Interaktion mit ChcA beschränkte sich vorrangig auf leichte Proteinansammlungen am Apex (**Abb. 24 B**).

Zusätzlich wurden drei weitere Proteine, die sekretorischen Vesikeln zugeordnet werden können, untersucht (Grün, 2011): Eine  $\beta$ -Glukosidase mit Sekretionssignalpeptid (BglA, AN4102) und zwei Proteine ohne Signalpeptid, das Glukansynthase- Regulatorprotein (GlsA, AN8846) und eine Chitinsynthase (ChsB, AN2523).

Die meisten  $\beta$ -Glukosidasen, wie BglA, sind mit der Zellwand assoziiert oder werden ins Medium sekretiert, daher ist BglA zur Markierung sekretorischer Vesikel ein geeigneter Kandidat (Grün, 2011). Um zu untersuchen, ob UncA auch hier in dem Transport involviert ist, wurden BiFC- Untersuchungen durchgeführt, welche jedoch negativ waren. Da die  $\beta$ -Glukosidase keine Transmembrandomänen enthält, sitzt das Enzym möglicherweise im Innern der Vesikel und eine direkte Interaktion mit UncA ist deswegen nicht möglich.

Aus Untersuchungen der Chitinsynthasen in *N. crassa* ist bekannt, dass Chs-1-GFP enthaltende Mikrovessikel, die Chitosomen, wahrscheinlich durch einen alternativen statt des klassischen sekretorischen Weges entlang der Hyphen bewegt werden (Riquelme *et al.*, 2007). Chs 1, lokalisiert hauptsächlich in Chitosomen und dem Spitzenkörper, aber auch an sich entwickelnden Septen (Sanchez-Leon *et al.*, 2011). Um zu untersuchen, ob auch dessen Transport an die Hyphenspitze von UncA bewerkstelligt wird, wurde erneut eine Interaktion im BiFC- System mit dem Chs-1 Homolog ChsB (AN2523) getestet und an vereinzelt Akkumulationen in distalen Teilen der Hyphe und am Apex beobachtet (**Abb. 24 C**). Das *N. crassa* Glucansynthase- Regulatorprotein GS-1, das hingegen in Form von Makrovessikeln zur Hyphenspitze transportiert wird, wo es in einer ringähnlichen Struktur im Bereich des Spitzenkörpers, dem sogenannten Spitzenring, akkumuliert (Verdín *et al.*, 2009), scheint als ein weiterer interessanter Marker für sekretorische Vesikel in *A. nidulans* zu sein (Grün, 2011). Das *A. nidulans* Homolog GlS A (AN8846) zeigt mit UncA auch eine starke Akkumulation von YFP- Signalen an der Hyphenspitze im BiFC- System (**Abb. 24 D**).



**Abbildung 24: BiFC- Analysen unter *alcA* Expression bestätigen eine Interaktion UncAs mit unterschiedlichen Vesikelmarkern in *A. nidulans*.** (A) BiFC- Analyse von SynA (v-SNARE) mit UncA zeigt motile Vesikel (Pfeile), die sich bidirektional bewegen und am Apex akkumulieren. (B) ChcA (schwere Kette des Clathrins) und UncA interagieren an der Hyphenspitze (Pfeile). (C) Die Chitinsynthase ChsB zeigt punktuelle Akkumulationen von YFP-Signalen zum einen distal, aber auch am Apex (Pfeile). (D) GlcA, ein Glukansynthase-Regulator, zeigt eine starke Interaktion mit UncA an der Hyphenspitze (Pfeil). Der Maßstab beträgt jeweils 5 µm.

Interessanterweise zeigte sich in *U. maydis*, dass der anterograde Langstreckentransport sogenannter Großer Ribonukleoprotein- Komplexe (mRNPs) durch Kin-3 gewährleistet wird (Baumann *et al.*, 2012). Die lokale Translation von RNA an definierten Orten der Zelle und der damit einhergehenden subzellulären Lokalisierung der Proteine ist in zahlreichen zellulären Prozessen, wie beispielsweise dem Aufbau und Aufrechterhalten der Polarität, essentiell. Die zu transportierende mRNA wird durch RNA- Bindeproteine erkannt, welche wiederum zusammen mit assoziierten Faktoren die mRNPs bilden (St Johnston, 2005; Holt & Bullock, 2009). In *U. maydis* wurde eine Kolokalisierung des mRNP- assoziierten RNA-Bindeproteins Rrm4 mit Endosomen beschrieben und gezeigt, dass funktionelle Endosomen für die mRNP Motilität essentiell sind (Baumann *et al.*, 2012). Ob dieser Kotransport von mRNPs gebunden an Endosomen auch in *A. nidulans* durch Kinesin-3 erfolgt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

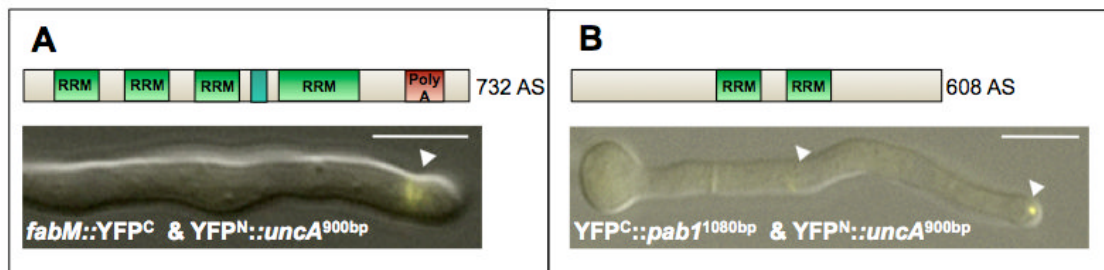
Ein Homolog des *U. maydis* RNA- Bindeproteins Rrm4 im Genom von *A. nidulans* konnte nicht identifiziert werden, jedoch wurden zwei Proteine, die Homologien zu dem **PolyA- Bindeprotein (PABC) Pab1** aufweisen, das mit den PolyA- Schwänzen der meisten eukaryotischen mRNAs assoziiert (Hogan *et al.*, 2008) und in *U. maydis* mit Rrm4-markierten Vesikeln kolokalisiert (Baumann *et al.*, 2012), näher untersucht.

Zum einen wurde FabM (forced expression activation of *brlA*, AN4000) analysiert, ein Pab1 Homolog, das aus 732 Aminosäuren besteht und vier *Rrm*- Domänen (zur einzelsträngigen RNA- Erkennung), eine *coiled coil*- Domäne, sowie ein *PolyA*- Motiv (zum Erkennen von mRNA- PolyA- Schwänzen), enthält (**Abb. 25 A**). Die Rolle FabMs in der Regulation der Translation spezifischer mRNAs, wie beispielsweise des globalen Regulators *BrlA*, wurde bereits 1996 beschrieben (Marhoul & Adams, 1996). Die subzelluläre Lokalisierung der C-terminalen FabM-GFP Fusion unter der Expression des natürlichen

Promotors zeigt sich in einer starken zytoplasmatischen Hintergrundrauschen, aber auch in sich schnell und bidirektional bewegenden Vesikeln, die mit UncA<sup>rigor</sup> teilweise kolokalisieren (N. Grün, persönliche Mitteilung). Daraus kann ein MT- abhängiger Transport der FabM- markierten Vesikel, analog zu *U. maydis*, unter anderem auch an durch UncA<sup>rigor</sup> markierten MT- Subpopulationen, gefolgert werden. BiFC- Untersuchungen mit UncA und FabM resultierten in großen Proteinansammlungen in der Nähe der Hyphenspitze (**Abb. 25 A**). Somit scheint eine analoge mRNA- Translokation durch UncA zur spezifischen Verteilung von mRNA mittels Transport von mRNP assoziierten RNA- Bindeproteinen auch in *A. nidulans* möglich.

Zum anderen wurde in weiteres RNA- Bindeprotein, AN0592, welches, ebenso wie FabM, eine große Homologie zu dem *S. cerevisiae* Homolog Pab1 aufweist, 608 Aminosäuren lang ist und zwei *Rrm*- Motive enthält, in unserer Gruppe untersucht (**Abb. 25 B**). N-terminale GFP- Fusionen unter Expression des *alcA* Promotors zeigen endosomale Strukturen, welche sich antero- und retrograd entlang der Hyphe bewegt haben (N. Grün, persönliche Mitteilung). Eine im Vergleich zu FabM etwas schwächere Interaktion zwischen UncA und Pab1 konnte mit Hilfe von BiFC- Untersuchungen visualisiert werden. Gerade am Apex erschien das Signal am stärksten (**Abb. 25 B**).

Diese Interaktion bestärkt erneut die Annahme, dass UncA somit auch für den Transport von mRNPs verantwortlich ist, welche wahrscheinlich indirekt an die Endosomen gekoppelt kotransportiert werden.



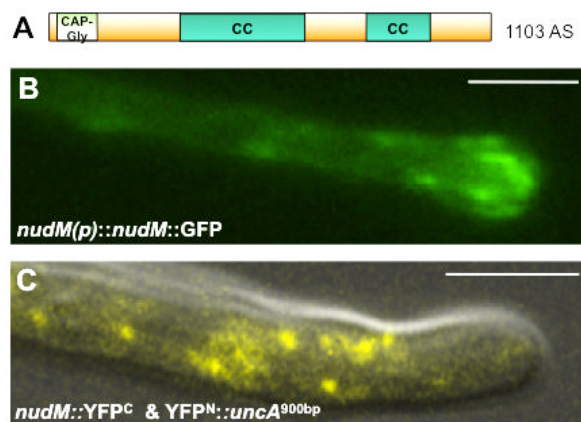
**Abbildung 25: UncA transportiert mRNA.** (A) FabM, ein Pab1- Homolog, enthält vier *Rrm*- Domänen, ein *coiled coil*- Motiv, sowie eine C-terminale PolyA- Bindedomäne. BiFC zwischen UncA und FabM zeigt sich durch starke Ansammlungen an YFP- Signalen am Apex (Pfeil). (B) Domänenstruktur von Pab1, ebenfalls einem *S. cerevisiae* Homolog von Pab1. *Rrm* ist eine Domäne, die bekanntlich das Binden einzelsträngiger RNA vermittelt. Eine Interaktion mit UncA konnte mittels BiFC verifiziert werden. Es sind einzelne Vesikel zu erkennen, die an der Hyphenspitze zum Teil akkumulieren (Pfeil). Der Maßstab beträgt jeweils 5 µm.

### 2.1.5. UncA kann auch über Dynaktin den Transport von Endosomen beeinflussen

Dynaktin, oder auch Dynein Aktivierungskomplex genannt, ist ein Multienzymkomplex mit mehreren Untereinheiten, der unterschiedlichste Funktionen in der Zelle bewerkstelligt. Dynaktin ist unter anderem für die Funktionen des MT- Minus- Ende- gerichteten Motors Dynein essentiell. Transportiert werden durch Dynein zum MT- Minusende hin Organellen,

membranöse Vesikel, sowie frühe Endosomen (Delcroix *et al.*, 2003). Die Interaktion zwischen Dynein und Dynakin erfolgt direkt über die Dynaktinkomponente p150 an der intermediären Kette des Dyneins (Vaughan & Vallee, 1995). P150 steigert zudem auch die Dyneinaktivität (King & Schroer, 2000). Arp1 (*actin-related protein 1*), eine weitere Komponente Dynaktins wiederum wurde als Mediator zwischen Dynein und dessen membranösen Organellen beschrieben (Holleran *et al.*, 1996). Unlängst konnte jedoch in *A. nidulans* gezeigt werden, dass eine Untereinheit Dynaktins, p25, für die spezifische Bindung Dyneins an Endosomen von entscheidender Bedeutung ist (Zhang *et al.*, 2011). Es wurde auch beschrieben, dass eine C-terminale Region des p150 in der Interaktion zwischen Dynein und späten Endosomen verwickelt ist (Johansson *et al.*, 2007), es konnten aber auch direkte Interaktionen zwischen Dynein und späten Endosomen gezeigt werden (Cai *et al.*, 2010). Hierüber wird noch immer kontrovers diskutiert.

Da Dynaktin gerade für die Kopplung von Dynein an frühe Endosomen in *A. nidulans* notwendig ist (Zhang *et al.*, 2011), wurde untersucht, ob auch eine direkte Verbindung zu UncA besteht. Das *A. nidulans* p150 Homolog, NudM (AN6323), enthält zwei *coiled coil* Domänen, sowie ein CAP-Gly- Motif (*cytoskeleton associated proteins*) (**Abb. 26 A**). NudM lokalisiert C-terminal markiert mit GFP in Komet- ähnlichen Strukturen an den MT- Plusenden (**Abb. 26 B**), übereinstimmend mit der Lokalisierung, die in Zhang *et al.*, 2011 beschrieben wurde. Eine Interaktion mit UncA konnte mittels BiFC bestätigt werden. Man sieht sich schnell bewegende Vesikel, sehr ähnlich zu dem NudM-GFP Lokalisierung an den MT- Plusenden (**Abb. 26 C**). Demnach kommen sich Dynaktin und UncA zumindest räumlich so nah, dass eine Interaktion im BiFC- System visualisiert werden kann. Es ist möglich, dass UncA hierbei an die Endosomen gekoppelt ist, die erst zu den MT- Plusenden und dann durch Dynein/ Dynactin retrograd für Recyclingprozesse transportiert werden. Ob tatsächlich eine direkte Interaktion besteht, müsste durch Co-IP oder Y2H- Analysen bestätigt werden.



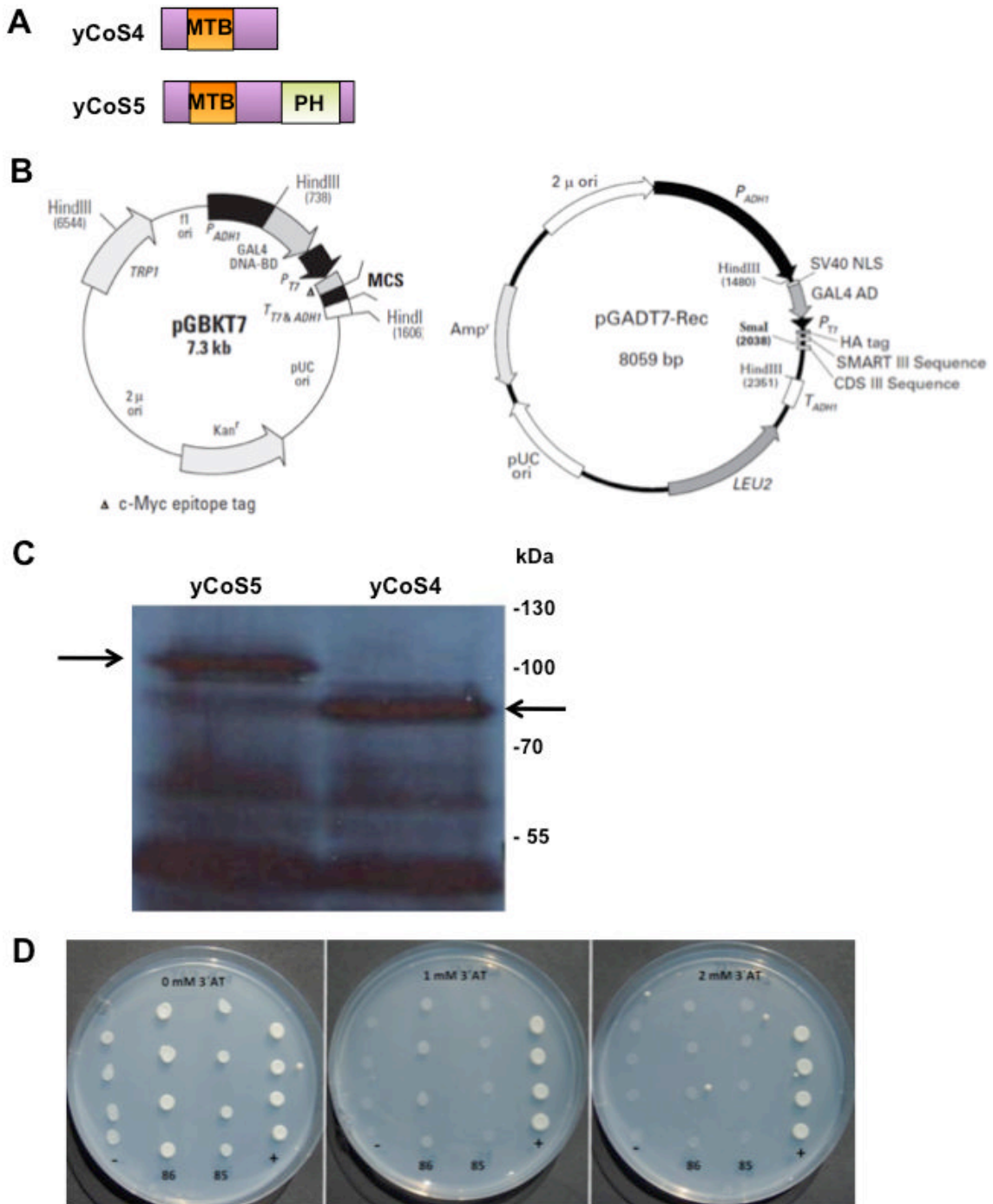
**Abbildung 26: Dynaktin sitzt an MT- Plusenden und interagiert mit UncA. (A)** Domänenstruktur von NudM (p150 Homolog). **(B)** C-terminal mit GFP markiertes NudM ist konzentriert an dem MT- Plusenden zu beobachten, wo sie sich Kometen- ähnlich zur Hyphenspitze bewegen. **(C)** BiFC bestätigt eine direkte Interaktion zwischen UncA und Dynaktin.

## 2.2. Hefe- Zwei- Hybrid- Analyse identifiziert neue Interaktoren von UncA

Nach Bestätigen verschiedener UncA- Interaktoren mit Hilfe gezielter Interaktionsanalysen, sollten mit dem im Folgenden beschriebenen Y2H- Ansatz neue und bisher nicht im Zusammenhang mit Kinesin-3 beschriebene Proteine, die mit UncA in Wechselwirkung stehen, isoliert und identifiziert werden.

Zwei zusätzliche Fragestellungen sollten außerdem mit dieser Methode untersucht werden: Zum einen ob UncA möglicherweise indirekt über MT- assoziierte Proteine an die MT- Subpopulation und/ oder über Adaptorproteine an sein Transportgut/ Vesikel binden kann und zum anderen welche Komponenten es transportiert.

Die Y2H- Analyse wurde mit der potentiellen MTB- Region und der PH- Domäne in der Schwanzregion UncAs als Köder (*bait*) durchgeführt. Hierfür wurden die letzten beiden Kilobasen des offenen Leserahmens von *uncA*, jeweils mit und ohne PH-Domäne, amplifiziert, in den Vektor pGBKT7 ligiert und in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 transformiert (**Abb. 27 A,B**). Die korrekte Expression der beiden Köderproteine wurde mittels Western Blot bestätigt (**Abb. 27 C**). Anschließend wurden Konzentrationstests mit dem Inhibitor 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) durchgeführt, um die basale *his-3* Reporterexpression, welche in beiden Stämmen, yCos4 und yCos5 auf SD- LW- Medium beobachtet wurde, zu unterdrücken. Ab einer finalen Konzentration von 2 mM 3- AT konnte kein Hintergrundwachstum mehr beobachtet werden, folglich wurde permanent mit 3-AT in den Platten gearbeitet (**Abb. 27 D**).

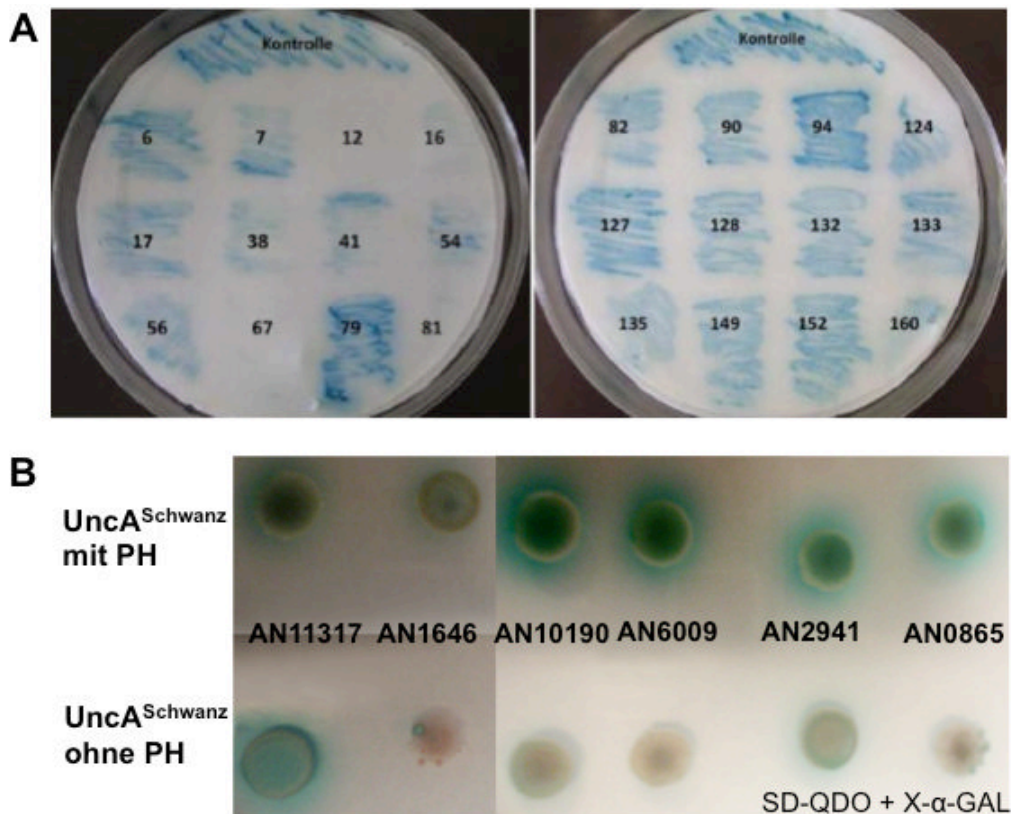


**Abbildung 27: Charakterisierung der beiden Köderstämme (baits) yCoS4 und yCoS5 zur Vorbereitung der Y2H- Analyse. (A)** Schematisierte Darstellung der in den Y2H- Analyse eingesetzten Köderproteine (UncA- Schwanz, inklusive der MTB- Region, mit und ohne PH- Domäne). **(B)** Vektorkarten der verwendeten kommerziellen Plasmide (Clontech) pGBKT7 (enthält Gal4- Aktivierungsdomäne, fusioniert zu den jeweiligen Köderproteinen) und pGADT7 (enthält Gal4- DNA- Bindedomäne und wurde für diesen *Screen* zur N-terminalen Fusion der *A. nidulans* cDNA Genbibliothek verwendet). **(C)** Western Blot Analyse bestätigt korrekte Expression der beiden Köderproteine (Pfeile). YCoS5 exprimiert die letzten 660 Aminosäuren des UncA- Schwanzes (97kDa) und yCoS4 die gleiche Region, jedoch ohne die PH- Domäne (82kDa), jeweils N-terminal fusioniert zur Gal4- Aktivierungsdomäne. Die Detektion erfolgte mit anti- c-myc Antikörpern. **(D)** 3- AT Konzentrationstests. Beide Stämme zeigen eine basale *his-3* Expression resultierend in Hintergrundwachstum auf SD- LW Selektionsplatten. Eine finale Konzentration von 2mM 3-AT wurde in den Selektionsplatten verwendet. Als Positivkontrolle (+) diente RecT-p53 und als Negativkontrolle (-) AH109 mit pGBKT7(0).

Nach erfolgreichem Austesten der beiden Köderstämme wurde der eigentliche *screen* durchgeführt. Hierfür sind die beiden Stämme jeweils mit einer cDNA Sammlung aus *A. nidulans* (*library*), welche in den mit AH109 kompatiblen Stamm Y187 transformiert wurde, gekreuzt worden. Die nach der Kreuzung auf SD- QDO wachsenden Kolonien, also Kandidaten, welche potentiell mit dem Schwanz von UncA interagieren, wurden neu überimpft und einem zusätzlichen  $\beta$ - Galaktosidasetest unterzogen, um so gleich die starken Interaktionen zu bevorzugen (**Abb. 28 A**). Die  $\beta$ -Galaktosidase ist eines der Reportergene, die bei positiver Interaktion qualitativ exprimiert werden und das Substrat X- Gal (5- bromo- 4- chloro- 3- indolyl-  $\beta$ - D- Galaktopyranosid) spalten kann, was zu einer Blaufärbung der Kolonien führt. Bei erneutem Wachstum und positiven  $\beta$ - Galaktosidasetest wurden die Klone auf das individuelle Gen des jeweiligen Klons getestet.

Die Analyse der jeweiligen Gene in den positiven Klonen erfolgte durch Isolierung des Plasmids aus der Hefekolonie und anschließender Elektrotransformation dieser Plasmid-DNA in *E. coli* zur Vervielfältigung, da die DNA- Konzentrationen aus der Hefeisolierung quantitativ nicht ausreichend für die folgenden Analysen waren. Die aus den Klonen isolierte Plasmid- DNA wurde dann einzeln mittels pGADT7 spezifischen Primern kommerziell sequenziert (MWG, Ebersberg). Diese Sequenzen wurden dann unter Berücksichtigung des Leserasters in eine Aminosäurekette translatiert und diese anschließend in der *Aspergillus*-Datenbank ([www.aspergillusgenome.org](http://www.aspergillusgenome.org)) mit allen annotierten Proteinen verglichen. Zu beachten ist hierbei, dass bei der Erstellung der Genbibliothek auch Klone entstehen können, die die DNA- Sequenz nicht im korrekten Leseraster exprimieren, deshalb werden mit dieser Methode auch oft falsch- positive Klone selektiert.

Nach Abzug weiterer falschpositiver Proteine, die funktionell meist dem Metabolismus (19) und Ribosomeinheiten (3) zuzuordnen waren, wurden von den ursprünglich 60 getesteten Kolonien 15 verschiedene Proteine identifiziert, die interessant erschienen. Diese wurden dann auf SD- QDO mit X-  $\alpha$ - GAL getropft um so die Interaktionsstärke quantitativ zu visualisieren. Alle der getesteten Klone haben mit dem Schwanzteil UncAs, der die PH-Domäne enthielt, deutlich stärker interagiert (**Abb. 28 B**). Von allen getesteten Kolonien wurden letztendlich acht Proteine näher analysiert (**Tab. 3**).



**Abbildung 28: Visualisierung der Interaktionsstärke der in der UncA-Analyse identifizierten Kandidaten. (A)** Exemplarischer Auszug des  $\beta$ -Galaktosidasetests, der mit allen nach dem Screen erneut angewachsenen Kolonien zur Selektion der stärkeren Interaktionen durchgeführt wurde. **(B)** X- $\alpha$ -Gal Analyse zeigt quantitativ, dass die jeweiligen Proteine mit dem Konstrukt, welches die PH-Domäne enthielt (oben), deutlich stärker interagieren als wenn diese nicht mitexprimiert wurde (unten).

**Tabelle 3: Übersicht der im Hefe-Zwei-Hybridsystem isolierten Klone.**

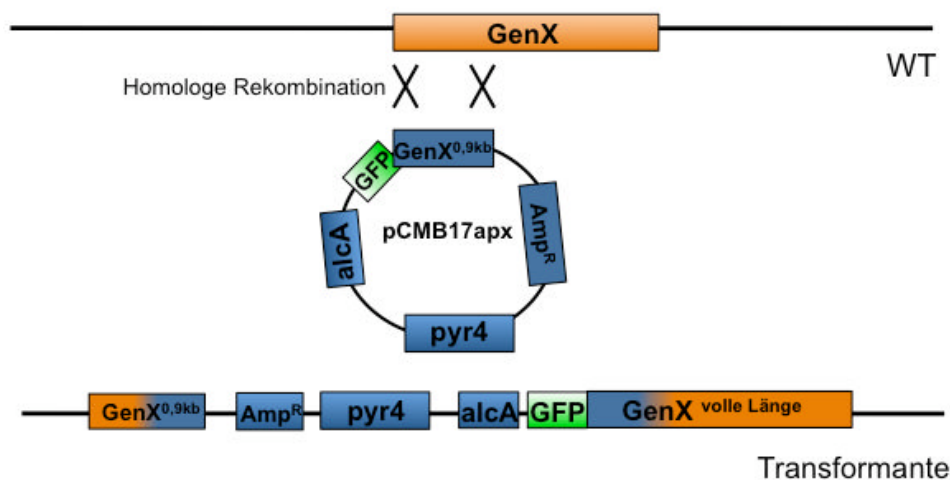
Nr.	Accession	Beschreibung	Mögliche Domänen und Funktionen
32	AN8461	uncharakterisiertes Protein	unbekannte Funktion
34	AN2941	uncharakterisiertes Protein	unbekannte Funktion
57	AN1646	uncharakterisiertes Protein	Tetratricopeptid Wiederholung ( <i>TPR</i> - Motiv) (Proteininteraktionen)
76	AN0865	uncharakterisiertes Protein	Methyltransferase der N2227 Familie ( <i>S. pombe</i> Ortholog SPBC1778.07)
91	AN11317	uncharakterisiertes Protein	Transmembrandomäne, C <sub>6</sub> Transkriptionsfaktor ( <i>A. flavus</i> ), Phosphatidylinositol 3- und 4- Kinase Familie ( <i>T. thermophila</i> )
125	AN10190	uncharakterisiertes Protein	<i>Smc</i> - Domäne (Chromosomensegregation ATPase und <i>Atg14</i> - Domäne (Autophagie- verwandte Untereinheit 1)
151	AN6009	uncharakterisiertes Protein	<i>WD40</i> Domäne (Proteinbindung)
534	AN8179	uncharakterisiertes Protein	Hitzeschockbindeprotein (molekulares Chaperon)



Die Charakterisierung der isolierten Proteine sah folgendermaßen aus: Zur Lokalisierung in *A. nidulans* wurden jeweils ungefähr 900 bp des offenen Leserasters oder im Falle von kürzeren Genen die Hälfte des annotierten offenen Leserasters, durch PCR amplifiziert und über *Ascl* und *Pacl* Schnittstellen in das Plasmid pCMB17apx (*alcA(p)::GFP::genX; pyr4*) ligiert, in *A. nidulans* transformiert und dann fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Durch die Transformation der verkürzten Konstrukte sollte es nur bei homologer Rekombination in den Locus zu den korrekten GFP-Signalen kommen. Die Expression der N-terminal mit GFP markierten Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des *alcA* Promotors. Dieser wird mit Threonin induziert, durch Glukose reprimiert und mit Glycerol dereprimiert.

Durch homologe Rekombination in den natürlichen Locus des jeweiligen Gens kommt es zur Expression eines verkürzten und potentiell infunktionellen Proteins unter dem natürlichen Promotor, wohingegen die GFP- Fusion mit der vollen Länge des Proteins exprimiert wird, die wiederum mit Hilfe des *alcA* Promotors reguliert werden kann (**Abb. 29**). Hierdurch wird ein einfaches und schnelles System verwendet, neue Gene erstmals zu lokalisieren und gleichzeitig unter reprimierenden Bedingungen (Glukose) schon untersuchen zu können, ob die Deletion bzw. ein stark reduziertes Expressionslevel einen Phänotyp verursacht. Für Lokalisierungsstudien wurde ein moderates Expressionslevel durch 2% Glycerin im Mikroskopiemedium gewährleistet. Für Proteinaufreinigungen konnte die Expression mit Hilfe von Threonin stark induziert werden.

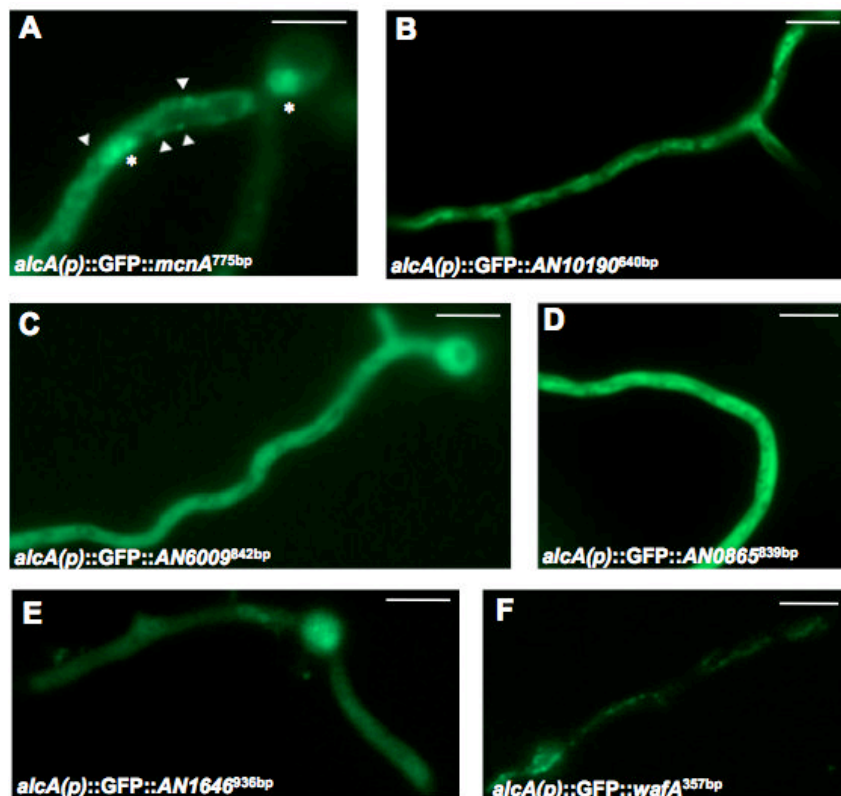
Die Transformanten dieser Methode wurden jeweils erneut auf Rasterplatten mit Selektionsmedium überimpft und anschließend mikroskopisch untersucht. Eine homologe Integrationsrate von bis zu 80% wurde im Durchschnitt erreicht. Bei intensiveren Analysen sollten dann PCRs durchgeführt werden, um die homologe Integration der Konstrukte in den Locus zweifelsfrei zu verifizieren.



**Abbildung 29:** Schematische Darstellung der homologen Integration des Plasmids pCMB17apx in den Locus des N-terminal mit GFP zu markierenden Proteins X. Details siehe Text.

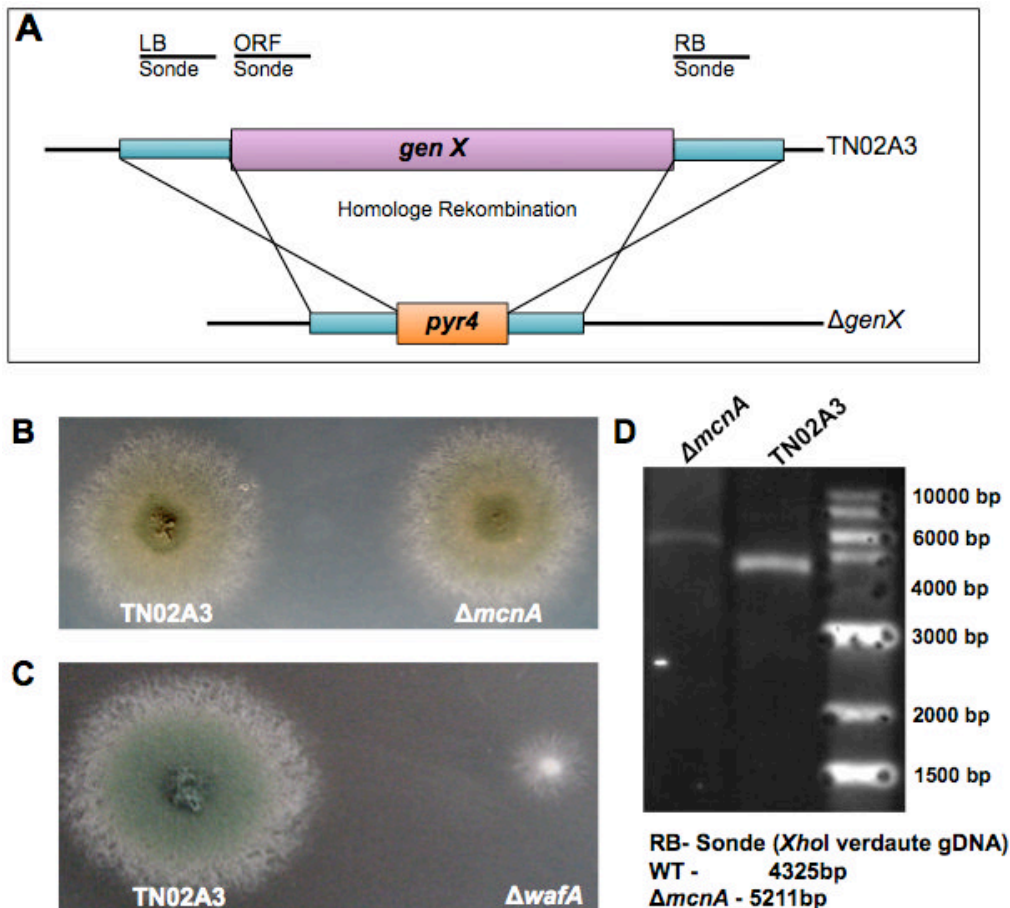
Während die meisten Proteine eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma zeigten, lokalisierte das unbekannte Protein AN2941 in Form von Vesikeln, die sich sowohl im Zytoplasma als auch im Kern bewegten. (**Abb. 30 A**, Pfeile, **Film 5 a, b**). Das bisher unbeschriebene Protein AN2941 wurde daraufhin als McnA (*movement in cytoplasm and nucleus*) bezeichnet. Da sich McnA in Form von Vesikeln bewegt, stellt es einen guten Kandidaten für eine mögliche UncA- Interaktion dar. Bioinformatische Analysen des 445 Aminosäuren langen Kandidaten ergaben weder Treffer in Sequenzvergleichen mit anderen filamentösen Pilze oder höherem Eukaryoten, noch konnten bekannte Domänen identifiziert werden, die einen Hinweis auf die Funktion von McnA geben könnten.

Ein weiterer untersuchter Kandidat, AN11317, besteht aus lediglich 76 Aminosäuren und enthält eine Transmembrandomäne. Sequenzabgleiche mit AN11317 ergaben keine direkten Treffer, aber ein Großteil ist sehr homolog zu einem Teil eines putativen C<sub>6</sub> Transkriptionsfaktor aus *A. flavus*, der selbst 685 As lang ist. Das Protein lokalisiert mit GFP fusioniert jedoch nicht im Kern, sondern schwach entlang filamentöser Struktur im Zytoplasma (**Abb. 30 F**), was auf eine andere Funktion als Genregulation hindeutet. Das Protein wurde daraufhin als WafA (*weak association to filaments*) bezeichnet.



**Abbildung 30: Lokalisierungsstudien der in der Y2H- Analyse identifizierten Kandidaten in *A. nidulans*.** Die N-terminal mit GFP fusionierten Proteine unbekannter Funktion stehen jeweils unter der Kontrolle des mit Glycerin dereprimierten Promotors *alcA*. (**A**) GFP-McnA zeigt kleine sich sehr schnell bewegende Vesikel im Zytoplasma (Pfeile), aber auch in den Kernen selbst (Sterne). (**B**) GFP-AN10190, sowie (**C**) GFP-AN6009, (**D**) GFP-AN0865 und (**E**) GFP-AN1646 lokalisieren mehr oder weniger homogen verteilt im Zytoplasma. (**F**) das Fusionsprotein GFP-WafA zeigt ein generell sehr schwaches Signal, welches sich filamentartig in der Hyphe erstreckt. Der Maßstab beträgt jeweils 5 µm.

Jedoch konnte leider keine *in vivo* Interaktion der beschriebenen Kandidaten durch BiFC mit UncA- Schwanz in *A. nidulans* bestätigt werden. Von den beiden interessantesten Kandidaten, McnA und WafA, wurden Deletionen mit Hilfe von den bei der FGSC erhältlichen *pyr4* Deletionskassetten erstellt (**Abb. 31 A**).  $\Delta mcnA$  zeigt keinen offensichtlichen Phänotyp, der durch die Deletion hervorgerufen wurde, wohingegen die Deletion von *wafA* zu sehr kompaktem Wachstum und verringerter Sporulation führt (**Abb. 31 B,C**). Die Deletionen wurden mittels Southern Blots bestätigt (**Abb. 31 D**). Eine anschließende Lokalisierung von GFP-UncA<sup>rigor</sup> in den beiden Deletionsstämmen zeigte keine Veränderung der Spezifität für eine MT- Subpopulation. Demnach wird die Präferenz von UncA für die MT- Subpopulation sehr wahrscheinlich nicht durch einzelne Komponenten des Transportguts bestimmt. Auch ist fraglich, inwieweit die im Y2H- System identifizierten Kandidaten tatsächlich Interaktoren UncAs darstellen, wenn eine Interaktion nicht durch BiFC bestätigt werden konnte.

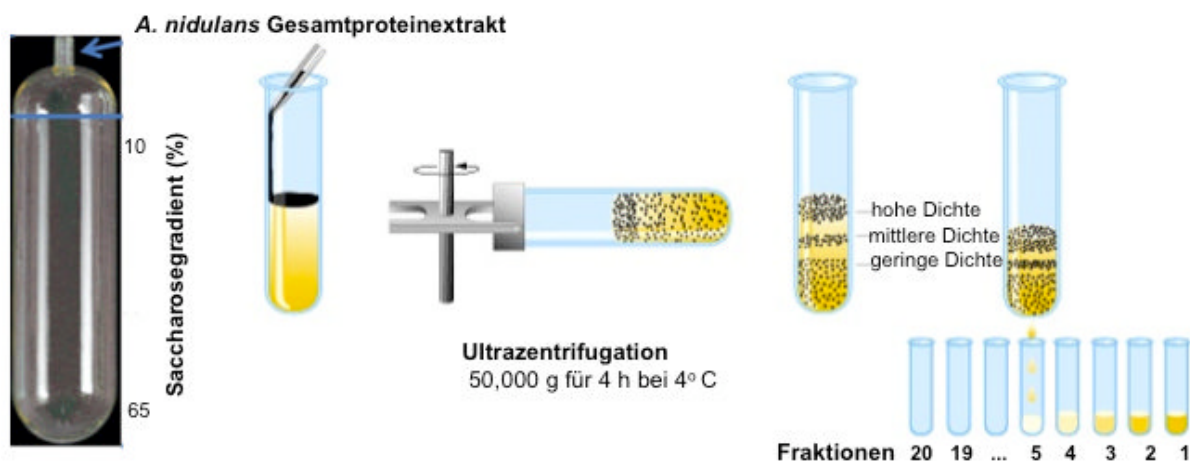


**Abbildung 31: Schema zur Generierung der beiden *A. nidulans* Deletionsmutanten *mcnA* (AN2941) und *wafA* (AN11317) und deren Phänotyp auf Kolonieebene. (A) Schematische Darstellung der homologen Rekombination der *pyr4*- Deletionskassette (von FGSC erhalten) in den Genort des zu deletierenden Gens. (B) Wachstumsvergleich der *mcnA* Deletion zum Wildtyp. Es ist kein offensichtlicher Phänotyp zu beobachten. (C) Wachstumsvergleich der *wafA* Deletion zeigt deutlich verlangsamtes Wachstum der Mutante als der Wildtyp. (D) Von allen in dieser Arbeit beschriebenen Deletionen wurden Southern Blots durchgeführt. Hier exemplarisch von  $\Delta mcnA$  dargestellt. Die gDNA wurde mit *XhoI* verdaut und mit einer RB-Sonde hybridisiert.**

### 2.3. Versuch der Isolierung von UncA- markierten Vesikeln mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Da es gute Hinweise dafür gibt, dass Kinesin-3 Endosomen transportiert, der Inhalt dieser jedoch größtenteils unbekannt ist, war es ein Ziel dieser Arbeit, zum einen weitere Interaktoren zu identifizieren, die das Binden des Transportguts an das Motorprotein vermitteln, was mit dem Y2H- Ansatz versucht wurde. Zum anderen aber natürlich auch die Komposition der Vesikel selbst, die von UncA transportiert werden, denn bisher wurde diesbezüglich nichts beschrieben. Daher wurde eine Anreicherung der Endosomen/ Vesikel, die UncA zum Transport bindet, durch **Saccharose- Dichtegradientenzentrifugation** (SDGZ) und Fraktionierung im Rahmen der DFG *Research Unit 1334* in CICESE, Ensenada, Mexiko, versucht. In dieser Kolaboration habe ich in meinem 4 monatigen Aufenthalt in dem Labor von Dr. M. Riquelme-Pérez das SDGZ- Protokoll für *A. nidulans* etabliert.

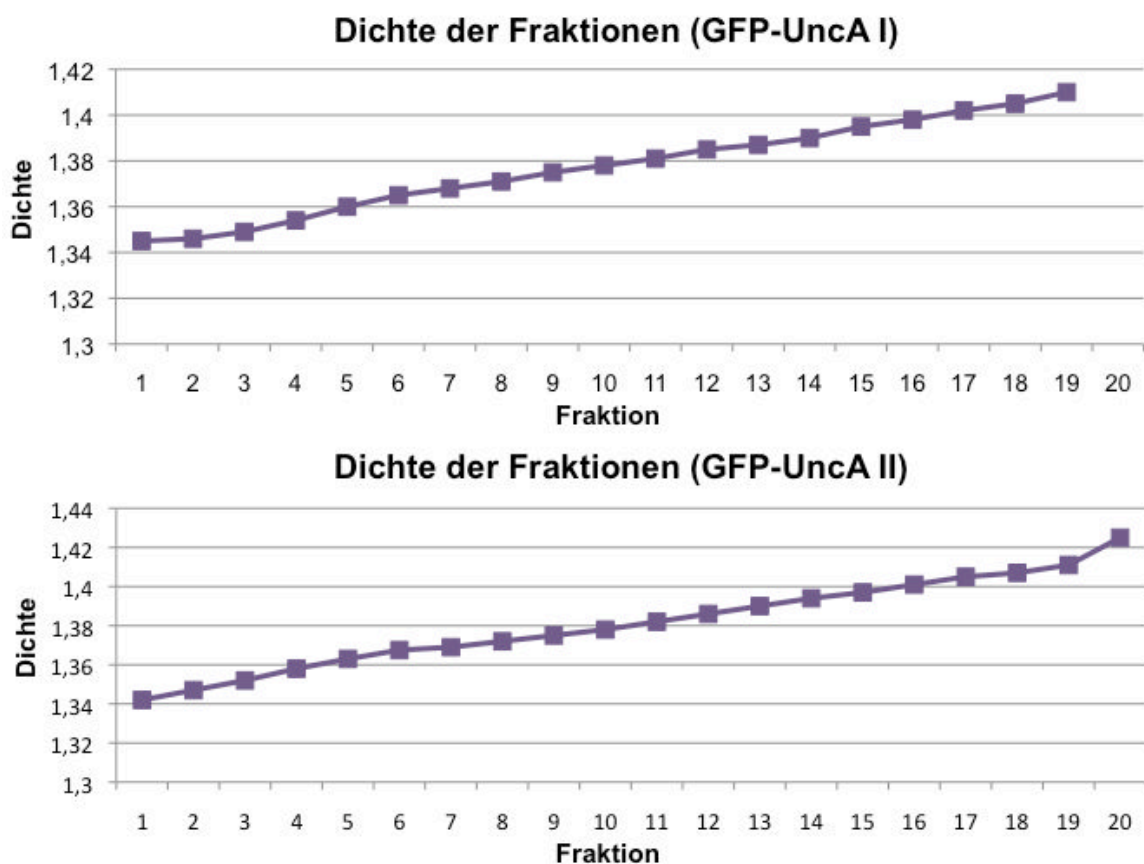
Hierfür wurde ein Gesamtproteinextrakt durch Zellaufschluss einer 24 Stunden lang gewachsenen, mit Threonin induzierten Kultur des Stammes SNZ2, welcher GFP-UncA durch den *alcA* Promotor überexprimieren kann, isoliert und auf einen Saccharosegradienten (10- 65%) aufgetragen. Dies wurde dann vier Stunden lang gekühlt bei 50.000 rpm in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert um so den *A. nidulans* Gesamtproteinextrakt der Dichte nach aufzutrennen und anschließend zu fraktionieren (**Abb. 32**).



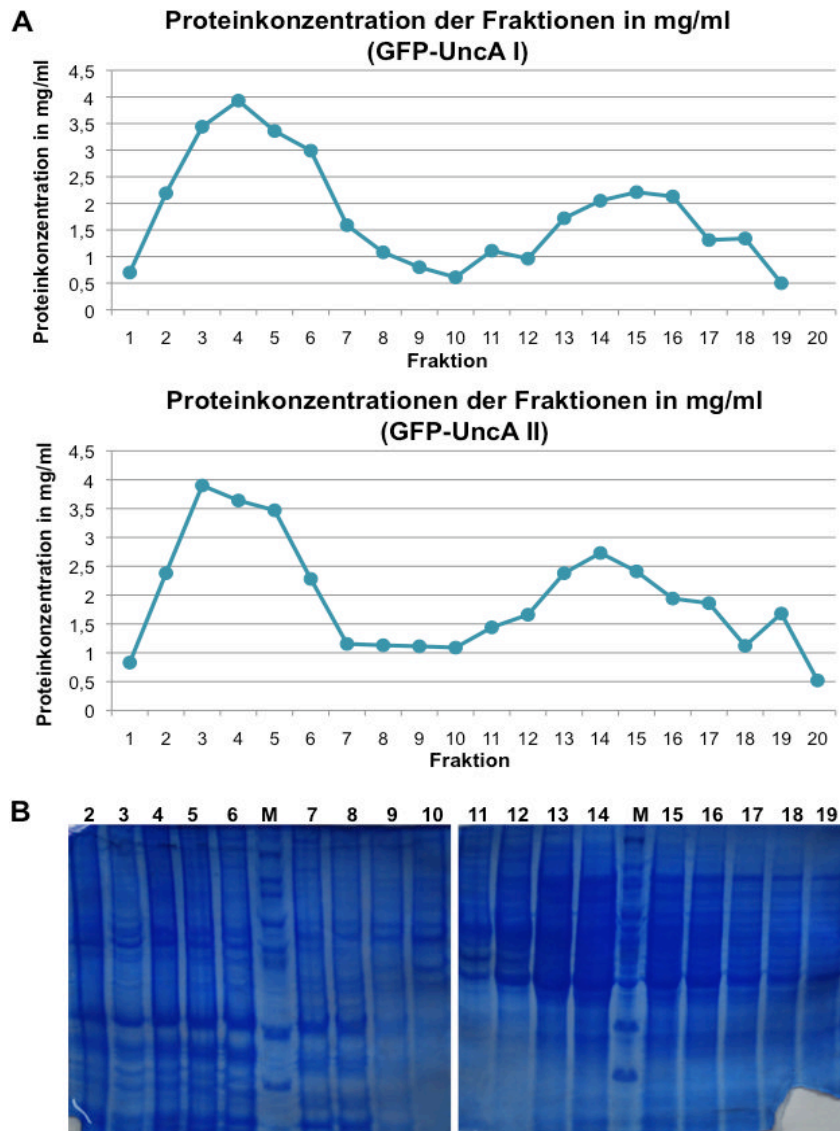
**Abbildung 32: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte einer SDGZ und anschließender Fraktionierung.** Modifiziert nach <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr10-23.html>.

Nach diesem Prozedere wurden die Dichten der einzelnen Fraktionen mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt, um zu bestätigen, dass der Saccharosegradient während der Ultrazentrifugation aufrechterhalten wurde oder durch den Prozess der Fraktionierung nicht zerstört wurde (**Abb. 33**). In allen durchgeführten Analysen wurde der Gradient nicht beeinträchtigt.

Um eine Quantifizierung der GFP-UncA Konzentration in den einzelnen Fraktionen mittels Western Blots durchführen zu können, ist es notwendig, die Proteinkonzentrationen der Fraktionen zu messen und für die folgenden Analysen anzugleichen, um vergleichbare Ergebnisse zu produzieren. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mittels Bradford Analysen, wobei photometrisch das Komplexbilden des Farbstoffes Coomassie- Brilliant- Blau G-250 mit den Proteinen erfasst wird. Als Referenz wurde eine Standardkurve mit BSA herangezogen. Die Fraktionen zeigten zwar untereinander deutlich unterschiedliche Konzentrationen (von 0,6 bis 1,9 mg/ml), jedoch war das Muster der Verteilung der Proteinkonzentrationen selbst in den verschiedenen Durchführungen reproduzierbar (**Abb. 34 A**).



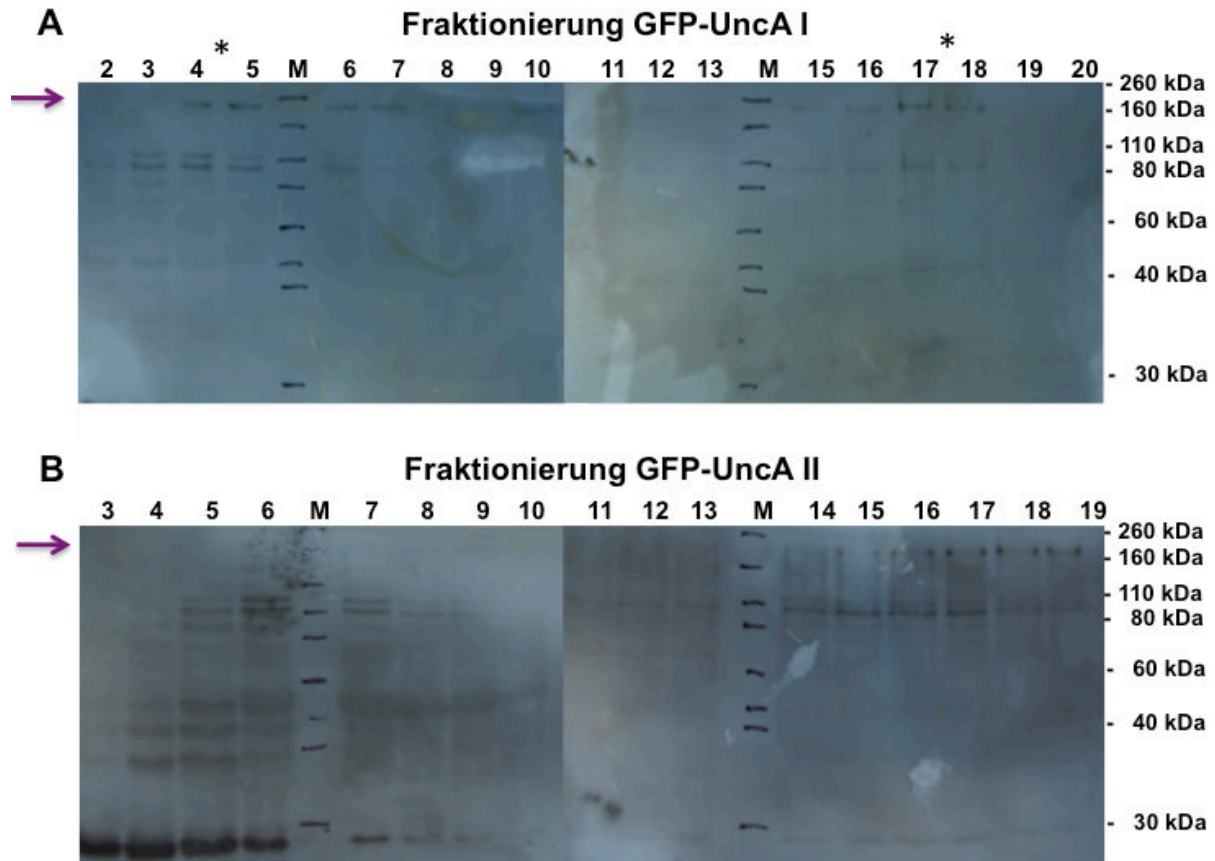
**Abbildung 33: Dichtemessung der einzelnen Fraktionen zweier unabhängiger Durchführungen (GFP-UncA I und II) mit Hilfe eines Refraktometers.** Bei beiden Ansätzen ist zu sehen, dass der Gradient auch nach der Ultrazentrifugation und Fraktionierung erhalten blieb.



**Abbildung 34: Quantifizierung der Proteinkonzentrationen der Fraktionierung zweier unabhängiger Ansätze (GFP-UncA I und II) und exemplarische SDS- PAGE mit angeglichenen Proteinmengen der Fraktionen. (A)** Quantifizierung der Proteinkonzentration der Fraktionen mittels Bradford Analyse in mg/ml. **(B)** Coomassie Färbung der SDS- PAGE (UncA I), die Taschen wurden mit jeweils 25  $\mu$ g Protein der einzelnen Fraktionen beladen. Es sind unterschiedliche Banden in den Fraktionen mit hoher und niedriger Dichte zu erkennen.

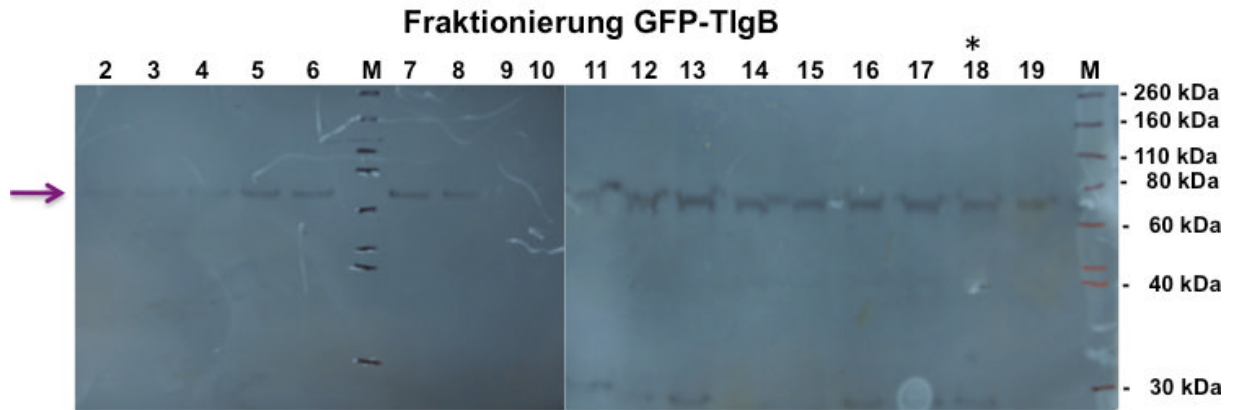
Von jeder Fraktion wurden jeweils 25  $\mu$ g Protein in die Taschen des 7 %igen SDS- Gels geladen und mittels einer SDS- PAGE der Größe nach aufgetrennt. Abbildung 8B zeigt ein solches Gel, was anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (**Abb. 34 B**). Man erkennt, dass generell in Fraktionen niedriger Dichte (1- 8) andere Proteinmuster zu sehen sind, als in denen höherer Dichte (13- 19).

Nach der SDS- PAGE wurde dann ein Western Blot mit anti- GFP Antikörpern durchgeführt. Zu beobachten ist, dass GFP-UncA Signale zwar in allen Fraktionen zu erkennen sind, jedoch eine leichte Erhöhung in den Fraktionen 5-7 und 17-18 wahrzunehmen ist (**Abb. 35 A**, Sterne).



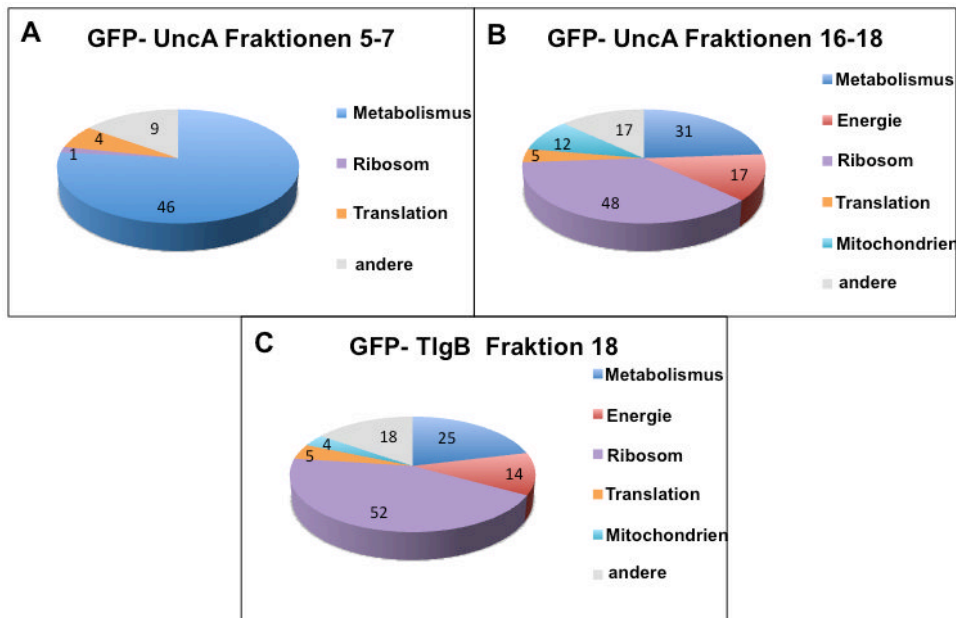
**Abbildung 35: Western Blot zur quantitativen Analyse der GFP-UncA Konzentration (206 kDa, Pfeile) in zwei unabhängigen Fraktionierungsanalysen. (A)** Fraktionierung GFP-UncA I zeigt zwei Maxima in den Fraktionen 5- 7 und 17- 18, jedoch ist auch in den übrigen Fraktionen ein basales Level an detektiertem UncA zu sehen. **(B)** Fraktionierung GFP-UncA II zeigt kein Maximum bei niedrigeren Dichten, was aber wahrscheinlich auf einen schlecht entwickelten Blot zurückzuführen ist. Eine Spitze des UncA- Levels ist auch hier bei den Fraktionen 17- 19 zu sehen. Die Blot- Detektion erfolgte mit anti-GFP Primärantikörpern (1:1000) und anti- Maus HRP- Konjugat gekoppelten Sekundärantikörpern (1:3000). Die Belichtung der Membranen war für alle Fraktionen des jeweiligen Ansatzes identisch. Es wurden jeweils ca. 25 µg Protein geladen.

Von den Fraktionen, die das stärkste UncA- Signal aufwiesen (**Abb. 35 A**, Sterne), wurden die Proteine anschließend mittels LC-ESI-MS/MS-Analysen identifiziert. Als vergleichende Kontrolle, um Endosomen in den Fraktionen sicher zu ermitteln, wurde eine Fraktionierung mit dem Endosomenmarker TlgB durchgeführt (Zekert & Fischer, 2009). Hierfür wurde mit dem Stamm SNZ68 (*alcA::GFP::tlgB*) analog zu den GFP-UncA Fraktionierungen verfahren und dann im Western Blot mit anti- GFP Antikörpern detektiert (**Abb. 36**). Auch hier war zu sehen, dass die Endosomen, markiert durch GFP-TlgB, nicht in bestimmten Fraktionen akkumulieren, sondern prinzipiell in allen Fraktionen höherer Dichte präsent sind. Demnach ist eine gezielte Anreicherung von Endosomen mit dieser Methode durch die Heterogenität der Vesikel kaum möglich.



**Abbildung 36: Western Blot zur Quantifizierung der Fraktionierung des GFP-TlgB exprimierenden Stammes SNZ68 (69,5 kDa, Pfeil).** Auch hier ist ein kleines Maximum in niedrigen (5-8) und nahezu in allen Fraktionen höherer Dichte (12-19) zu beobachten. Fraktion 18 (Stern) wurde als Kontrolle mittels LC-ESI-MS/MS näher untersucht. Die Blot-Detektion erfolgte mit anti-GFP Primärantikörpern (1:1000) und anti-Maus HRP-Konjugat gekoppelten Sekundärantikörpern (1:3000) und mit identischer Belichtungszeit. Es wurden jeweils 28,5 µg Protein geladen.

Wie oben schon erwähnt, wurden zum einen die Fraktionen 5-7 und 16-18 der Fraktionierung GFP-UncA I, zum andern als Kontrolle Fraktion 18 der GFP-TlgB Fraktionierung (**Abb. 36**, Stern) zur kommerziellen LC-ESI-MS/MS-Analysen gesendet (Toplab, Martinsried) um einzelne Proteine identifizieren zu können. Abbildung 30 gibt einen schematischen Überblick über die Einteilung der ermittelten Proteine in funktionelle Bereiche (**Abb. 37**).



**Abbildung 37: Schematische Zusammenfassung der mittels LC-ESI-MS/MS-Analysen identifizierten Proteine in funktionelle Gruppen.** (A) Fraktionen niedriger Dichte der GFP-UncA I Analyse kofraktioniert vorrangig mit Proteinen, welche in metabolische Prozesse involviert sind. (B) GFP-UncA kofraktioniert in höheren Dichten hauptsächlich mit ribosomalen Komponenten und Metabolismus- und Energie korrespondierenden Proteinen. (C) Die GFP-TlgB Fraktion 18 des Endosomenmarkers zeigt eine sehr ähnliche Verteilung wie in den dichtereichen Fraktionen UncAs.



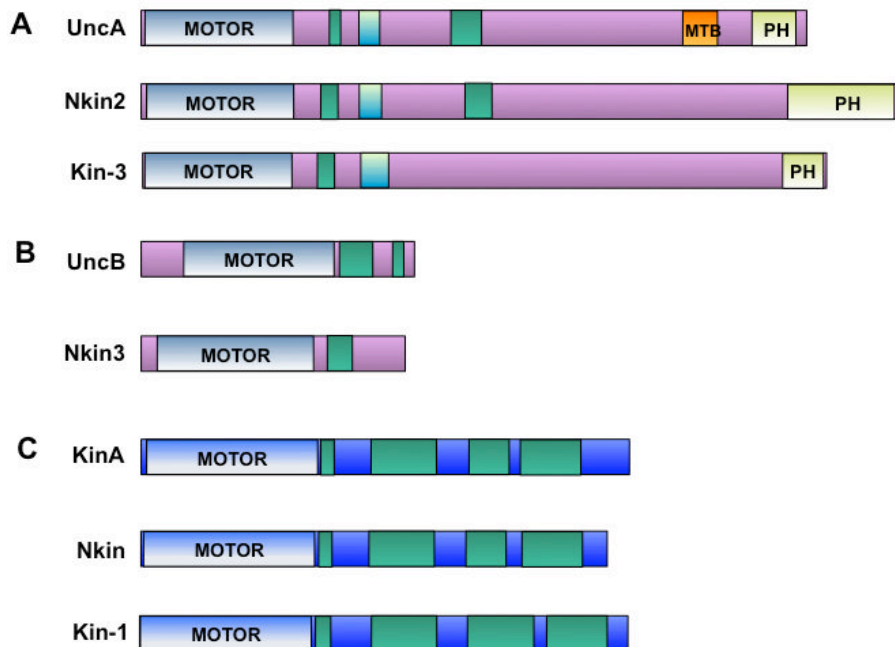
Die UncA Fraktionen 5- 7 (mit geringer Dichte) bestanden fast ausschließlich aus metabolischen Enzymen und eine Korrelation zu einer UncA- Assoziation konnte hier in keinem Fall erkannt werden (**Abb. 37 A**). Divergent zu den Isolaten niedriger Dichte, stellte sich jedoch die Zusammensetzung der Kandidaten, welche sowohl in der TlgB- als auch der UncA- Fraktionierung aus den höheren Dichtefraktionen isoliert wurden, als sehr ähnlich heraus (**Abb. 37 B, C**). Hier konnte jeweils ein Großteil der Kandidaten Ribosomalen Komponenten zugeordnet werden, wovon jedoch kein Kandidat, beziehungsweise dessen Ortholog in anderen Organismen, tatsächlich prognostiziert in Vesikeln lokalisiert oder an Transportvorgängen involviert ist und insofern nicht für eine konkrete Assoziation für UncA in Frage käme. Weiterhin wurden auch einige Proteine dem Metabolismus und Energiehaushalt zugeordnet. Aber auch hier gilt, wie auch für die restlichen identifizierten kofraktionierten Proteine, dass es keine offensichtliche Verbindung zu einem UncA korrelierten Transport gäbe. Konkludierend, dass diese Methode nicht als adäquat erachtet werden kann, Endosomen anzureichern oder Kinesin- assoziierte Vesikel zu isolieren. Die Tatsache, dass die Endosomen in unterschiedlichen Dichten zu finden sind, könnte bedeuten, dass man durch SDGZ keine Anreicherung, wie es vorher für Chitosomen gezeigt wurde (Verdìn *et al.*, 2009), erreichen kann.

## Kapitel III

### Charakterisierung von *N. crassa* Nkin2

Ob die MT- Modifikation eine allgemeine Charakteristik auch in anderen Pilzen darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich das *N. crassa* Kinesin-3 Homolog von UncA, Nkin2, näher untersucht. In früheren Jahren wurde berichtet, dass NKin2 in die mitochondriale Verteilung involviert ist (Fuchs & Westermann, 2005). Demgegenüber gewährleisten Kinesin-3 Motoren in *A. nidulans* und *U. maydis* den endosomalen Transport (Zekert & Fischer, 2009; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Außerdem ist auch schon lange bekannt, dass die Kinesin-3 Motoren in höheren Eukaryoten den Transport von synaptischen Vesikeln gewährleisten (Hall & Hedgecock, 1991). Ob der Transport der Mitochondrien durch Nkin2 auch entlang einer MT- Subpopulation erfolgt, ist nicht bekannt. Fuchs und Westermann zeigten biochemisch mit Zellfraktionierungen, dass Nkin2 mit Mitochondrien assoziiert ist und die *nkin2* Deletion Mitochondrienmotilitätsdefekte aufweist. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Nkin2 neben dem mitochondrialen Transport auch abin der Bewegung von Endosomen beteiligt ist, wie es auch für *A. nidulans* und *U. maydis* beschrieben wurde.

Weiterhin wurden auch zwei weitere Kinesine, Nkin und Nkin3, untersucht. Abbildung 38 zeigt schematisch die hohe Homologie der Domänenstruktur der jeweiligen Kinesine in *A. nidulans*, *N. crassa* und *U. maydis* (**Abb. 38**).



**Abbildung 38: Schematische Darstellung der Proteindomänen der Kinesin 1 und 3 Orthologe in *A. nidulans*, *N. crassa* und *U. maydis*.** (A,B) Kinesin-3 Orthologe aus *A. nidulans* (UncA, UncB), *N. crassa* (Nkin2 - 60% Homologie zu UncA, Nkin3 - 56% Homologie zu UncB) und *U. maydis* (Kin-3 - 48% Homologie zu UncA). Ein UncB Homolog in *U. maydis* konnte nicht identifiziert werden. (C) Kinesin-1 Orthologe aus *A. nidulans* (KinA), *N. crassa* (Nkin) und *U. maydis* (Kin-1).

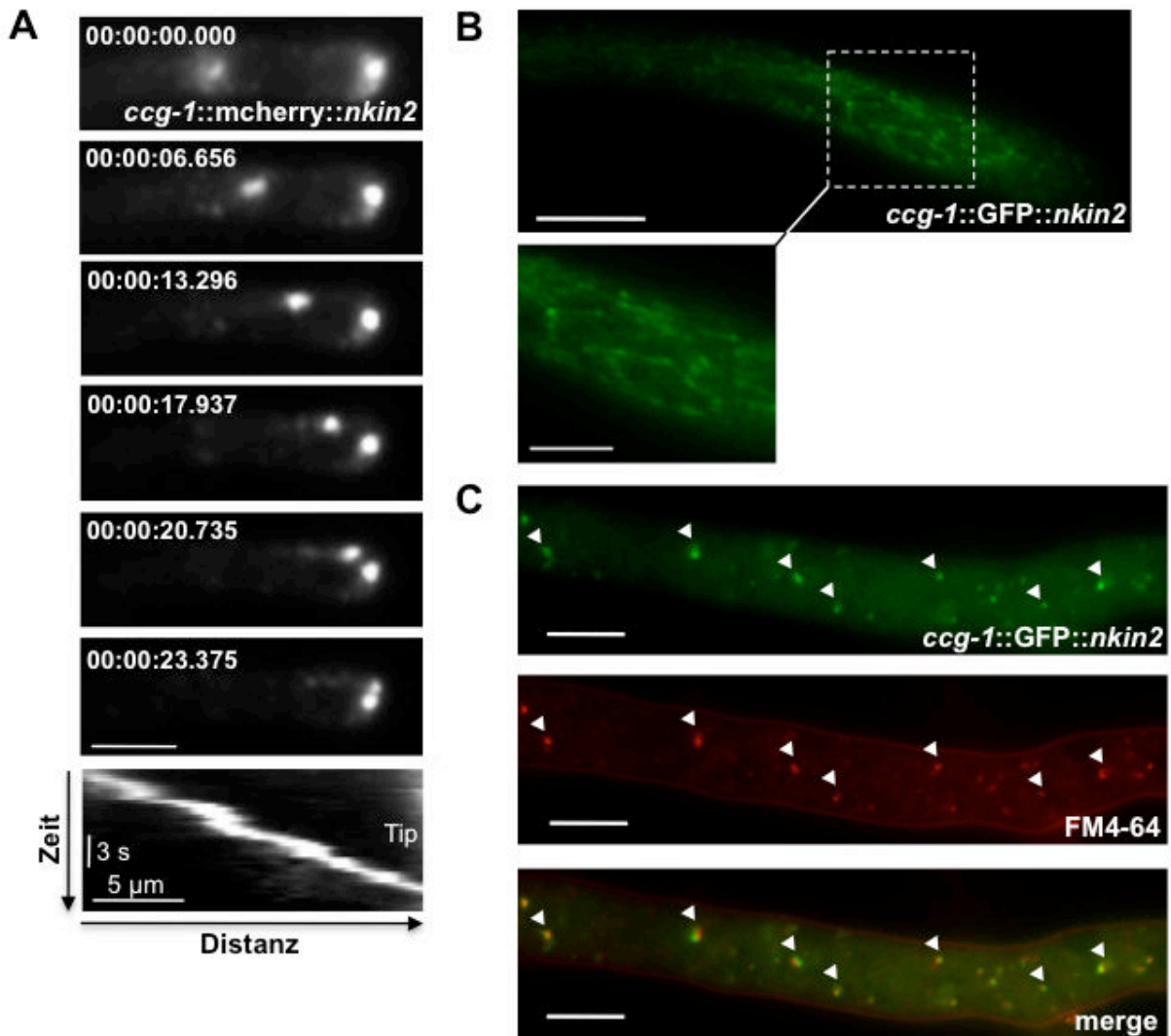
### 3.1. Nkin2 lokalisiert in Vesikeln von *N. crassa*

Kinesin-3, Nkin2 (NCU06733), wurde analog zu den *A. nidulans* Lokalisierungen N-terminal mit GFP und auch mCherry mit Hilfe der beiden Vektoren *ccg-1(p)::GFP* und *pJV16* markiert und mittels homologer Rekombination gezielt in den *his-3* Lokus des Stammes FGSC#9717 transformiert. Der Stamm FGSC#9717 trägt neben der Histidinauxotrophie (*his-3*), zur Erhöhung der homologen Rekombinationsrate auch die *mus-51* Deletion ( $\Delta ku70$ ). Die Expression der Fusionsproteine wurde hier jeweils unter dem lichtinduzierbaren *ccg-1* Promotor reguliert. Positive Transformanten wurden mikroskopisch kontrolliert und selektiert.

Bei Untersuchungen der subzellulären Lokalisierung von Proteinen in *N. crassa* ist zu beachten, dass die zahlreichen, bereits in der Einleitung erwähnten, verschiedenen Hyphenarten zum einen unterschiedlichen Entwicklungsstadien entsprechen und zum anderen auch unterschiedliche Funktionen in der Koloniestruktur einnehmen. Da deswegen eine Generalisierung als "Hyph" nicht adäquat erscheint, wurde im Folgenden zwischen den schnell wachsenden Primärhyphen an der Peripherie (*leading hyphae*), Verzweigungen dieser (*branches*) und jungen Keimlingen (*germlings*) differenziert.

Mcherry-Nkin2 lokalisiert, sehr ähnlich zu UncA in *A. nidulans*, in Verzweigungen der Primärhyphen, als kleine Punkte, die sich antero- und retrograd bewegen und oftmals an der Hyphenspitze akkumulieren (NCoS4) (**Abb. 39 A, Film 6 a**). Solche Akkumulationen sind jedoch in den extrem schnell wachsenden Primärhyphen nicht zu finden, wo die einzelnen Punkte schwerer zu erkennen und durch den starken Zytoplasmastrom dieser extrem schnell wachsenden Hyphen schwerer zu verfolgen sind (**Abb. 39 B, Film 6 b**). In Konidien konnten motile Vesikel beobachtet werden, wohingegen junge Keimlinge oftmals keine oder nur sehr schwache Signale aufwiesen.

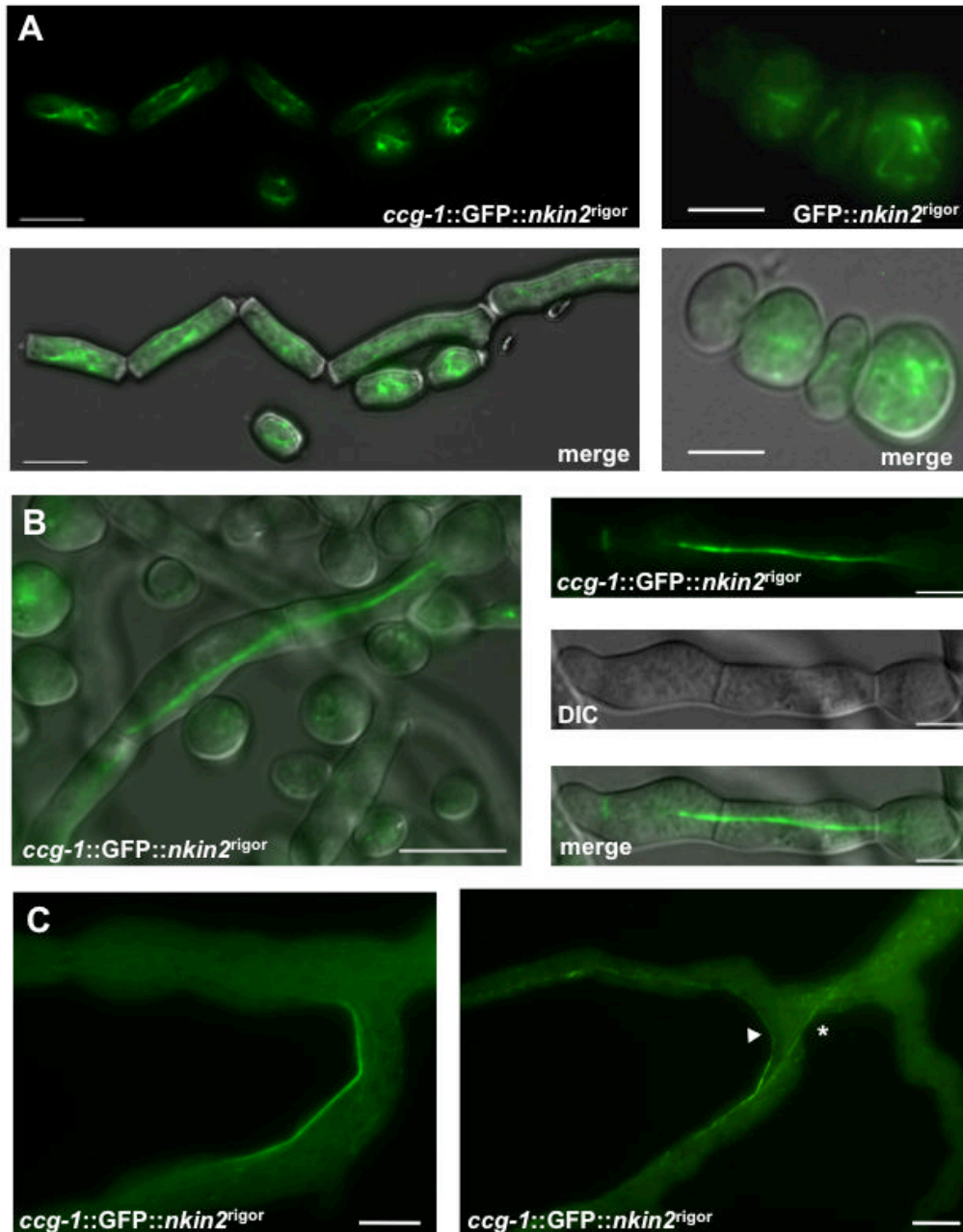
Um zu ermitteln, ob es sich bei den durch GFP-Nkin2 markierten Vesikeln um Endosomen handelt, wurde eine Kolokalisierung mit FM4-64 durchgeführt. Aufgrund deren enormen Geschwindigkeit in den Primärhyphen gestaltete sich die Kolokalisierung als schwierig heraus, jedoch ist die Bewegung der Endosomen etwas distal der Hyphenspitze primärer Hyphen etwas verlangsamt und die Kolokalisierung mit FM4-64 erschien sehr deutlich und zweifelsfrei (**Abb. 39 C, Pfeile**).



**Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigt antero- und retrograde Motilität von Nkin2 und eine Kolokalisierung mit Endosomen. (A)** mcherry-Nkin2 lokalisiert in Verzweigungen der Primärhyphen als kleine sich bewegende Vesikel, die zum Teil an der Hyphenspitze akkumulieren (NCoS2). Ein Kymograph zeigt die Bewegung eines exemplarischen Vesikels auf Raum und Zeit zusammengefasst. Maßstab 5µm. **(B)** Primärhyphen zeigen deutlich mehr Vesikel, die sich aufgrund des zytoplasmatischen Stroms zusätzlich noch schneller bewegen, jedoch nicht an der Hyphenspitze akkumulieren. Die Vesikel bewegten sich so schnell, dass diese in den Aufnahmen durch die Belichtungszeit oftmals verschwommen sind (Vergrößerung) (NCoS4). Maßstab oben 10µm und unten 5µm. **(C)** Kolokalisierung (Pfeile) von GFP-Nkin2 und FM4-64 in einem distalen Teil einer Primärhyphe. Maßstab 5µm.

### 3.2. Nkin2<sup>rigor</sup> bevorzugt eine MT- Subpopulation

Um auch in *N. crassa* eine mögliche Spezifität für MT- Subpopulationen zu untersuchen, wurde auch hier mittels punktgerichteter Mutagenese die *rigor* Mutation in *nkin2* inseriert und dies anschließend subzellulär lokalisiert. Interessant war, dass auch Nkin2<sup>rigor</sup> (NCoS3) spezifisch entlang von MT- Subpopulationen zu beobachten ist, dies jedoch abhängig vom Entwicklungsstadium ist. In Arthrosporen und Konidien bindet GFP-Nkin2<sup>rigor</sup> an mehrere MT, wohingegen es schon in jungen Keimlingen spezifisch mit lediglich einem MT- Bündel assoziiert (**Abb. 40**).

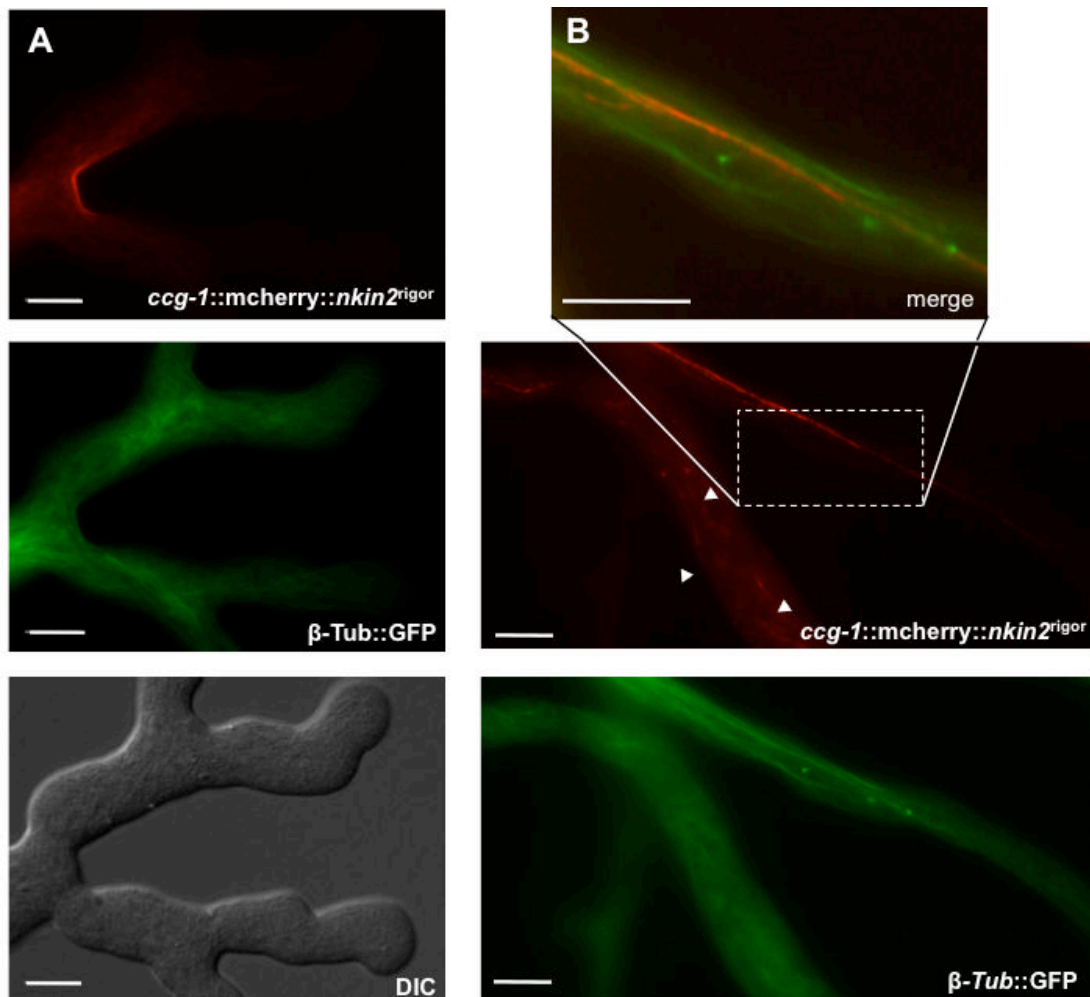


**Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen eine entwicklungs-spezifische MT- Spezifität des GFP-Nkin2<sup>rigor</sup> Fusionsproteins in *N. crassa*. (A) In Arthrosporen (links) und Konidien (rechts) bindet Nkin2<sup>rigor</sup> mehrere MT, Maßstab 5 μm. (B) Bereits in jungen Keimlingen ist eine Bevorzugung eines MT- Bündels deutlich. Maßstab links 10 μm, rechts 5 μm. (C) MT- Spezifität von Nkin2<sup>rigor</sup> ist in apikalen Verzweigungen der Primärhyphen entlang an kortikalen (Pfeilspitze) und starren MT, die die Hyphe durchqueren (Stern) sehr auffällig und strukturell sehr unterschiedlich zu Keimlingen und Verzweigungen. Maßstab 10 μm.**

Auffallend ist, dass an apikalen Verzweigungen der Primärhyphen an der Kolonieperipherie kortikal entlang der Zellwand prominent spezifisch einzelne MT- Bündel gebunden werden (**Abb. 40 C**, Pfeil). Oft wurden auch einzelne MT- Subpopulationen markiert, die Verzweigungspunkte der primären Hyphen sehr starr durchqueren (**Abb. 40 C**, Stern). Diese sind jedoch nicht mit den langen, einzelnen MT, die die Verzweigungen primärer Hyphen länglich durchqueren, vergleichbar (**Abb. 41 A,B**). Entlang dieser Abzweigungen werden ein

oder zwei Bündel an MT eher in der Mitte der Hyphe bevorzugt, was in den Primärhyphen selbst nicht so auffällig zu erkennen ist, da dort, abgesehen von den apikalen Verzweigungspunkten oftmals eher unspezifisch mehrere kürzere MT Stücke gebunden werden (**Abb. 41 B**, Pfeile). Durch Kolokalisierung mit  $\beta$ -Tubulin-GFP konnte bestätigt werden, dass das MT- Zytoskelett in den mikroskopierten Hyphen tatsächlich intakt ist.

Diese Beobachtungen zeigen demnach, dass sowohl ein entwicklungspezifischer Unterschied in der Nkin2 Funktion vorliegen könnte, da in Konidien und Arthrosporen keinerlei Bevorzugung für einzelne MT Bündel beobachtet werden konnte; zum anderen aber auch, dass die Lokalisierung deutlich zwischen Primär- und den abzweigenden Hyphen variiert, was auf unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Hyphenarten des Kinesins hindeutet.

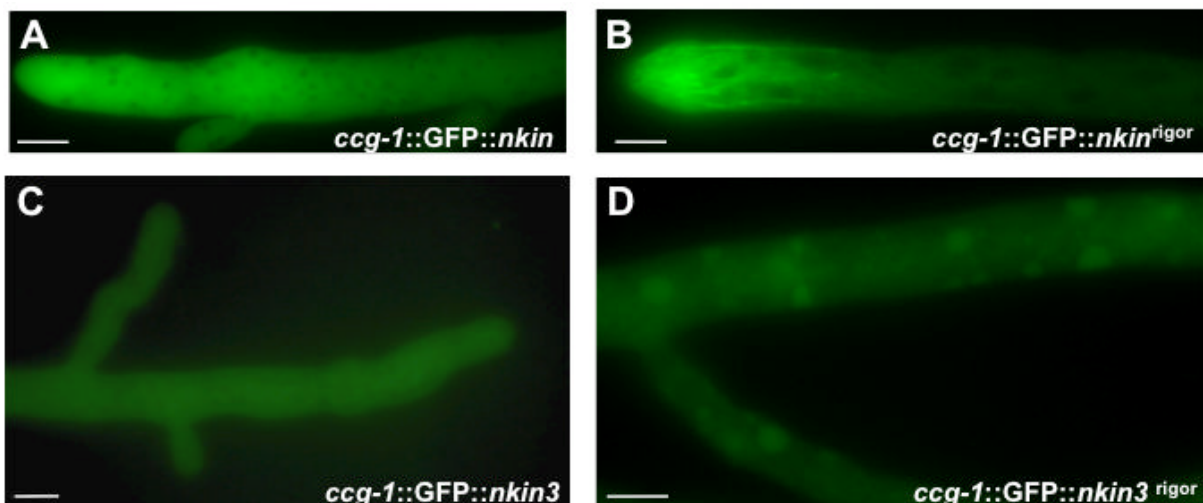


**Abbildung 41: Kolokalisierung *mcherry-Nkin2<sup>rigor</sup>* mit dem MT- Zytoskelett, welches durch eine  $\beta$ -Tubulin- GFP Fusion visualisiert wird. (A) MT- Spezifität durch *mcherry-Nkin2<sup>rigor</sup>* (NCoS1) entlang korikaler MT an apikalen Verzweigungen der Primärhyphen, restliches MT- Netzwerk ( $\beta$ -Tubulin-GFP, N2425) ist vollkommen normal und scheint keine Beeinträchtigung durch die künstliche permanente Bindung des *Nkin2<sup>rigor</sup>* aufzuweisen. (B) Direkter Vergleich zwischen einer Primärhypha (links) und einer Verzweigung (rechts) zeigt deutlich, dass die Spezifität in den Verzweigungen deutlich stärker ausgeprägt ist, als in Primärhyphen, in denen nur kurze MT- Stücke durch das Kinesin gebunden werden (Pfeile). Maßstab jeweils 10  $\mu$ m.**

### 3.3. Andere Kinesine, wie Nkin3 und Nkin, zeigen keine MT- Präferenz

Ob auch andere Kinesine möglicherweise eine vergleichbare MT- Präferenz wie Nkin2 aufweisen, wurde in Folgenden untersucht. Dazu wurden die vollständigen offenen Leseraster zweier weiterer Kinesine, Nkin und Nkin3 (**Abb. 38 B, C**), N-terminal mit GFP markiert unter der Expressionkontrolle des *ccg-1* Promotors stehend in *N. crassa* transformiert und analysiert. Das konventionelle Kinesin, Nkin (Kinesin-1, NCU09730), lokalisiert, wie auch sein *A. nidulans* Ortholog KinA, im Zytoplasma (NCoS5), unabhängig der Hyphenart und deren Entwicklungsstandes. Nach Einbringen der *rigor* Mutation erkennt man ausschließlich an den Hyphenspitzen eine Vielzahl gebundener MT, aber eindeutig keine Spezifität (NCoS6) (**Abb. 42 A, B**).

Auch Nkin3 (NCU03715), das *uncB* Homolog, lokalisiert sowohl mit als auch ohne *rigor* Mutation im Zytoplasma und akkumuliert zuweilen schwach in Vakuolen- ähnlichen Strukturen (**Abb. 42 C, D**).



**Abbildung 42: Andere Kinesine *N. crassa* weisen keine Spezifität für MT-Subpopulationen auf.** (A) GFP-Nkin lokalisiert im Zytoplasma und zeigt keine Assoziation zu Vesikeln (NCoS5). (B) GFP-Nkin<sup>rigor</sup> bindet mehrere MT an der Hyphenspitze von Primärhyphen (C,D) GFP-Nkin3 lokalisiert mit (NCoS11) und ohne *rigor* Mutation (NCoS10) im Zytoplasma und hat keine vergleichbare hohe Affinität zu den MT selbst wie die beiden anderen NKin und Nkin2. Maßstab jeweils 10 µm.

Heterologe Genexpressionsversuche zwischen *A. nidulans*, *U. maydis* und *N. crassa* wurden angestrengt, um zu untersuchen, ob beispielsweise *A. nidulans* UncA<sup>rigor</sup> auch in *N. crassa* die gleiche MT- Subpopulation wie Nkin2<sup>rigor</sup> präferiert und somit die Spezifitätserkennung beider Kinesine jeweils auch im anderen Organismus funktionell ist. Hierfür wurde die Expression von GFP-UncA<sup>rigor</sup> (*A. nidulans* cDNA Sequenz) und GFP-KinA<sup>rigor</sup>β5L8 unter der Kontrolle des *ccg-1* Promotors durch gezielte Rekombination in den *his-3* Locus in *N. crassa* transformiert und analysiert. Die jeweiligen Transformanten zeigten jedoch keine Lokalisierung entlang von MT, sondern lediglich ein basales Rauschen im Zytoplasma.

Demnach ist die Expression von *A. nidulans* Proteinen in *N. crassa* trotz ähnlicher Sequenzen in diesen Fällen nicht möglich. Auch die Expression des *U. maydis* Kinesin-3, Kin-3, in *A. nidulans* zeigte kein Signal in den Hyphen. Somit ist gegenseitiges Komplementieren von Deletionen mit artfremden Gensequenzen zumindest mit den genannten Beispielen nicht empfehlenswert.

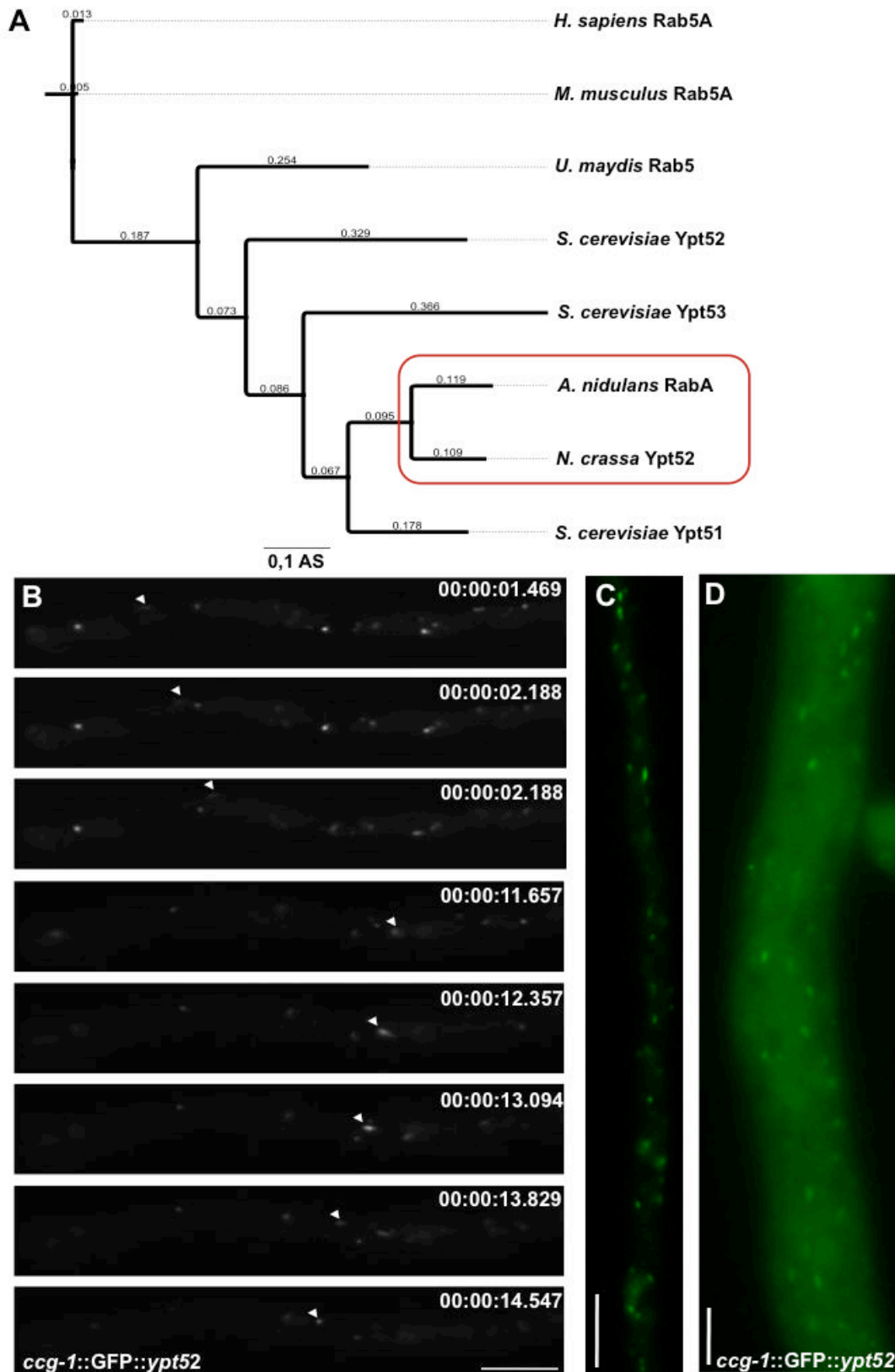
### 3.4. Etablierung eines Endosomenmarkers in *N. crassa*

Um erstmals zu untersuchen, ob Nkin2 neben der Mitochondrienbewegung (Fuchs & Westermann, 2005) zusätzlich auch tatsächlich in der Endosomenverteilung involviert ist, was naheliegt, da in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass Nkin2 mit Vesikeln kolokalisiert, welche durch FM4-64 gefärbt wurden (**Abb. 39 C**), wurde ein Endosomenmarker für *N. crassa* etabliert. Hierfür wurde das *S. cerevisiae* Homolog der Rab5 ähnlichen GTPase, Ypt52, welche ein verbreiteter und akzeptierter Marker für Endosomen auch in anderen Modellorganismen darstellt und gerade in Ascomyceten stark konserviert ist (**Abb. 43 A**), im Genom *N. crassas* ermittelt (NCU06410), mit GFP markiert und in den Wildtyp FGSC#9717 über *his-3* Rekombination integriert und lokalisiert (NCoS7).

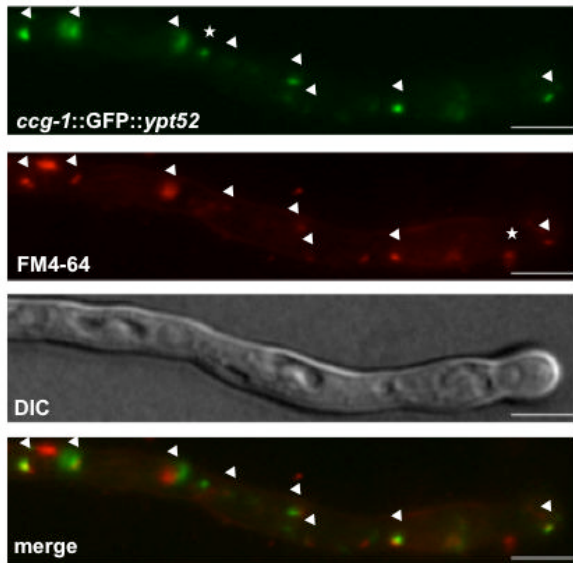
GFP-Ypt52 lokalisiert unter der Kontrolle des *ccg-1* Promotors in kleinen sich sehr schnell antero- als auch retrograd bewegenden Vesikeln. Gerade in Keimlingen und jungen Hyphen kann man einzelne Vesikel leicht verfolgen (**Abb. 43 B,C, Film 7**). In Primärhyphen ist die Anzahl der Vesikel deutlich erhöht und die Geschwindigkeit durch den zytoplasmatischen Fluß noch höher, jedoch sind die einzelnen Signale auch hier noch zu differenzieren (**Abb. 43 D**).

Ob das Rab5- Homolog Ypt52 tatsächlich Endosomen markiert, wurde untersucht, indem eine Kolokalisierung mit dem membranbindenden Farbstoff FM4-64, der über Endozytose internalisiert wird, durchgeführt wurde. Es ist auffallend, dass nahezu alle von FM4-64 markierten Endosomen auch ein GFP-Ypt52 Signal aufweisen (**Abb. 44**, Pfeile), jedoch wiederum nicht alle mit GFP-Ypt52 gebundenen Vesikel auch durch FM4-64 gefärbt wurden (**Abb. 44**, Stern), was darauf hindeutet, dass es sich eventuell bei den GFP markierten Vesikel nicht ausschließlich um Endosomen handeln könnte.



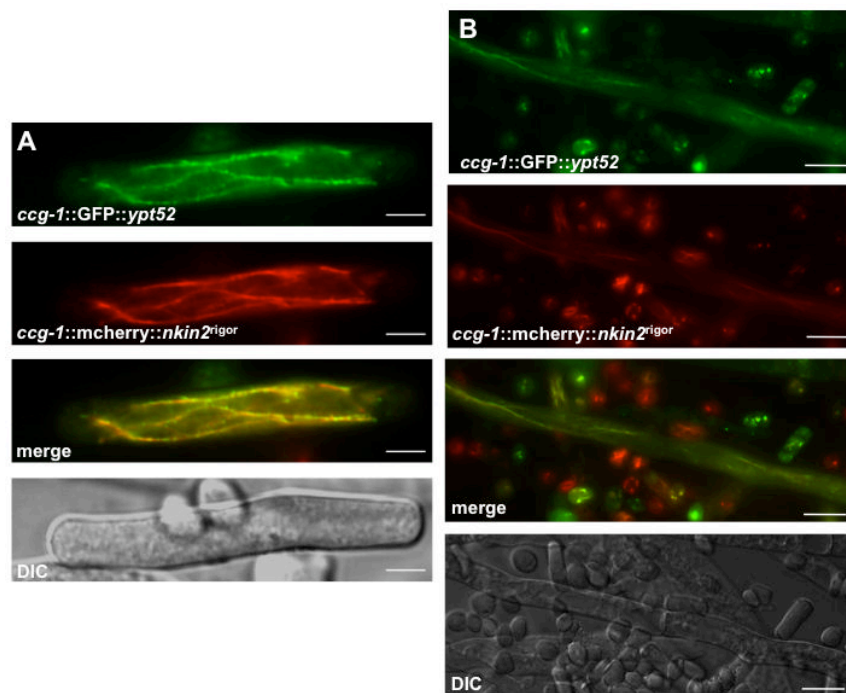


**Abbildung 43: Rab/ Ypt- Stammbaum und fluoreszenzmikroskopische Analyse von GFP-Ypt52 markierten Vesikeln in *N. crassa*.** (A) Stammbaum verschiedener Rab/Ypt Homologe mit dem Programm *Geneious* (Maximum likelihood), Maßstab entspricht dem Austausch einer AS durch eine andere. (B) Zeitraffer visualisiert antero- und retrograde Bewegung von GFP-Ypt52 markierten Vesikeln in einer jungen Hyphe (NCoS7). (C) GFP-Ypt-52 in einer jungen Hyphe (D) Primärhyphen zeigen jedoch im Vergleich dazu deutlich höhere Geschwindigkeiten und erhöhte Anzahl der GFP-Ypt-52 markierten Vesikeln selbst. Maßstab entspricht 10µm.



**Abbildung 44: GFP-Ypt52 kolokalisiert mit durch FM4-64 gefärbten Endosomen (Pfeile) in einer jungen Hyphe.** Es gibt jedoch auch einzelne GFP-Ypt-52 markierte Vesikel, die nicht mit FM4-64 kolokalisieren (Stern). Maßstab 5µm.

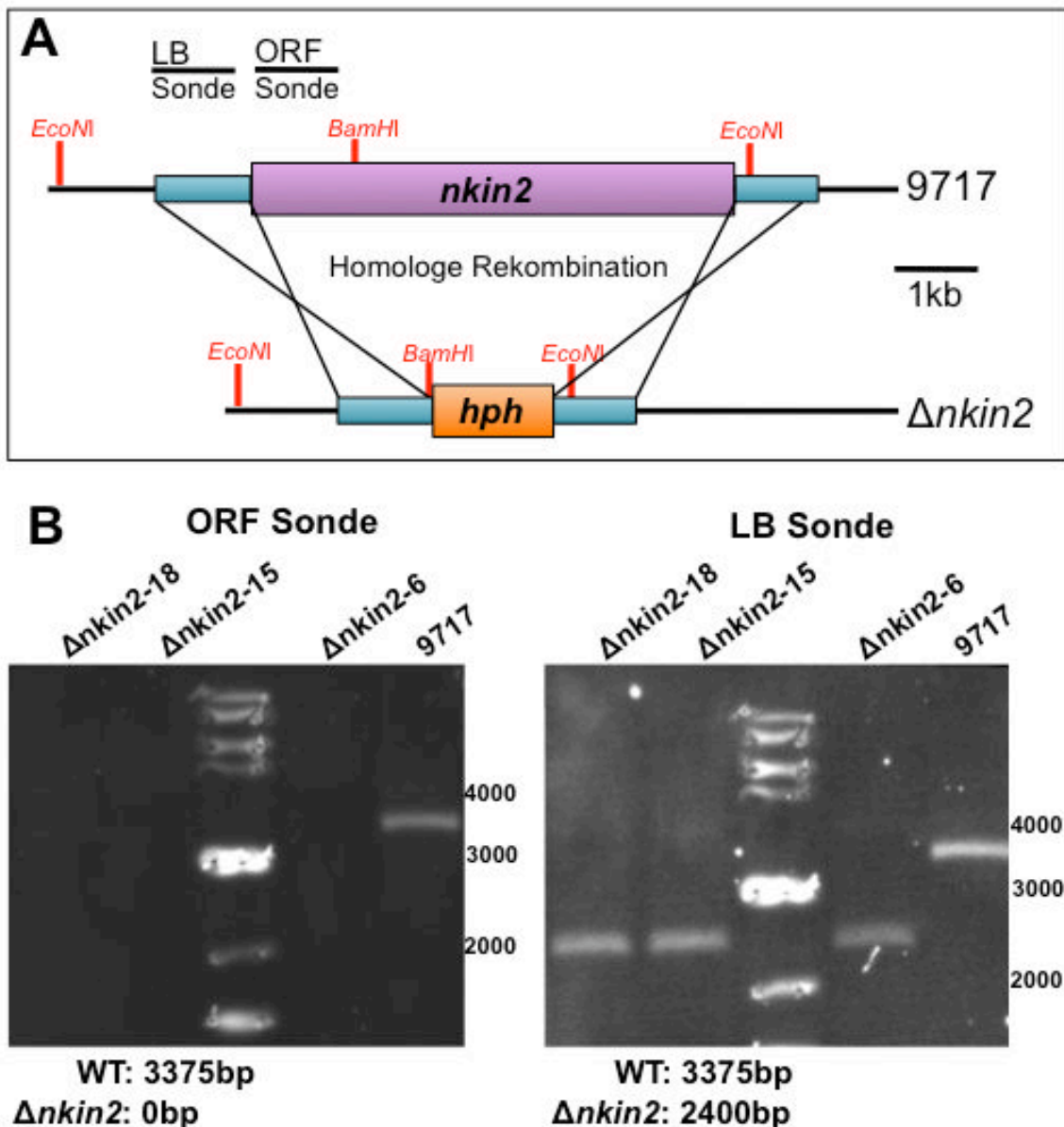
Kolokalisierungsexperimente sollten klären, ob der Transport, der durch Ypt52 markierten Endosomen durch Nkin2 bewerkstelligt wird. Dafür wurden Hyphenfusionen mit den beiden *mcherry-Nkin2<sup>rigor</sup>* und GFP-Ypt52 exprimierenden Stämmen durchgeführt. Es war erstaunlich, wie stark die Bindung der Endosomen an das Kinesin in den koexprimierenden Hyphen erschien, da die im Wildtyp normalerweise hoch beweglichen GFP-Ypt52 markierten Vesikel nun förmlich an die MT klebten, wie auch das *rigor* mutierte Kinesin-3 und keine Bewegung mehr aufwiesen (**Abb. 45**).



**Abbildung 45: GFP-Ypt52 wird durch *mcherry-Nkin2<sup>rigor</sup>* so fest gebunden, dass diese starr an MT binden.** (A) Kolokalisierung in einer Arthrospore, in der *Nkin2<sup>rigor</sup>* generell unspezifisch mehrere MT bindet und hier nun auch die GFP-Ypt52 Vesikel an den MT fixiert werden. Maßstab 5µm. (B) Auch in einer Verzweigung ist das ungewöhnliche *Nkin2<sup>rigor</sup>* vermittelte Binden der Endosomen an die MT deutlich zu erkennen. Maßstab 10µm.

### 3.5. Deletion von Nkin2 zeigt Endosomenmotilitätsdefekte

Für funktionelle Analysen des Kinesin-3 Nkin2 ist eine Deletion unerlässlich. Diese wurde erreicht, indem mittels einer Fusions PCR eine Kasette amplifiziert wurde, die die Hygromycin B Phosphotransferase, *hph*, enthielt, welche die HygromycinB Resistenz vermittelt, eingerahmt von jeweils 1000bp der rechten und linken Flanke des Nkin2 Leserasters (**Abb. 46 A**). Diese Kasette wurde dann mittels Elektroporation in den Pilz transformiert und die Transformanten wurden anschließend auf homologe Integration in den *nkin2* Genort getestet (**Abb. 46 B**).



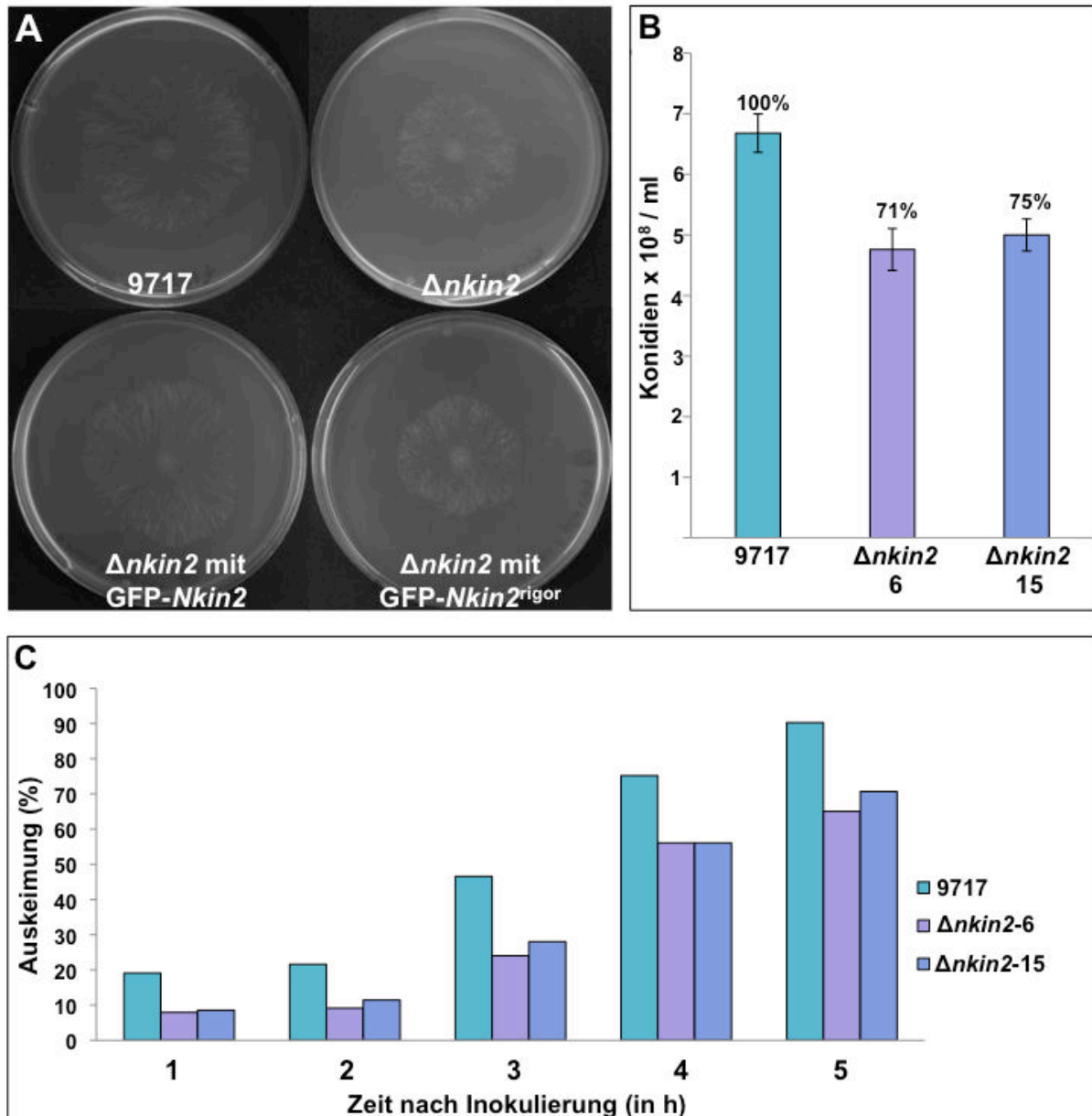
**Abbildung 46: Deletion von *nkin2*.** (A) Schematische Darstellung der Deletion und Visualisierung der homologen Rekombination der Kasette in den *nkin2* Genort. LB (*left border*) und ORF (*open reading frame*) deutet die Position der Sonden an, die zur anschließenden DNA-DNA Hybridisierung im Southern Blot verwendet wurden. Restriktionsenzyme zeigen die entstehenden Bandengrößen auf. (B) Southern Blot mit  $\Delta nkin2$  im Vergleich zum Wildtyp; die DNA wurde mit *EcoNI* und *BamHI* verdaut.

Zum Test der homologen Integration der Deletionskassette wurden die Transformanten von dem sorbosehaltigen Selektionsmedium, auf denen *N. crassa* Kolonien anfangs hefeartig wachsen, auf saccharosehaltiges Vogel's Minimalmedium, jeweils mit Hygromycin B als Selektionsdruck enthalten, überimpft und so vereinzelt. Da die zu transformierenden Konidien oftmals mehrere Kerne beinhalten, wurden anfangs Kolonie- PCRs im großen Stil der verschiedenen Transformanten auf einen Teil des offenen Leserahmens durchgeführt, um so die Transformanten mit Heterokaryen von Anfang an gleich auszusortieren. Die hier negativen Kolonien wurden dann auf homologe Integration der Hygromycinkassette in den *Nkin2* Locus überprüft. Drei der 80 getesteten Kolonien kamen in Frage und es wurde ein Southern Blot durchgeführt. Hierfür wurde zum einen die linke Flanke des Gens (LB) als Sonde verwendet und die erwartete Verschiebung der Bandengröße zwischen Wildtyp und Deletionsmutante beobachtet. Anschließend wurde der Blot *gestripped* und mit der Leserastersonde (ORF) hybridisiert, um zusätzliche *nkin2* Leseraster durch ein mögliches Heterokaryon der Transformanten auszuschließen. Zwei der getesteten Transformanten wiesen eine klare und saubere Deletion auf (NCoS8 - Nr.6 und Nr. 15) (**Abb. 46 B**).

Anschließende Wachstumstests zeigten, dass die *Nkin2* Deletion überraschenderweise einen schwächeren Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit hat als erwartet, da der Defekt durch die *uncA* Deletion in *A. nidulans* oder die *nkin* Deletion in *N. crassa* weitaus stärker ist (Zekert & Fischer, 2009; Seiler *et al.*, 1999). Fuchs und Weber zeigten 2005, dass man makroskopisch kaum Unterschiede zwischen *nkin2* Deletion und dem Wildtyp feststellen kann (Fuchs & Weber, 2005), jedoch sind die Folgen durch das verlangsamte Wachstum nach 30 Stunden Wachstum makroskopisch deutlich zu erkennen (**Abb. 47 A**). Bei den Wachstumsvergleichen ist auch zu sehen, dass es bei der Rekplementation der *nkin2* Deletion mit GFP-*Nkin2* (pCoS172) zu einer Wiederherstellung der Wildtyp- Situation kommt, wohingegen die Rekplementation mit GFP-*Nkin2*<sup>rigor</sup> (pCoS173) noch immer den Phänotyp der  $\Delta nkin2$  Mutante aufweist. Dass die *rigor* Mutation zu einem Phänotyp führt, der der Deletion sehr stark ähnelt, wurde auch für *UncA* und *UncA*<sup>rigor</sup> in *A. nidulans* beobachtet (Zekert & Fischer, 2009). Daraus kann geschlossen werden, dass die *rigor* Mutation die Bewegung des Kinesins so stark behindert, dass der Motor dadurch nicht mehr funktionell ist und zum anderen, dass der Phänotyp der *nkin2* Mutante definitiv von dieser Deletion herrührt und nicht durch eine zufällige andere Mutation im Genom des Stammes verursacht wurde.

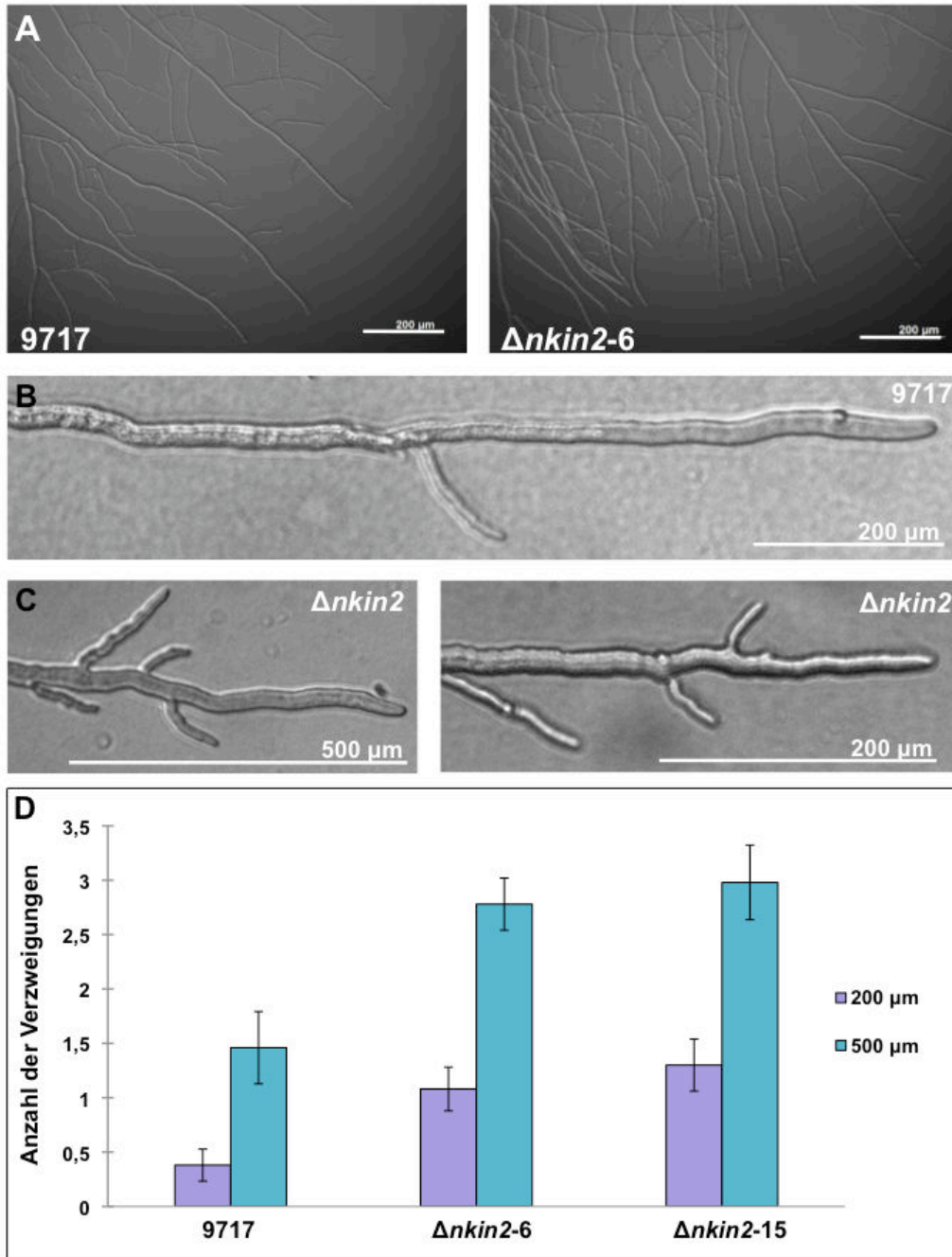
Die Wachstumsrate des Wildtyps und der beiden unabhängigen *Nkin2* Deletionsstämme,  $\Delta nkin2-6$  und  $\Delta nkin2-15$ , wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden ermittelt. Mit 39,83  $\mu\text{m}/\text{min}$  wächst der Wildtyp wesentlich schneller als die  $\Delta nkin2$  Stämme mit 32,06  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $\Delta nkin2-6$ ) und 34,25  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $\Delta nkin2-15$ ).

Gerade in der Auskeimung, die in den ersten zehn Stunden nach Inokulation zu beobachten ist, wurden bei der Bestimmung der Wachstumsrate auf Kolonieebene signifikante Unterschiede festgestellt und anschließend mikroskopisch quantifiziert. Die *nkin2* Deletionen zeigen gerade in den ersten Stunden eine deutliche Verzögerung in der Auskeimung, da hier lediglich 67% der Konidien nach fünf Stunden ausgekeimt waren, beim Wildtyp waren zum gleichen Zeitpunkt bereits 90% der Konidien (Abb. 47 B,C).



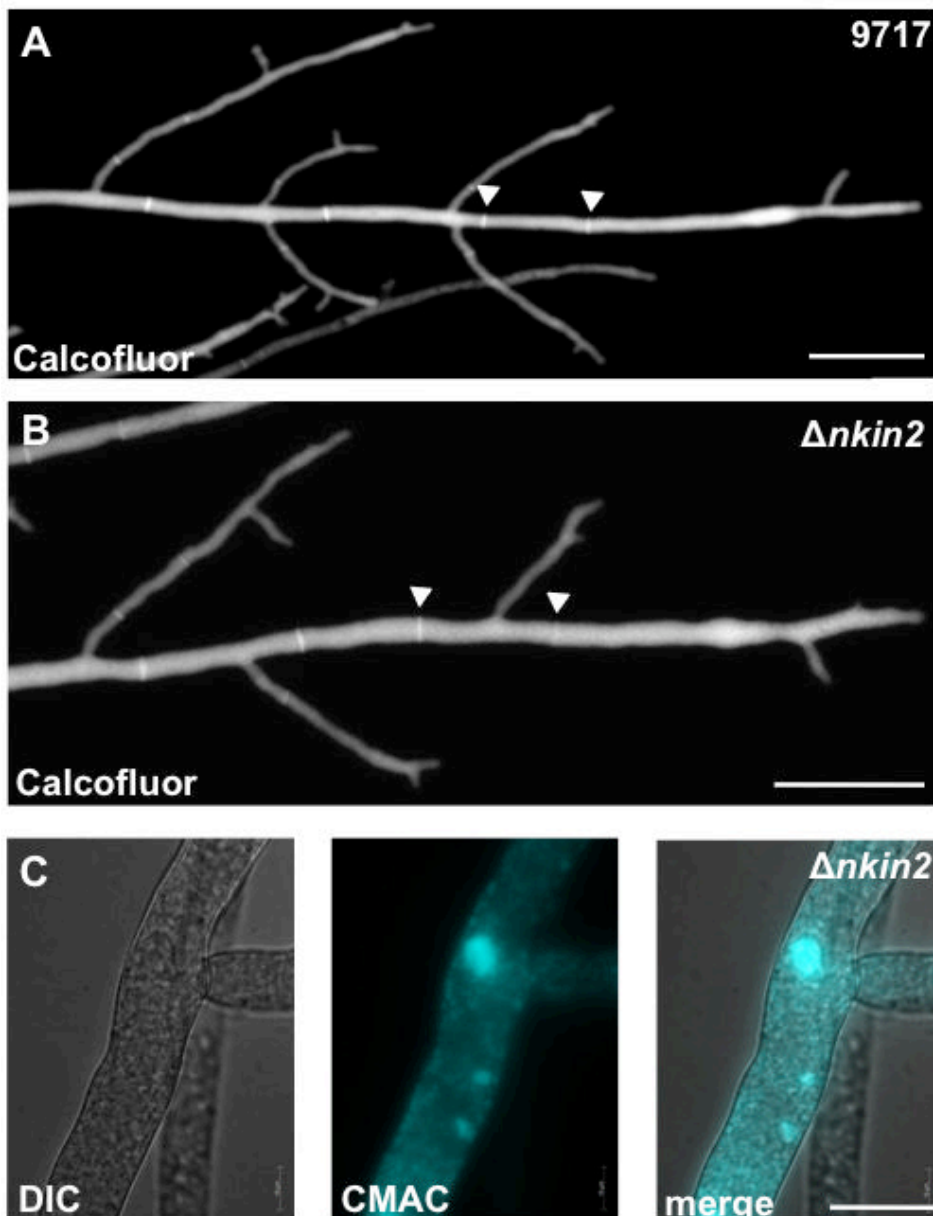
**Abbildung 47: Wachstumsvergleich  $\Delta nkin2$  (NCoS8 a und b), Rekompensationen von  $\Delta nkin2$  und WT (FGSC#9717).** (A) Makroskopischer Wachstumsvergleich auf Kolonieebene von WT,  $\Delta nkin2$  und den beiden Rekompensationen von  $\Delta nkin2$  mit GFP-*Nkin2* und GFP-*Nkin2*<sup>rigor</sup>. Die Platten (Vogel's Minimalmedium mit Histidin) wurden mit 10  $\mu$ l Sporensuspension (10<sup>6</sup> Zellen/ml) inokuliert und 30 Stunden bei 28°C im Dunkeln inkubiert. (B) Zur Quantifizierung der Konidien wurden Platten (Vogel's Minimalmedium mit Histidin) mit 10  $\mu$ l einer 3,6 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml konzentrierten Sporensuspension inokuliert und 72 Stunden bei 28°C im Licht inkubiert, isoliert und dann ausgezählt. (C) Auskeimungsanalyse. Hierfür wurden jeweils 1,5 x 10<sup>6</sup> Konidien auf Vogel's Minimalmedium mit Histidin ausplattiert und pro Zeitpunkt jeweils 130 Zellen mikroskopiert und auf Keimung hin untersucht.

Mikroskopische Analysen zeigten auch ein auffallend erhöhtes Verzweigungsmuster vor allem in den apikalen und subapikalen Bereichen der Primärhyphen (**Abb. 48 A-C**). Anschließende Quantifizierungen der Verzweigungen in den ersten 200  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  vor der Hyphenspitze primärer Hyphen zeigen klar, dass die *nkin2* Deletionen deutlich mehr Verzweigungen aufweisen, als der Wildtyp (**Abb. 48 D**).



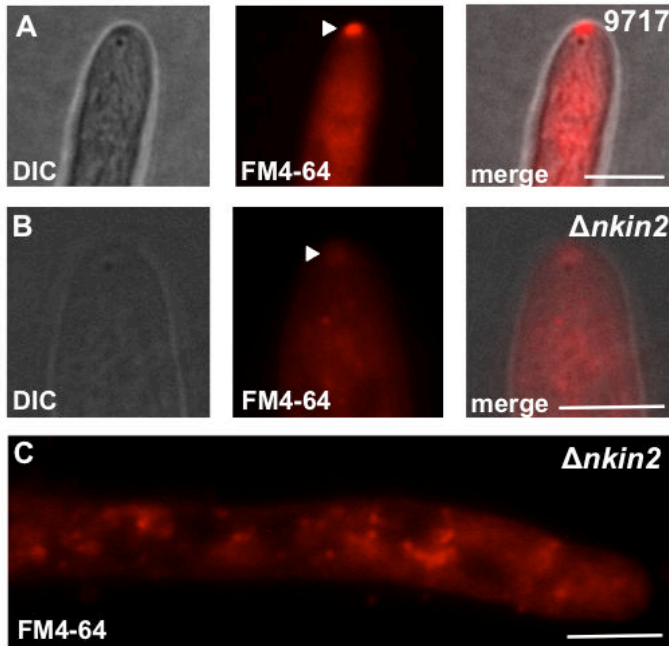
**Abbildung 48:** Die *nkin2* Deletion zeigt ein erhöhtes Verzweigungsmuster in subapikalen Regionen von *N. crassa* Primärhyphen im Vergleich zum Wildtyp. (A) Vergleichende Übersichtsaufnahme von Wildtyp (FGSC #9717) und  $\Delta nkin2$ . Maßstab entspricht 500 $\mu\text{m}$ . (B) Hyphen des Wildtyps zeigen in subapikalen Regionen kaum Verzweigungen. (C) Eine deutlich erhöhte Anzahl an Verzweigungen ist in der *nkin2* Deletion zu beobachten. (D) Quantifizierung der 500  $\mu\text{m}$  und 200  $\mu\text{m}$  von der Hyphenspitze entfernten Regionen bezüglich der Anzahl an Verzweigungen. Der Wildtyp weist deutlich weniger Verzweigungen auf. Es wurden jeweils Hyphen ausgezählt.

Auch die Septierung wurde im Bezug auf Anzahl und Verteilung mit Hilfe des Farbstoffes *Calcofluor White*, welcher spezifisch Zellulose und Chitin in der Zellwand färbt, vergleichend analysiert. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und *Nkin2* ausgemacht werden (**Abb. 49 A,B**). Weiterhin wurde auch die Verteilung der Vakuolen, welche in der *Nkin* Deletion beeinträchtigt ist (Seiler *et al.*, 1997), mit *Cell Tracker Blue* (CMAC) studiert. CMAC (7-Amino-4-Chloromethyl-Coumarin) kann spezifisch Vakuolen anfärben. Aber auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und der Deletion ersichtlich (**Abb. 49 C**).



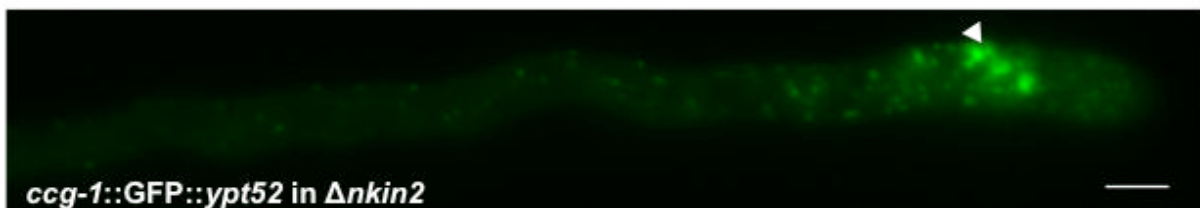
**Abbildung 49:** Die *nkin2* Deletion zeigt weder in Septierung noch in der Vakuolenverteilung signifikante Unterschiede. (A,B) Analyse der Septenverteilung (Pfeile) und -anzahl der *nkin2* Deletion im Vergleich zum Wildtyp. Maßstab entspricht jeweils 100  $\mu\text{m}$ . (C) Färbungen mit CMAC (10  $\mu\text{m}$ ) zeigen auch keine Veränderungen in der Vakuolenpositionierung oder -motilität. Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Interessanterweise konnte jedoch mit dem bereits erwähnten Farbstoff FM4-64, der erst die Plasmamembran färbt, welche dann in Form von Endosomen internalisiert wird und somit auch den prominenten Spitzenkörper *N. crassas* einfärben kann, beobachtet werden, dass die *nkin2* Deletion einen instabileren Spitzenkörper aufweist, wohingegen der Spitzenkörper im Wildtyp permanent zu verfolgen war (**Abb. 50**).



**Abbildung 50:** Der durch FM4-64 gefärbte Spitzenkörper ist im Wildtyp permanent zu beobachten, wohingegen eine Instabilität in  $\Delta nkin2$  beobachtet wurde. (A) FM4-64 Färbung des Wildtyps zeigt einen permanenten Spitzenkörper am Apex von Primärhyphen (Pfeil). (B,C) In  $\Delta nkin2$  lässt sich der Spitzenkörper nur transient zu sehen war. Maßstab entspricht

Da in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass Nkin2 Endosomen entlang von MT transportiert, wurde auch die Verteilung und Motilität der GFP-Ypt52 markierten Endosomen in der *nkin2* Deletion untersucht. Auffällig war hier, dass die Ypt52 markierten Vesikel fast keine Motilität mehr aufwiesen und es waren auch starke Akkumulationen kurz vor der Hyphenspitze zu beobachten (**Abb. 51**, Pfeil, **Film 8 a-c**).



**Abbildung 51:** GFP-Ypt52 zeigt Akkumulationen an der Hyphenspitze (Pfeil), sowie fast keine sichtbare Bewegung der Endosomen in  $\Delta nkin2$  (NCoS12). Maßstab 5  $\mu\text{m}$ .



## V. Diskussion

### 1. Eine neue Funktion der UncA- Schwanzdomäne

Die meisten Eukaryoten enthalten verschiedene Gene, die für Tubuline kodieren und die so Tubuline mit unterschiedlichen Eigenschaften erzeugen. Aber nicht nur durch unterschiedliche Sequenzen, sondern auch durch PTM können die MT spezifisch modifiziert werden. Eine zentrale PTM, das zyklische Anhängen und Abspalten des C-terminalen Tyrosins an  $\alpha$ -Tubulin wurde bereits 1975 beschrieben (Arce *et al.*, 1975). Diese Modifikation wird durch die Carboxypeptidase, die das Abspalten des carboxyterminalen Tyrosins katalysiert, sowie der Tubulin- Tyrosin- Ligase, die das Tyrosin bei Bedarf wieder anhängen kann, reguliert (Westermann & Weber, 2003; Hammond *et al.*, 2008).

Bisher ist wenig über die modifizierenden Enzyme selbst, sowie deren biologischen Funktion bekannt. Es wurde beobachtet, dass dynamische MT tyrosiniert und die stabileren hingegen detyrosiniert sind (Schulze *et al.*, 1987). Detyrosinierung stabilisiert die MT aber nicht *per se* (Khawaja *et al.*, 1988), sondern MT- Stabilisierung induziert die Detyrosinierung und ist demnach eine Konsequenz aber nicht die Ursache der Detyrosinierung (Webster *et al.*, 1987). In unserer Gruppe wird derzeit in einem Parallelprojekt die Rolle der TtlA, der bisher einzigen, mit Hilfe von Sequenzhomologien identifizierten Tubulin- Tyrosin- Ligase in *A. nidulans* untersucht.

#### 1.1. Die MT- Spezifität von Kinesin-3 ist auch in *N. crassa* konserviert

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die MT- Spezifität der Kinesin-3 Motoren UncA und Nkin2 in den beiden Acomyceten *A. nidulans* und *N. crassa* tatsächlich konserviert ist. In beiden Fällen wird durch das mit der *rigor* Mutation modifizierte Kinesin lediglich eine MT- Subpopulation in den Hyphen gebunden, wohingegen andere Kinesine keine solche Spezifität zeigen. Interessant ist hierbei eine entwicklungspezifische Lokalisierung von GFP-Nkin2<sup>rigor</sup>, so wurde in Konidien und Arthrosporen das Binden vieler MT beobachtet, wohingegen Spezifität für eine MT- Subpopulation schon in jungen Keimlingen zu beobachten war (**Abb. 40**). In Verzweigungshyphen von Primärhyphen wird auch deutlich nur ein MT- Bündel durch das Kinesin bevorzugt, ähnlich zur Lokalisierung von UncA<sup>rigor</sup> in *A. nidulans* (**Abb. 40**).

Diese Beobachtungen deuten zum einen auf eine entwicklungsabhängige Aufgabe von Nkin2 hin und zum anderen auf unterschiedliche Funktionen zwischen primären Hyphen und deren abzweigenden Hyphen (Verzweigungen). Es wird angenommen, dass Nkin2 in Primärhyphen möglicherweise eher in strukturelle Aspekte, wie der mechanischen Etablierung von Verzweigungen, involviert ist, wohingegen es in Keimlingen und Verzweigungshyphen vorrangig den Langstreckentransport von Endosomen entlang von

stabilisierten, potentiell detyrosinierten MT, analog zu *A. nidulans* bewerkstelligt. Hierbei ist auch zu bedenken, dass der zytoplasmatische Fluss in den Primärhyphen deutlich stärker ist und hier folglich anterograde Transportprozesse weniger notwendig sind, da die Vesikel passiv und ausreichend durch den Fluss des Zytoplasmastroms zur Hyphenspitze gelangen, wohingegen in jüngeren und schmalen Hyphen, wie CATs und Verzweigungen, anterograde Transport weiterhin aktiv durch die Kinesine vollzogen werden muss. Diese Hypothesen decken sich mit den Beobachtungen der *nkin2* Deletion. Hier wurden die stärksten Wachstumsdefekte während der Auskeimung und Kolonieetablierung beobachtet. Die größten Akkumulationen der mit GFP-Ypt52 markierten Endosomen in  $\Delta nkin2$  wurden in jungen Hyphen beobachtet. Auch das erhöhte subapikale Verzweigungsmuster in  $\Delta nkin2$  könnte damit erklärt werden, dass Nkin2 Einflüsse in Primärhyphen auf die Positionierung und Etablierung von Verzweigungen hat. Entwicklungs- und lokalspezifische Aufgaben von Kinesin-3 Motoren wurden bisher in filamentösen Pilzen nicht beschrieben, jedoch geben Ergebnisse dieser Arbeit Anlass diese spezifischen Funktionen weiter zu untersuchen.

### 1.2. Kinesin-3 bevorzugt MT- Subpopulationen, aber wie?

Zekert und Fischer publizierten 2009, dass eine MT- Subpopulation, die durch das Kinesin-3 UncA<sup>rigor</sup> dekoriert wird, wahrscheinlich durch Detyrosinierung der Tubuline definiert wird (Fischer & Zekert, 2009). Das ist das bisher erste und einzige Beispiel solcher PTM in filamentösen Pilzen. Neue Erkenntnisse und Fortschritte wurden gerade in den letzten Jahren bezüglich der biologischen Bedeutung der Tyrosinierung Tubulins veröffentlicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Suppression der Tubulin- Tyrosin- Ligase und der daraufhin folgenden drastischen Akkumulation von detyrosiniertem Tubulin die Wahrscheinlichkeit für Tumorwachstum in tierischen Modellsystemen und menschlichen Krebsarten erhöht (Mialhe *et al.*, 2001) und zu einer lethalen Disorganisation der Nervenbahnen führt (Erck *et al.*, 2005).

Um weitere Hinweise auf detyrosinierte MT zu erlangen, wurde im Rahmen dieser Arbeit in der Literatur nach Motiven gesucht, die an der Vermittlung der modifizierten MT beteiligt sind, um den Mechanismus der PTM Erkennung durch das Motorprotein selbst näher zu verstehen. Bezüglich des direkten Effekts des Tyrosinierungsstatus auf Kinesine wurde 2009 veröffentlicht, dass der Grad an Detyrosinierung der MT die MT-Depolymerisierungsaktivität von Kinesin-13 inhibiert (Peris *et al.*, 2009). Dunn und Kollegen zeigten 2008, dass Kinesin-1 bevorzugt detyrosinierte MT bindet und es wird vermutet, dass die fehlende Detyrosinierung möglicherweise zu einer verringerten Bindungsaffinität zwischen Kinesin-1 und den MT in Neuronen führt und nicht mehr gebunden werden kann (Dunn *et al.*, 2008; Ikegami & Setou, 2010). In Neuronen konnte auch gezeigt werden, dass Kinesin-1 anhängiger Vesikeltransport durch Detyrosinierung und Tyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin in Axonen und Dendriten spezifisch navigiert werden kann (Konishi & Setou, 2009).

Während Somatodendriten vorwiegend tyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin enthalten, so ist es in Axonen detyrosiniertes; dadurch ist es dem Kinesin-1 KIF5 möglich, sich selektiv entlang detyrosinierter MT in Axonen zu bewegen. In diesem Fall stellte sich heraus, dass die sogenannte  $\beta$ 5L8-Region in der Motordomäne für die MT-Differenzierung verantwortlich ist. Daraufhin wurde in dieser Arbeit die entsprechende Region, die offensichtlich die spezifische Erkennung des Kinesin-1 Motors für detyrosinierte MT vermittelt, künstlich an eine analoge Stelle in der Motordomäne des *A. nidulans* Kinesin-1, KinA, eingebracht. Interessanterweise hat das sonst unspezifische und damit an mehrere MT bindende GFP-KinA<sup>rigor</sup> mit veränderter  $\beta$ 5L8-Region nur noch ein MT-Bündel in den Hyphen erkannt (**Abb. 16**). Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um dieselbe MT-Subpopulation handelt, die auch durch UncA<sup>rigor</sup> bevorzugt wird. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein von Detyrosinierung als MT-Modifikation in *A. nidulans*. Direkte Beweise sollen nun in einem Parallelprojekt durch biochemische Analysen von Tubulinaufreinigungen erbracht werden, die zur konkreten Identifizierung der Modifikation des C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin führen sollen.

In Neuronen von Mäusen wurde weiterhin beobachtet, dass nicht Detyrosinierung, sondern Polyglutamylierung als eine Art "Verkehrssignal" für das Kinesin-3 KIF1 fungiert und dieses gezielt in Neuriten navigiert (Ikegami *et al.*, 2007). Ein struktureller Mechanismus konnte aber auch hier nicht postuliert werden. Demnach scheint zumindest die Spezifität der Kinesin-3 Motoren für posttranslational modifizierte MT evolutionär konserviert zu sein. Noch komplexer wird das Bild, wenn man die kürzliche Beobachtung berücksichtigt, dass sich die Modifikationsart während der Entwicklung sogar ändern kann. So kommt es beispielsweise bei der Polarisierung von Epithelzellen zu einem Wechsel von Detyrosinierung zu Acetylierung (Quinones *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit konnte nun nicht wie erwartet in der Motordomäne, sondern im Schwanzbereich des Kinesin-3 Motors UncA mit Hilfe von systematischen Deletionsexperimenten eine Region (MTB-Domäne) identifiziert und charakterisiert werden, die in der Erkennung dieser MT-Subpopulation in den Hyphen von *A. nidulans* involviert ist (**Abb. 8**). Diese Domäne zeichnet sich durch eine starke positive Ladung aus und einzelne Aminosäuren sind von den Pilzen bis zum Menschen konserviert (**Abb. 12**). Leider gibt es für den Schwanzbereich von Kinesin-3 Motoren bislang keine strukturellen Daten um Anhaltspunkte auf die Funktion ableiten zu können, denn bisher wurde lediglich die Motordomäne allein und deren Bindungsverhalten an MT untersucht (Marx *et al.*, 2009).

Um die strukturelle Funktion dieser 86 Aminosäuren in der Spezifitätserkennung näher zu untersuchen, wurden anschließend verschiedene potentielle Mechanismen in Betracht gezogen. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass die MTB-Region direkt mit der Motordomäne interagiert und somit die Information der MT-Modifikation in Form eines

regulatorischen Elements weitergibt. Eine solche direkte Interaktion zwischen Kopfdomäne und Schwanzbereich wurde für Kinesin-1 nachgewiesen (Dietrich *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass die N-terminalen regulatorischen Elemente im Schwanz direkt mit den C-terminalen *coiled coil* Regionen der Kinesin-1 Motordomäne interagieren, was zu einer erhöhten ATPase Aktivität des Kinesin-1 führt. Ein Zusammenhang zu PTM wurde hier jedoch nicht untersucht. Die Möglichkeit dieses Mechanismus für die Determinierung der Spezifität in UncA wurde mittels Y2H- Interaktionstest in dieser Arbeit untersucht. Es konnte jedoch keine Interaktion zwischen Motor und dem Schwanz des Kinesins im Hefesystem nachgewiesen werden.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich hierbei um einen Mechanismus handelt, bei dem die Motordomäne UncAs die Bewegung und Direktionalität vermittelt, die positiv geladene MTB- Region im Schwanz des Kinesins jedoch selektiv die Modifikation des negativ geladenen C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin direkt erkennen und binden kann. Die Hypothese der direkten Schwanz- Tubulin- Interaktion konnte mit Hilfe von Y2H- und BiFC- Analysen untermauert werden (**Abb. 15**). Die Schwanzregion, welche die positiv geladene MTB- Region enthält, kann demnach direkt mit den beiden  $\alpha$ -Tubulinen, TubA und TubB, interagieren und reguliert so möglicherweise die selektiven Transportvorgänge UncAs. Eine solche MT- Bindestelle im Schwanzbereich wurde auch für Kinesin-1 beschrieben (Hackney & Stock, 2000; Seeger & Rice, 2010). Diese dort ermittelte 19 Aminosäure lange Sequenz enthält auch einige Argininreste wie die MTB- Region, ist aber nicht homolog zu deren Sequenz.

Daraufhin wurde mit Hilfe von Y2H- Analysen versucht, die Interaktionsdomäne mit den  $\alpha$ -Tubulinen weiter einzugrenzen, jedoch konnte beispielsweise die MTB- Domäne allein mit und ohne die PH- Domäne, die die Cargobindung vermittelt, nicht mehr mit den  $\alpha$ -Tubulinen interagieren. Daraus kann geschlossen werden, dass für die Funktion der MTB- Region möglicherweise die strukturelle Einbettung in die restliche Region des Kinesins für dessen Funktion notwendig ist. Es könnte aber auch zu Fehlfaltungen dieser verkürzten UncA- Konstrukte gekommen sein, da im Hefesystem alle Proteine durch die Fusion mit den Transkriptionsfaktorhälften künstlich in den Kern transportiert werden.

Ein interessanter Punkt, der die Rolle der MTB- Domäne unterstreicht, ist, dass GFP-UncA<sup>ohne MTB</sup> ohne die künstliche *rigor* Mutation keine Lokalisierung in Form von Vesikeln zeigt, wie es für das vollständige Kinesin beschrieben wurde (Fischer & Zekert, 2009). Stattdessen ist ein zytoplasmatisches Hintergrundrauschen zu sehen, was darauf hindeutet, dass die MTB- Region nicht nur für die Erkennung der MT- Subpopulation, sondern auch für die Funktionalität von UncA selbst essentiell ist. Auch auf Kolonieebene ist der Funktionsverlust durch die MTB- Deletion sichtbar, denn die Stämme ohne MTB- Domäne wachsen ebenso kompakt wie die *uncA* Deletion. Die gezielte Deletion anderer Domänen im

UncA führte aber nicht zu einem Verlust der MT- Spezifität, was die signifikante und einzigartige Rolle der MTB- Region in UncA erneut unterstreicht.

Interessanterweise scheint das Transportgut UncAs nicht an der Vermittlung der MT- Spezifität beteiligt zu sein, da die gezielte Deletion der PH- Domäne, die die Bindung membranöser Vesikel vermittelt, nicht zu einem Verlust der Spezifität des UncA<sup>rigor</sup>- Fusionsproteins führt (**Abb. 13**). Im Vergleich dazu gibt es Hinweise, dass die Transportvesikel des Säuger Kinesin-1 möglicherweise in die Erkennung modifizierter MT involviert sind (Setou *et al.*, 2002).

Analysen mit chimären Motorproteinen, die aus verschiedenen Motoren und Schwanzteilen aus unterschiedlichen Kinesinen kombiniert wurden, zeigten, dass die Schwanzregion ausreicht, die Spezifität auch in anderen Kinesinen erzeugen zu können (**Abb. 14**) und bestätigten, dass die Motordomäne von UncA allein nicht die Spezifität erfassen kann.

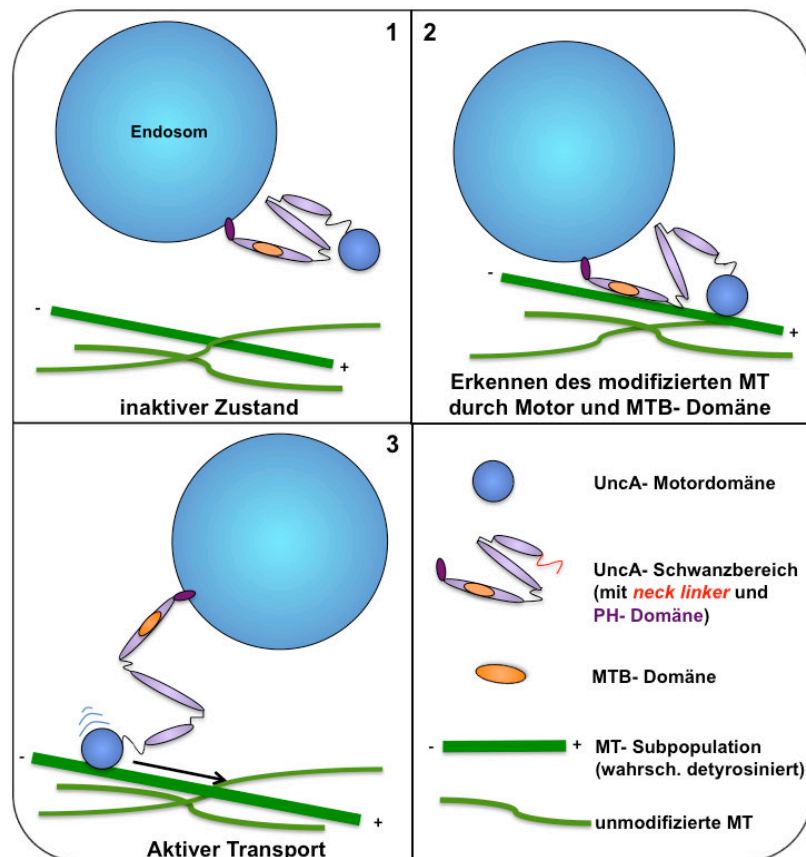
Interessant wäre auch die gezielte Deletion des homologen Bereichs in *N. crassa* Nkin2, der für die MTB- Region in UncA kodiert. Bei einem Verlust der Spezifität von Nkin2<sup>rigor</sup>, kann davon ausgegangen werden, dass wahrscheinlich auch der strukturelle Mechanismus der Erkennung der MT- Spezifität in den beiden Ascomyceten konserviert ist.

### 1.3. Der *neck linker* wird als strukturelles Element für die MT- Bindung benötigt

Anhand der Deletionsuntersuchungen des UncA Proteins konnte auch beobachtet werden, dass der sogenannte *neck linker*, ein mechanisches Element von den Aminosäuren 379-386, welches die Motordomäne mit dem Schwanzteil oder anderen Kinesinköpfen im Falle von Dimeren verbinden kann (Hirokawa *et al.*, 2009), für die Bindung von UncA an MT notwendig ist. Diese Ergebnisse bekräftigen Untersuchungen des *C. elegans* kinesin-3 Unc104. Denn es wurde gezeigt, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Dimerisierung *in vitro* mit Hilfe von zwei kurzen helikalen Domänen, die sich direkt carboxyterminal vom *neck linker* befinden, kommt (Tomishige *et al.*, 2002). Der *neck linker* des Kinesins-1, KIF5C, kann funktionell und strukturell mit Hilfe des Kinesin-3 KIF1A ersetzt werden (Nitta *et al.*, 2008). Es wurde auch beschrieben, dass der Kinesin-3 Motor Nkin3 in *N. crassa* als Dimer vorliegt, jedoch einen der Motorköpfe für nicht- prozessive Bewegungsvorgänge inaktiviert (Adio *et al.*, 2006). Drei Jahre später konnten Adio und Woehlke zeigen, dass der *neck linker* für die Dimerisierung und damit auch für die Nkin3 Funktion essentiell ist. Demnach ist der *neck linker* ein strukturelles Element, das dem Motor zur Dimerisierung verhilft oder zur korrekten Funktion notwendig ist (Adio & Woehlke, 2009) und ist auch im *A. nidulans* Kinesin-3 UncA unerlässlich für die korrekte Faltung und Funktion und damit einhergehend das korrekte Binden an die polymerisierten Tubuline.

### 1.4. Ein Modell zur Erkennung der modifizierten MT durch UncA

Die in dieser Arbeit gewonnen Einblicke in die Erkennung der MT- Subpopulation von UncA wurden in einem ersten Modell zusammengefasst (**Abb. 52**). Das Andocken des Vesikels an das Kinesin selbst als Aktivierungsmechanismus ist umstritten, in dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Cargobindung zumindest nicht an der Vermittlung der MT-Spezifität beteiligt ist. Nachdem die Motordomäne den MT gebunden und die in die Schwanzregion eingebettete MTB- Domäne die Modifikation des Tubulus erkannt hat, kommt es, möglicherweise mit Hilfe struktureller Konformationsänderungen im *neck linker* zu einer Aktivierung des Motors und somit zum (+) Ende gerichteten Transport der Cargos. Aufgrund der vereinfachten Darstellung wurde auf die bis zu fünf an einem Endosom sitzenden Kinesin-3 Motoren verzichtet (Schuster *et al.*, 2011b). Weiterhin wurde die Möglichkeit einer konzentrationsabhängigen Dimerisierung des Kinesin-3 Motoren mit Hilfe der *neck linker* Region in dem Modell nicht beachtet (Tomishige *et al.*, 2002), da es hierfür in UncA bisher keine Hinweise gibt.



**Abbildung 52.: Modell der Erkennung der modifizierten MT- Subpopulation durch die MTB- Domäne in der Schwanzregion des Kinesin-3 UncA.** Das Andocken des Cargos mit Hilfe der PH- Domäne allein sorgt noch nicht für einen MT- spezifischen Transport (1). Das Binden der modifizierten MT- Subpopulation, die wahrscheinlich detyrosiniert ist, erfolgt sowohl durch die Motor- als auch durch die MTB- Domäne. Die MTB- Domäne wiederum vermittelt die selektive Erkennung der PTM (2). Anschließend kommt es zur Aktivierung des Kinesins, welche möglicherweise durch strukturelle Konformationsänderungen des *neck linker* übersetzt wird (3). Der selektive Transport erfolgt in Richtung (+) Ende des modifizierten MT.

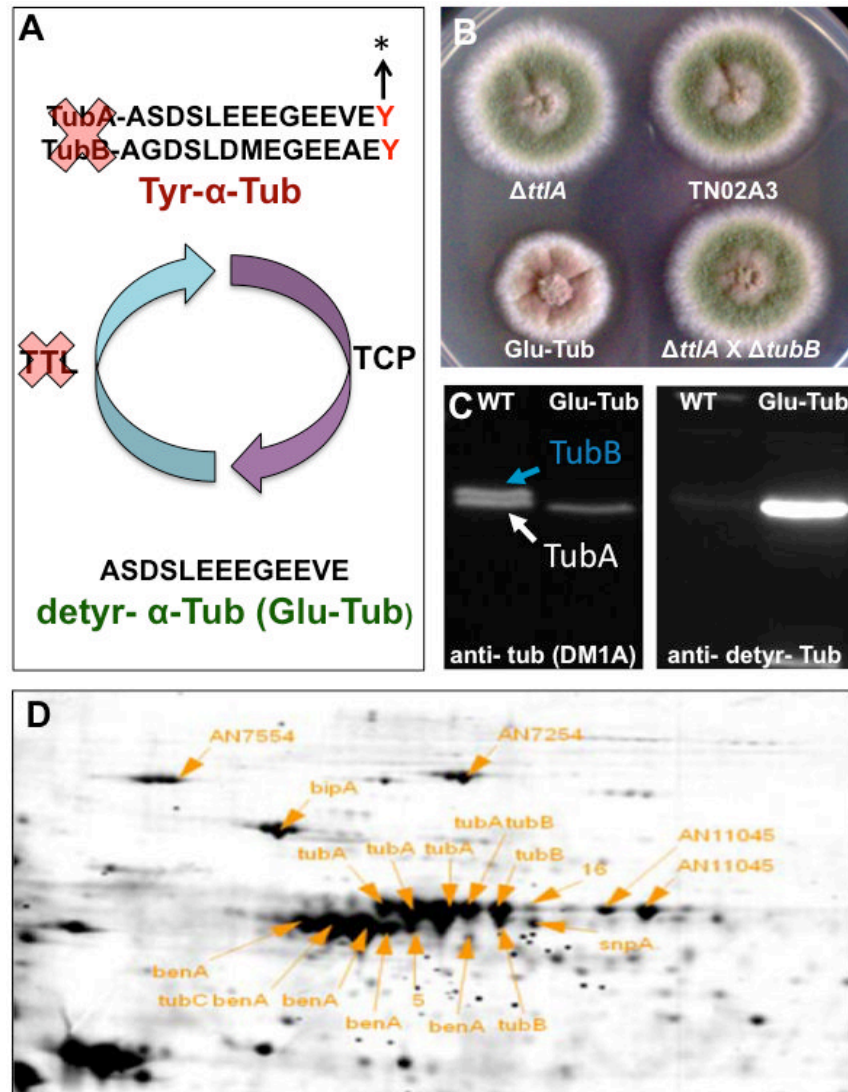
### 1.5. Ist die MT- Modifikation, die durch UncA erkannt wird artifiziell oder tatsächlich eine posttranslationale Modifikation?

Ob PTM tatsächlich in *A. nidulans* existieren, konnte bisher nur mit indirekten Ergebnissen gezeigt werden. Dazu zählen die Immunfärbungen mit anti- tyrosinierten Antikörpern, die in der Interphase an alle MT, aber während der Mitose selektiv die Mitosespindel in den Hyphen gebunden haben. Interessanterweise wurde das einzelne, durch UncA<sup>rigor</sup> erkannte, MT-Bündel während der Mitose aber nicht markiert (**Abb. 6**) (Zekert & Fischer, 2009). Es wurde postuliert, dass diese in der Mitose intakt bleibende MT- Subpopulation einen evolutionären Vorteil bringt, da so der Langstreckentransport von Vesikeln entlang des MT-Bündels, das gesamte Hyphenkompartiment durchspannend, auch während der Mitose aufrechterhalten bliebe. Das Untersuchen des Verhaltens der Cargos von UncA gerade während der Mitose könnte hier etwas Licht ins Dunkle bringen.

Weiterhin konnte auch durch Expression von GFP-UncA unter dem natürlichen Promotor gezeigt werden, dass sich die GFP- markierten Vesikel vorrangig entlang eines MT bewegten (Zekert & Fischer, 2009). Mit Hilfe der künstlich in die Motordomäne von KinA<sup>rigor</sup> eingebrachte  $\beta$ 5L8- Schleife konnte die gleiche Spezifität hervorgerufen werden wie mit UncA<sup>rigor</sup> (**Abb. 16**).

Es wurde in unserer Gruppe in einem Parallelprojekt mit Hilfe von drei verschiedenen Mutationen ein Stamm erzeugt, der artifiziell nur noch "Glu- Tubulin" (detyrosiniertes Tubulin) exprimieren sollte. Hierfür wurde zuerst in einem *A. nidulans* Stamm die putative Tubulin-Tyrosin- Ligase, TtlA, und dann das nicht essentielle  $\alpha$ -Tubulin TubB deletiert. Anschließend wurde in dem verbliebenen  $\alpha$ - Tubulin, TubA, künstlich mit Hilfe eines vorzeitigen Stoppkodons das terminale Tyrosin deletiert. Western Blot- Analysen von diesem Stamm mit einem selbst hergestellten Antikörper gegen detyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin aus *A. nidulans* zeigten, dass dieser Stamm hier ein deutlich stärkeres Signal aufweist, als der Wildtyp. Der "Glu- Stamm" zeigt einen sehr starken Phänotyp (**Abb. 53 A-C**) (N. Zekert, unveröffentlicht).

Auch konnte in unseren 2D- Gelen immunhistologisch gezeigt werden, dass es für die Tubuline mehrere Spots gibt, wie es bei der Existenz von PTM erwartet wird, da sich durch die Modifikation die Ladung der Proteine verändert. Es gibt anhand der biochemischen und immunhistochemischen Ergebnisse Grund zur Annahme, dass es in *A. nidulans* zu einer zusätzlichen Polyglutamylierung der Tubuline kommen könnte (persönl. Mitteilung S. Herrero de Vega) (**Abb. 53 D**). Aber auch hier konnte der C-Terminus der einzelnen Spots in massenspektrometrischen Analysen nicht identifiziert werden. Demnach ist die Existenz der PTM in *A. nidulans* wahrscheinlich, aber nicht endgültig bewiesen. Auch die Tatsache, dass Nkin2<sup>rigor</sup> ebenso wie UncA<sup>rigor</sup> spezifisch ein Bündel bevorzugt suggeriert einen evolutionär konservierten Mechanismus, den es auch in *N. crassa* spezifisch auf PTM zu untersuchen gilt.

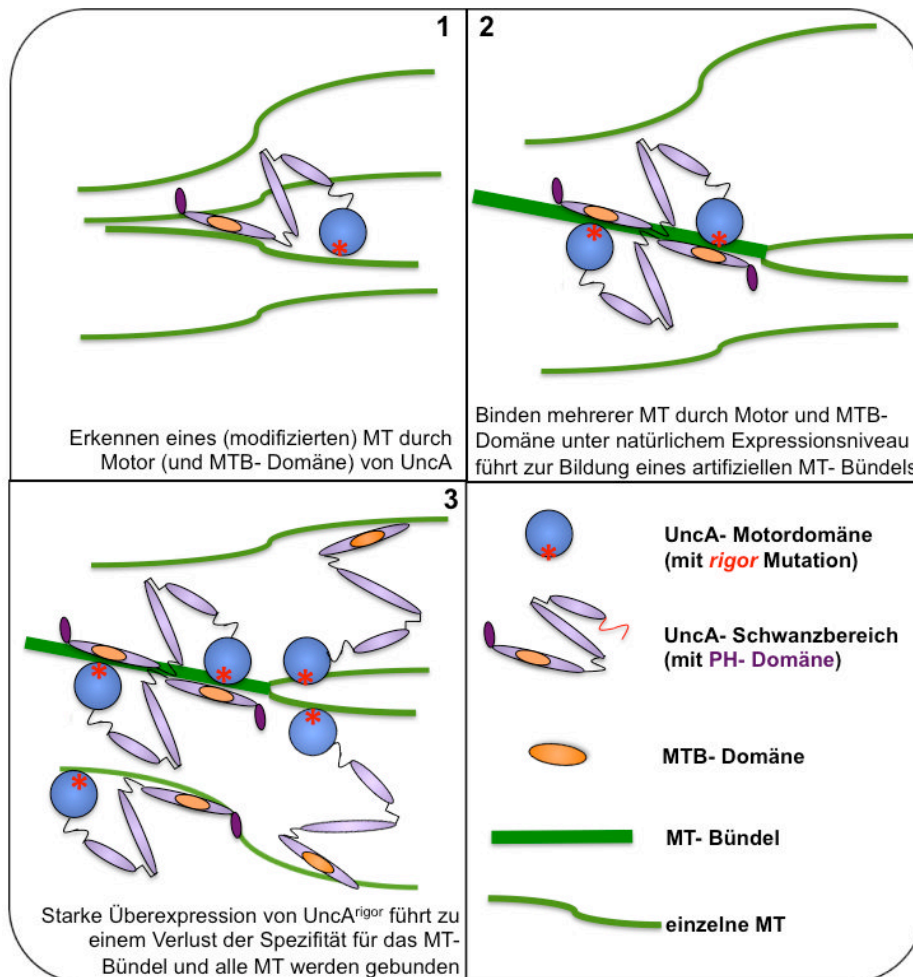


**Abbildung 53: Hinweise auf PTM in *A. nidulans*.** (A) Schema des Tyrosinierungs- und Detyrosinierungszyklus der  $\alpha$ -Tubulins. Die schrittweisen Deletionen zur Generierung des "Glu-Stammes" wurden rot markiert. (B) Wachstumsvergleich zwischen dem künstlich hergestellten "Glu- Stamm", der nur noch detyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin exprimiert, Wildtyp und den Mutanten, die die einzelnen Deletionen tragen. Die einzelnen Mutationen der Tubuline resultieren demnach nicht in dem starken Phänotyp des Glu- Stammes (N. Zekert, unveröffentlicht). (C) Western Blot mit dem kommerziellen Antikörper DM1A, der alle  $\alpha$ -Tubuline erkennt, zeigt, dass im Glu-Stamm lediglich TubA exprimiert wird (rechts). Western Blots mit den spezifischen anti- Glu-Antikörpern offenbaren, dass in dem Glu- Stamm tatsächlich lediglich detyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin exprimiert wird, wohingegen der Anteil dieser im Wildtyp deutlich geringer ist (links) (N. Zekert, unveröffentlicht). (D) Ein 2D- Gel bestätigt die Existenz von Polyglutamylierung (P. Hortschanski und S. Herrero de Vega, unveröffentlicht).

Die bisher erhaltenen Daten bezüglich der Modifizierung der MT- Subpopulation sind aber auch kritisch zu sehen, da es sich bei der *rigor* Mutation um eine künstliche Modifikation handelt, die so in Kinesinen der Zelle nie auftritt. Es wäre durch das permanente Binden des mutierten Kinesins möglich, dass es zu einer künstlichen Bündelung der UncA- assoziierten MT kommen könnte. Dies erklärt aber nicht, warum die anderen Kinesine wie KinA und KipA mit der *rigor* Mutation an alle MT binden können. Einen konzentrationsabhängigen Verlust der UncA<sup>rigor</sup> Spezifität bei Überexpression wurde bereits in meiner Diplomarbeit beobachtet



(Seidel, 2009). Demnach könnte das Expressionslevel der Kinesine die Spezifität mit beeinflussen. Ein Modell visualisiert die mögliche artifizielle Bündelung durch  $UncA^{rigor}$  und deren mögliche konzentrationsabhängige MT- Spezifität (**Abb. 54**). Eine solche Bündelung wurde schon für das Kinesin-1 beschrieben, welches in *Drosophila* und *Xenopus* MT- MT- Gleiten vermittelt (Jolly *et al.*, 2010). Dieser Prozess soll dem Transport von langen und kurzen MT- Filamenten dienen und so zur Aufrechterhaltung der Zellform beitragen. In dieser Arbeit konnte jedoch mit den chimären Motoren, welche alle unter der Expression des natürlichen *uncA* Promotors reguliert waren, beobachtet werden, dass trotzdem mehrere MT gebunden wurden, was die konzentrationsabhängige Bündelungshypothese nicht stützt. Und selbst wenn es zu einer Bündelung käme, warum dann spezifisch dieses eine MT- Bündel, wohingegen die anderen Kinesine dann alle bündeln würden?



**Abbildung 54: Ein weiteres Modell, was die artifizielle Bündelung durch die *rigor* Mutation in *UncA* erklären könnte. (1) *UncA* erkennt mit Hilfe des Motors und der MTB- Domäne einen MT. (2) Durch die Tubulin- Interaktion mit weiteren benachbarten MT durch *UncA* kommt es zur Bündelung dieser zu der prominenten in Zekert & Fischer (2009) beschriebenen MT- Subpopulation. (3) Bei Überexpression von  $UncA^{rigor}$  werden möglicherweise alle MT gebunden, aber nicht mehr so gebündelt, wie der anfangs von *UncA* gebundene MT.**

Der *in vivo* Hinweis durch  $\beta 5L8$ - Schleife für detyrosinierte MT ist auch kritisch zu begutachten, da zwar in Neuronen gezeigt wurde, dass Kinesin-1 mit diesem Motiv selektiv

detyrosinierte MT erkennen kann, aber dies nicht zwangsläufig bedeutet, dass dies in *A. nidulans* auch der Fall ist, zudem handelt es sich auch hier um eine artifizielle Modifikation. Es könnte sein, dass es durch diese Modifikation in der Motordomäne zu einer drastisch verringerten Affinität des Kinesins für MT kommt und dadurch das prominente Bündel, welches auch durch UncA<sup>rigor</sup> bevorzugt wird, eine höhere Wahrscheinlichkeit des Erkennens durch das Kinesin aufweist und daher bevorzugt gebunden wird. *In vitro* Affinitätsmessungen der verschiedenen Kinesine und deren korrespondierenden Mutanten mit aufgereinigtem  $\alpha$ -Tubulin (detyrosiniert und tyrosiniert) könnten diese Fragen klären. Es wäre nämlich auch möglich, dass UncA eine geringere MT- Affinität hat und daher vornehmlich ein Bündel an MT bevorzugt. Dies passt jedoch nicht mit der Beobachtung, dass UncA mit bis zu 4  $\mu\text{m}$  pro Sekunde mit zu den schnellsten Kinesine in Pilzen gehört (Zekert & Fischer, 2009). Solche Bewegungen erfordern ein perfektes Zusammenspiel zwischen Motor und Kinesin, die Spezifität wird somit kaum durch eine verringerte Affinität erklärt werden können.

Interessant ist auch, dass UncA<sup>rigor</sup> in dem "Glu- Stamm", der nur noch detyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin exprimiert, keinen Verlust der Spezifität zeigt, was angenommen wurde, da UncA<sup>rigor</sup> wahrscheinlich spezifisch detyrosinierte MT bevorzugt (Zekert & Fischer, 2009). Demnach ist eventuell eine weitere PTM in der UncA- Spezifität involviert oder der UncA<sup>rigor</sup> gebundene MT ist tatsächlich ein Artefakt, das durch die *rigor* Mutation hervorgerufen wird. Bisher konnte mit Hilfe der Analysen unserer Gruppe keine Rolle der putativen Tubulin-Tyrosin- Ligase TtlA in der Modifikation von Tubulin beobachtet werden (N. Grün, persönl. Mitteilung), demnach fehlt für den endgültigen Beweis der PTM in *A. nidulans* noch immer ein *in vivo* Ergebnis, wie beispielsweise die Sequenzierung des C- Terminus des Tubulins oder die Identifikation beteiligter Enzyme.

In Zukunft wird es eine große Herausforderung sein, die genauen strukturellen Mechanismen der Motorproteine zur Unterscheidung der verschiedenen MT- Populationen zu klären. Ebenso ist es essentiell im Detail zu verstehen, wie PTM dazu beitragen, die Motorproteine zu navigieren. Weiterhin wird es unerlässlich sein, die PTM in *A. nidulans* biochemisch zu belegen, denn bisher konnte nicht ganz sicher ausgeschlossen werden, dass es durch die *rigor* Mutation zu einer artifiziellen Bündelung der MT oder einer Veränderung anderer Natur kommen könnte, die zu dem Binden des starren MT durch UncA<sup>rigor</sup> führt. Viele Fragen sind weiterhin offen, das Motiv in UncA, welches die potentielle Modifizierung erkennt, konnte in dieser Arbeit spezifisch charakterisiert und ein Mechanismus der direkten Tubulininteraktion postuliert werden.

## 2. Dem Transportgut von Kinesin-3 ein Stück näher - neu identifizierte Interaktoren von UncA

Um die Funktion von UncA und den Grund zu verstehen, warum es sich entlang von einem Bündel modifizierter MT bewegt, welches gerade während der Mitose stabil bleibt, wohingegen die übrigen MT- Populationen disassemblieren und die mitotische Spindel bilden, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit.

Dass Kinesin-3 Motoren in höheren Eukaryoten spezifisch in Neuronen synaptische Vesikelvorläufer transportiert, welche unter anderem Synaptophysin, Synaptotagmin und Rab3A enthalten, ist schon länger bekannt (Bloom, 2001; Okada *et al.*, 1995). Liprin- $\alpha$ , ein multimodulares Strukturprotein, fungiert in Neuronen als ein KIF1A- Rezeptor, der verschiedene Liprin-  $\alpha$ - assoziierte Proteine mit dem Kinesin verbindet und so deren Transport direkt vermittelt (Shin *et al.*, 2003). Die molekularen Grundlagen der Prozessivität und Bewegung von Kinesin-3 Motoren sind seit Langem Gegenstand intensiver Studien, jedoch ist vergleichsweise wenig über das Transportgut selbst bekannt.

In filamentösen Pilzen konnte gezeigt werden, dass Kinesin-3 Motoren Endosomen entlang von MT zu deren (+) Ende transportiert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Zekert & Fischer, 2009; Schuster *et al.*, 2011c). Kolokalisierungsstudien mit FM4-64, mRFP-TlgB, einem frühen Endosomenmarker, und GFP-UncA zeigten, dass nicht alle durch GFP-UncA markierten Vesikel mit den roten endosomalen Signalen korrelierten, was bedeutet, dass UncA nicht nur mit Endosomen assoziiert ist (Zekert & Fischer, 2009).

Um die Inhalte der Vesikel, die von UncA transportiert werden, zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht mit Hilfe einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation ein Protokoll zur Anreicherung dieser Vesikel zu etablieren. Das Protokoll wurde vorher erfolgreich zu der Anreicherung von Chitosomen in *N. crassa* angewendet (Verdín *et al.*, 2009). GFP-UncA konnte mit einem basalen Level in allen 20 Fraktionen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die UncA- assoziierten Vesikel eher heterogener Natur sind und nicht in einzelnen spezifischen Banden des Dichtegradienten akkumulieren. Massenspektrometrische Analysen offenbarten, dass sich in den beiden beobachteten Peaks der UncA- Konzentration in niedrigeren Dichten um die Fraktionen 5-7 und in höherer Dichte (Fraktionen 17-19) vorrangig zytoplasmatische Proteine und ribosomale Komponenten befinden (**Abb. 37**). Das zeigt zum einen, dass es möglicherweise während des Aufschlusses und Probenvorbereitung zur Bildung artifizieller membranöser Vesikel gekommen sein könnte und andererseits dass in Fraktionen höherer Dichte vorrangig Proteine der Ribosomen angereichert werden, die auch nicht zwangsläufig mit UncA assoziiert sein müssen. Es wird davon ausgegangen, dass die Diversität der Endosomen auch dem Modifizieren der Methode, beispielsweise durch das Verändern des

Gradienten, des Zellaufschlusses oder der Zentrifugationsschritte, so nicht spezifisch angereichert werden können.

### 2.1. Rab3 definiert Vesikel für UncA- abhängigen Transport

Jedes Organell und jede Vesikelpopulation muss seine charakteristische Struktur, biochemische Zusammensetzung und Funktion aufrecht erhalten. Gerade in den Exo- und Endozytoseprozessen herrscht ein steter Fluss von Proteinen und Membranen, den es mit Hilfe von Adaptoren und anderen Komponenten zu regulieren und kontrollieren gilt (Grosshans *et al.*, 2006). Hierbei fungieren Exozytoseprozesse zur Sortierung der im Endoplasmatischen Retikulum neu produzierten Proteine durch den Golgi-Apparat bis zur finalen Station in Vakuolen oder der Plasmamembran hin. Endozytose ist wiederum für die Aufnahme von Nährstoffen und der Internalisierung von Rezeptoren zum Recyceln oder Degradieren notwendig. In Form von frühen Endosomen werden die Komponenten importiert und danach mit Hilfe von Rab-GTPasen definiert, ob diese als späte Endosomen zur Vakuole transportiert und dort degradiert werden, oder zu Recycling-Endosomen, die erneut zur Plasmamembran transferiert werden (Geli & Riezmann, 1998; Behnia & Munro, 2005). Die erwähnten Rab-GTPasen funktionieren dabei als molekulare Schalter, die den Verkehr der membranösen Vesikel regulieren können.

Es gibt Hinweise, dass in *U. maydis* Endosomen in die Koordinierung der Zellteilung und -septierung involviert sind (Schink & Böcker, 2009). In filamentösen Pilzen wurde gezeigt, dass nicht nur Exozytose, sondern auch Endozytose für das polare Wachstum wichtig sind (Araujo-Bazan *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay & Shaw, 2008).

In *A. nidulans* konnten die beiden Rab5 Homologe, RabA und RabB, spezifisch frühen Endosomen zugeordnet werden (Abenza *et al.*, 2009; Abenza *et al.*, 2010), wohingegen das Rab7, RabS, in Vakuolen und kleinen Strukturen lokalisiert und in der Reifung von Endosomen zu späten Endosomen, welche letztendlich mit der Vakuole fusionieren, involviert ist (Abenza *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurde die Rolle zweier Rab3- Proteine, SrgA (*S. cerevisiae* SEC4 Homolog) und SrgB (*S. cerevisiae* Ypt1 Homolog), im Zusammenhang mit der Vermittlung von Kinesin-3 Cargos untersucht, wie es in Neuronen gezeigt werden konnte (Niwa *et al.*, 2008). Bekannt ist, dass Sec4 in *S. cerevisiae* den polaren Transport von sekretorischen Vesikeln reguliert, welcher in Hefe entlang von Aktinkabeln mit Hilfe von Myosin erfolgt (Walch-Solimena *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass *S. cerevisiae* Ypt1 in zwei Schritten der Sekretion beteiligt ist, zum einen am ER- Golgi-Transport, zum anderen dem Transport zwischen den einzelnen Golgikompartimenten (Jones *et al.*, 1998; Sacher *et al.*, 2008). Demnach wäre eine Interaktion der Rab3- Homologe mit UncA ein Hinweis auf eine bisher nicht beschriebene Rolle des Kinesin-3 Motors in der Sekretion von *A. nidulans*.

Es konnte mit Hilfe von Experimenten als Ergebnis dieser Arbeit beobachtet werden, dass es sich in *A. nidulans* nicht um einen DENN/MADD vermittelten konservierten Mechanismus wie in Neuronen handelt (Niwa *et al.*, 2008), sondern die Anbindung an diese Vesikel direkt über die Kinesin-3/Rab3 Interaktion reguliert wird (**Abb. 20**). Die Interaktion der Rab3- Homologe mit UncA konnte mit Hilfe von Y2H- Untersuchungen und BiFC- Analysen untermauert werden. Da die Interaktion am Apex am prominentesten erscheint, ist davon auszugehen, dass sich dort auch die meisten Interaktionen abspielen. Hierbei muss aber auch beachtet werden, dass es durch Überexpression UncAs durch den *alcA* Promotor zu Akkumulationen von UncA an der Hyphenspitze kommt (Zekert & Fischer, 2009). Daher sollte die Rab3/UncA Interaktion im BiFC- System mit der jeweiligen Expression unter dem natürlichen Promotor wiederholt werden, so könnten genauere Lokalisierungsstudien der Interaktion erfolgen, aus denen abgeleitet werden könnte, welche spezifische Rolle die Interaktion mit UncA in der Sekretion spielt. Ob die beiden Rab3 Homologe tatsächlich auch in *A. nidulans* in Sekretionswegen involviert sind, muss auch bestätigt werden.

Weiterhin unklar bleibt die Rolle der beiden, erstmals in dieser Arbeit beschriebenen DENN/MADD Homologe RefA und RefB. Dass beide in der polaren Wachstumsmaschinerie involviert sind, wird deutlich, wenn man die jeweiligen Deletionsmutanten betrachtet, da es hier zu reduzierter Koloniegröße und Sporenanzahl, sowie einer gestörten Hyphenmorphologie in Form von Schwellungen kommt (**Abb. 18**). Jedoch konnte eine wie in Neuronen beschriebene Adaptorrolle zwischen Kinesin-3 Motoren und Rab3-GTPasen nicht verifiziert werden. Lokalisierungsanalysen von Polaritätsfaktoren, wie beispielsweise Zellendmarkern, in den *refA* und *refB* Deletionsmutanten könnten weitere Hinweise auf deren Funktion geben. In höheren Eukaryoten wurde beschrieben, dass DENN/MADD Proteine in Rab- vermittelten Prozessen oder an der Regulierung von MAPK Signalwegen involviert sind (Levir *et al.*, 2001). Demnach wäre eine Lokalisierung von anderen Rab- Proteinen und der Untersuchung deren GTP/GDP- Zustandes in den erwähnten Deletionsstämmen ein erster Schritt um zu untersuchen, ob Ref- Proteine auch in *A. nidulans* die Aktivität von Rab-GTPasen regulieren können.

## **2.2. UncA ist in Transporte während der Reifung sekretorischer Vesikel und deren finalen Transport zur Hyphenspitze involviert**

In einigen Fällen können Rab-GTPasen direkt mit den spezifischen Motorproteinen interagieren, wie es unter anderem in der vorliegenden Arbeit zwischen Rab3 und UncA gezeigt werden konnte, aber typischer ist die Vermittlung der Rab/Motor Interaktion mit Hilfe von zwischengeschalteten Proteinen (Grosshans *et al.*, 2006).

So spielt das Homolog von UsoA in *S. cerevisiae* eine essentielle Rolle in der Anbindung sekretorischer Vesikel, die sich vom ER abschnüren und an frühe Golgimembranen andocken (Cao *et al.*, 1998). In diesen vom ER abgeschnürten Vesikeln wurde auch Ypt1,

das *S. cerevisiae* Rab3 Homolog SrgB in *A. nidulans*, identifiziert (Cao *et al.*, 1998). Die direkte Interaktion zwischen UncA und SrgB wurde oben bereits beschrieben und konnte hier auch mit UsoA in BiFC- Analysen bestätigt werden (**Abb. 23**). Zusätzlich konnte eine Interaktion zwischen ErvA und UncA mit Hilfe von BiFC- Untersuchungen nachgewiesen werden. Das *S. cerevisiae* Homolog ERV29 ist im Sammeln sekretorischer Vesikel im ER involviert und packt diese zu transportfähigen COPII Vesikeln, welche dann zum Golgi-Komplex transportiert werden (Belden & Barlowe, 2001). Demnach scheint UncA schon an den frühen Transportprozessen anfänglicher Abschnürungsreaktionen von der ER- Membran für die Reifung sekretorischer Vesikel beteiligt zu sein.

Zusätzlich wurden drei weitere, potentiell sekretierte Proteine auf eine direkte Interaktion mit UncA hin untersucht. Zum einen BglA, eine  $\beta$ -Glukosidase mit und zum anderen zwei weitere Proteine ohne Signalpeptid, das Glukansynthase- Regulatorprotein (GlsA) und ChsB, eine Chitinsynthase. BiFC- Analysen bestätigten die Interaktionen mit den beiden Kandidaten ohne Sekretionssignalpeptid (**Abb. 24**), welche wie die meisten UncA- Interaktionen an der Hyphenspitze zu beobachten waren. BglA befindet sich möglicherweise im Innern der Vesikel und somit hat UncA keine Möglichkeit eine direkte Interaktion zu vermitteln, wohingegen die anderen beiden wahrscheinlich in den Membranen der Mikro- und Makrovesikel sitzen (Verdín *et al.*, 2009; Sanchez-Leon *et al.*, 2011). Y2H- Interaktionstests sollen diese Interaktionen zusätzlich bestätigen. Anhand dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass UncA unter anderem in Transportvorgängen von der ersten Abschnürung bis hin zum Transport der sekretorischen Vesikel beteiligt ist.

### 2.3. UncA ist auch an Exo- und Endozytosevorgängen beteiligt

Die Fusion der membranösen Vesikel mit der Zielmembran wird nicht nur durch Rab-GTPasen, sondern auch durch SNARE- Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) reguliert (Jena, 2011). In dieser Arbeit wurde TlgA, ein t-SNARE Protein, das die Fusion endosomal abgeleiteter Vesikel mit dem Golgi- Apparat vermittelt (Coe *et al.*, 1999) untersucht und eine Interaktion mit UncA and der Hyphenspitze konnte mit Hilfe von BiFC- Analysen beobachtet werden. UncA interagiert auch sehr stark mit SynA, einem v-SNARE, das erst zur Plasmamembran transportiert wird und dann durch Endozytose wieder internalisiert wird und wieder recycelt werden kann (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Valdez-Tauba *et al.*, 2004). Diese UncA- abhängigen Recyclingmechanismen in Form von Endosomen wurden in dieser Arbeit auch von dem Eisen- konzentrationsabhängigen Siderophortransporter SitB beobachtet (**Abb. 21**). Es ist zu konstatieren, dass das Kinesin-3 UncA wahrscheinlich unterschiedliche Endosomenpopulationen transportieren kann.

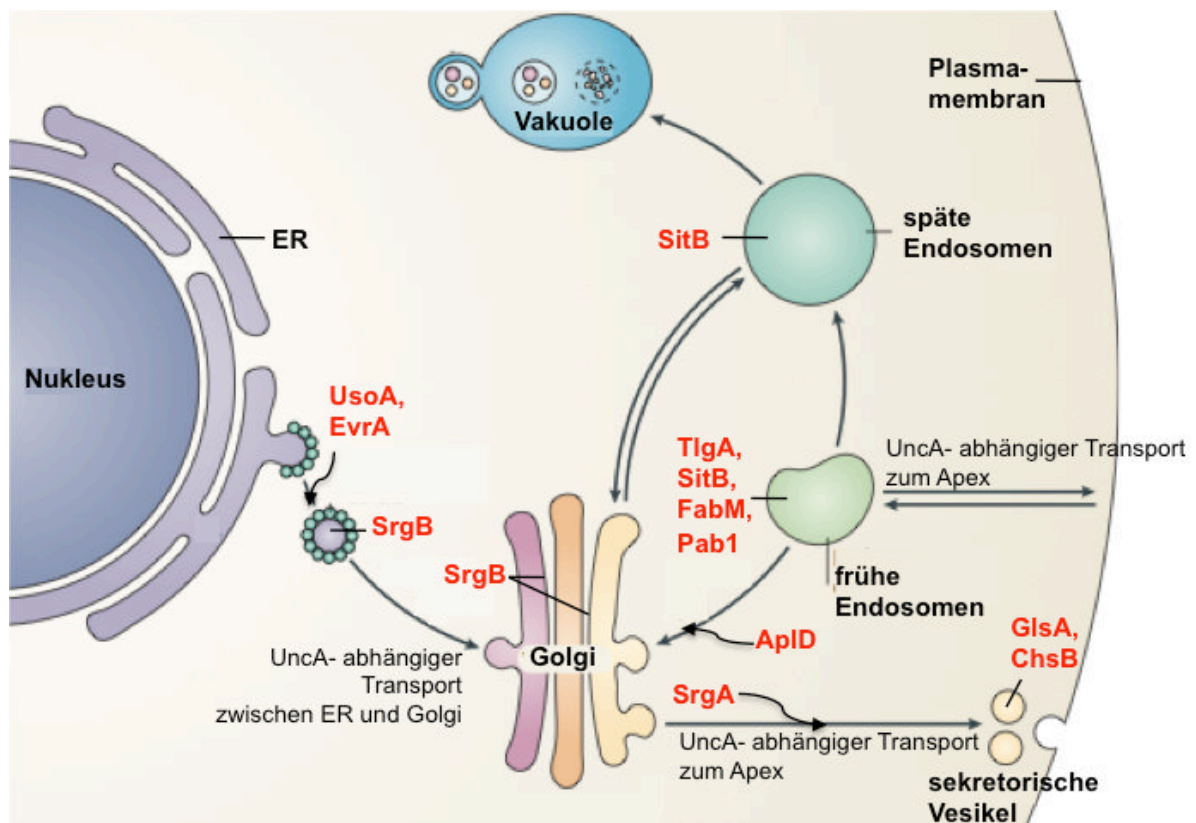
ApID, das *A. nidulans* Homolog des *S. cerevisiae* Apl4, welches als eine Komponente des AP1 Komplex beschrieben wurde, ist ein Adaptor, der in Chlathrin- vermitteltem Membrantransport und vorrangig an dem Transportprozessen von Endosomen zum Trans-

Golgi- Netzwerk (TGN) involviert ist (Ma *et al.*, 2009). Auch hier konnte mit Hilfe von BiFC eine Interaktion mit UncA beobachtet werden. Demnach ist UncA auch in bidirektionalen Transportprozessen zum Golgi- Aparat hin und zurück beteiligt.

Die meisten UncA- Interaktionen im BiFC spielen sich in der Region sehr nahe zur Hyphenspitze ab, wo sich auch der subapikale endozytotische Ring befindet und die Endosomen entstehen (Taheri-Talesh *et al.*, 2008) und es wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Interaktionen zu Teil auch um die sogenannte Dyneinladezone handelt, da hier die endozytierten Vesikel für den retrograden Transport auf Dynein geladen werden (Lenz *et al.*, 2006). Eine Differenzierung dieser beiden Strukturen wurde bisher nicht beschrieben.

#### 2.4. UncA- vermittelte Transportprozesse - ein zusammenfassendes Modell

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass UncA in zahlreichen zellulären Transportvorgängen wie ER- Golgi, Golgi- Endosomen, Endosomen- TGN und Endosomen- Langstreckentransport mitwirkt. Die in dieser Arbeit gesammelten Cargos und Adaptoren/ Rezeptoren von UncA wurden in einem Schaubild zusammengefasst (**Abb. 55**).



**Abbildung 55: Die Rolle UncAs in verschiedenen Transportprozessen in den Hyphen von *A. nidulans*.** Schon die Abschnürung vom ER bis hin zur Reifung im Golgi und anschließender Sekretion wird mit Hilfe von UncA- Transporten unterstützt. Auch frühe und späte Endosomen, sowie entsprechende Recyclingvesikel werden durch UncA gezielt transportiert. Die Verteilung von RNA durch UncA erfolgt wahrscheinlich gekoppelt an Endosomen. Abbildung wurde nach Barrowman *et al.*, 2010 modifiziert.

### 3. Kinesin-3 hat in verschiedenen Organismen eine konservierte Rolle

Für das *N. crassa* UncA Homolog Nkin2 wurde eine Rolle in der Mitochondrienmotilität beschrieben (Fuchs & Westermann, 2005). Interessant ist, dass innerhalb der Ascomyceten die Mechanismen des mitochondrialen Transports nicht konserviert sind. Während in *A. nidulans* und *S. cerevisiae* Mitochondrien entlang von Aktin transportiert werden (Oakley & Rinehart, 1985; Suelmann & Fischer, 2000), geschieht dies in *N. crassa* und *S. pombe* hingegen mit Hilfe von MT (Yaffe *et al.*, 1996; Fuchs *et al.*, 2002). Die beobachtete Rolle von Nkin2 im Mitochondrientransport konnte für das Homolog UncA in *A. nidulans* aber ausgeschlossen werden (persönl. Mitteilung N. Zekert). Ob Nkin2 nicht nur biochemisch mit Mitochondrien assoziiert, sondern diese Interaktion auch *in vivo* mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie zu sehen ist, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von Kolokalisierungsexperimenten mit GFP-Nkin2 und *MitoTracker* untersucht. Eine Kolokalisierung war aber kaum zu erkennen. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass Nkin2 in Form von Vesikeln entlang der Hyphen lokalisiert (**Abb. 39**), legten eine zusätzliche Rolle in dem Transport von Endosomen nahe, wie es für dessen Kinesin-3 Homologe UncA und Kin-3 aus *A. nidulans* und *N. crassa* gezeigt wurde. Dass UncA in *A. nidulans* Endosomen transportiert, wurde mit Kolokalisierungen von GFP-UncA mit mRFP-TlgB (einem EE- Marker) und FM4-64, deren Bewegungen in  $\Delta uncA$  deutlich reduziert waren, bestätigt (Zekert & Fischer, 2009). Die Rolle im endosomalen Transport wurde auch für das *U. maydis* Homolog Kin-3 beschrieben (Wedlich-Söldner, 2002; Schuchardt *et al.*, 2005).

Mit Hilfe von Kolokalisierungen mit Ypt-52, FM4-64 und Nkin2 konnte beobachtet werden, dass Nkin2 neben Mitochondrien auch mit Endosomen assoziiert ist. Nähere Charakterisierung der beiden in dieser Arbeit unabhängig voneinander hergestellten  $\Delta nkin2$  Stämme, die mit Hilfe von Genotypisierungs- PCRs und Southern Blot Analysen bestätigt wurden (**Abb. 46**), zeigten, dass die  $\Delta nkin2$  Homokaryen sowohl makro- als auch mikroskopische Wachstumsdefekte aufweisen. (**Abb. 47, 48**). Ursprünglich wurde von einer stärkeren Beeinträchtigung durch die Kinesin-3 Deletion ausgegangen, da das Ausschalten des Homologs UncA in *A. nidulans* zu einem kompakten Phänotyp führte (Zekert & Fischer, 2009).

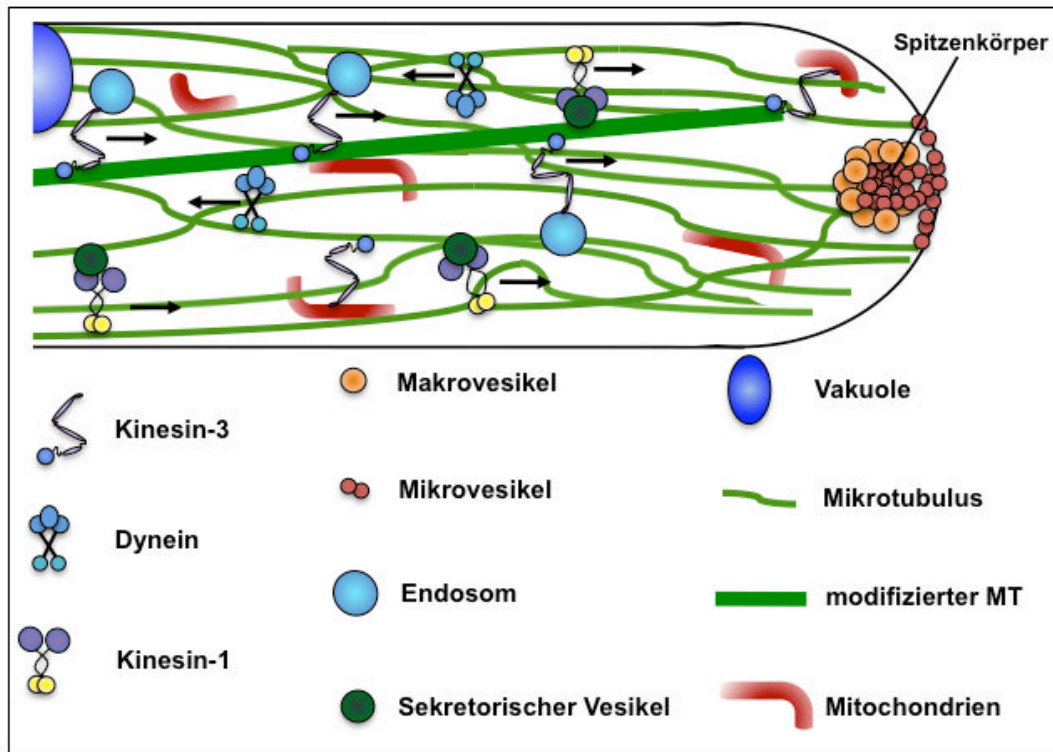
Obwohl sich die Endosomen und FM4-64 markierte Vesikel in der Deletion noch vereinzelt bewegen können, konnte hier gezeigt werden, dass  $\Delta nkin2$  Akkumulationen von Ypt52 markierten Endosomen an der Hyphenspitze aufweist. Dies ist auf den ersten Blick verwundernd, da es Kinesin-3 Motoren sind, die die Cargos erst zu den (+) Enden hin transportieren. Deswegen stellt sich die Frage, woher diese Akkumulationen stammen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Orientierung der MT in *N. crassa* nicht so spezifisch zum Apex hin gerichtet ist, wie es in *A. nidulans* und *U. maydis* beschrieben wurde (Lenz *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003), sondern gemischter Natur ist (Riquelme *et al.*, 2011; Mouriño-



Perez *et al.*, 2006). Außerdem wurde beobachtet, dass das Wachstum der Pilzhyphe andauert, auch wenn MT depolymerisiert werden, aber es kommt zu einer massiven Beeinträchtigung der Wachstumsrichtung (Horio & Oakley, 2005). Das bedeutet, dass MT für den Transport von Material zur Hyphenspitze in *N. crassa* nicht essentiell sind, aber notwendig um die Morphologie der Hyphen aufrechtzuerhalten. Bisher sind keine Daten über den MT- abhängigen Transport von Cargos in *N. crassa* verfügbar (Riquelme *et al.*, 2011). Diese Arbeit beschreibt jedoch erstmals den Kinesin-3 abhängigen Transport von Endosomen in *N. crassa* und unterstreicht die konservierte Rolle der Kinesin-3 Motoren in der endosomalen Motilität.

Die Doppeldeletion von Nkin und Dynein ist nicht lethal, sondern resultierte in einem additiven Phänotyp (Seiler *et al.*, 1999). Endozytoseprozesse waren in dieser Doppelmutante nicht beeinträchtigt, was durch FM4-64 Färbung gezeigt wurde. Die Abwesenheit von spezifischen Motoren in Mutanten wie *ro-1 und ro-3* (Dynein/ Dynaktin) und  $\Delta Nkin$  hat die antero- und retrograde Motilität von Zellkernen nicht beeinträchtigt und es wurde postuliert, dass der zytoplasmatische Fluss in Primärhyphen den entscheidenden Faktor in solchen Transportprozessen in *N. crassa* darstellen könnte (Ramos-García *et al.*, 2009). Diese Resultate zeigen, dass sich das gerichtete Wachstum innerhalb der filamentösen Pilze deutlich unterscheidet, allein durch morphologische Aspekte wie unterschiedliche Koloniebildungen, aber auch Wachstumsgeschwindigkeiten, die rein physikalisch unterschiedliche Mechanismen erfordern. Während in *N. crassa* viele Transportvorgänge zum Apex durch den enormen Zytoplasmafluss bewältigt werden können, ohne dass aktive Transportmechanismen notwendig sind, finden diese in *A. nidulans* und *U. maydis* aktiv durch Motoren statt (Ramos-García *et al.*, 2009; Xiang & Fischer, 2004; Steinberg *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit erzielten Resultate geben Anlass, dass das Kinesin-3, Nkin2, in *N. crassa* neben der Mitochondrienbewegung auch wie in anderen filamentösen Pilzen konservierte anterograde Transportprozesse von Endosomen vollzieht, wohingegen Nkin sekretorische Vesikel zum Apex hin transportiert. Der retrograde Transport wird durch Dynein gewährleistet, das unter anderem in Vesikel-, Mitochondrien- und Kernttransport involviert ist (Riquelme *et al.*, 2000; Seiler *et al.*, 1999; Ramos-García *et al.*, 2009). Die neu erzielten Ergebnisse in den motorabhängigen Transportprozessen von *N. crassa* wurden in einem vorläufigen Modell visualisiert (**Abb. 56**).



**Abbildung 56: Modell motorisch kontrollierter Transportvorgänge in *N. crassa*.** Kinesin-1, Nkin, transportiert sekretorische Vesikel anterograd in Richtung des Spitzenkörpers. Der Spitzenkörper selbst setzt sich aus mehreren äußeren Makro- und sich im Inneren befindenden Mikrovesikeln zusammen. Der Spitzenkörper reguliert das Abgeben von Vesikeln zur Zellwandsynthese und Sekretion. Kinesin-3 bewegt Endosomen anterograd in Richtung Hyphenspitze und Spitzenkörper; wohingegen Dynein verschiedene Organellen retrograd transportiert. Nkin2 bevorzugt in jungen Keimlingen und Verzweigungshyphen ein einzelnes MT- Bündel, welches vermutlich durch PTM stabilisiert wird. Die zusätzliche mitochondriale Assoziation zu MT wird in *N. crassa* durch Nkin2 gewährleistet (Fuchs & Westermann, 2005).

Demnach konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass Nkin2 trotz der bisher einzigartigen Mitochondrienbewegung auch Endosomen transportieren kann, wie es schon für die nah verwandeten filamentösen Pilze *A. nidulans* und *U. maydis* beschrieben wurde. Interessanterweise binden die *rigor* Varianten von UncA und Nkin2 spezifisch eine MT-Subpopulation, was erneut zeigt, dass das Verhalten der Kinesin-3 Motoren zwischen den beiden Ascomyceten sehr ähnlich ist.

Das Rätsel um die Modifikation und der Funktion dieser selektiven MT- Bindung in den Hyphen gilt es in der Zukunft zu lösen. Auch die biologische Relevanz für den bidirektionalen Langstreckentransport von Endosomen bleibt bisher ungeklärt und stellt eine Herausforderung dar, dies mit Hilfe gerade mit pilzlichen Modellsystemen erstmals zu klären.

# VI. Material und Methoden

## 1. Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten, wenn im Text nicht gesondert erwähnt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roche (Mannheim), Biozym (Hessisch Oldendorf), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), BioMol (Hamburg) Difco (Augsburg) und Stratagene (Amsterdam, NL). Restriktionsenzyme und andere DNA- modifizierende Enzyme, sowie DNA-Größenstandards wurden bei New England Biolabs (Frankfurt), Amersham (Freiburg), Takara (Clontech, Madison USA) und Thermo Fisher Scientific (Bonn) bezogen. Calbiochem (Heidelberg) lieferte das Miracloth Filtermaterial, Nitrocellulosemembranen (Hybond-N) für Southern Blots wurden bei Amersham, die Nitrocellulosemembranen für Western Blots wurden hingegen bei Schleicher and Schuell (Dassel, Germany) bezogen und Hartenstein (Würzburg) lieferte die PVDF-Membranen. Als Protein- Molekulargewichtsmarker wurden Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard von Invitrogen (Karlsruhe) und PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific (Bonn) verwendet. DAPI, Propidiumiodid, Hoechst und FM4-64 wurden von Molecular Probes (Burlingame, USA) bezogen.

## 2. Geräte

**Tabelle 4: Verwendete Geräte.**

Gerät	Typ/ Bestandteile	Hersteller
Autoklaven	Systec 3850 ELV	Systec GmbH, Wettenberg
	Systec VE-75	Systec GmbH, Wettenberg
Zentrifugen	Beckman J2-21 Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
	Beckman L8-70M Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
	Eppendorf 5415R, 5415D, 5424	Eppendorf, Hamburg
	Sorvall RC 6+	Thermo Fisher Scientific, Bonn
	Universal 320R	Hettich, Tuttlingen
	Multifuge 1S-R	Heraeus Instruments, Osterode
Inkubatoren/Schüttler	Minitron AI 72	Infors AG, Bottmingen
	Heraeus 6000	Heraeus Instruments, Osterode
UV- cross Linker	UV Stratalinker 2400	Stratagene, Waldbronn

Gelscanner	SnapScan1236u	Agfa, Köln
Spektralphotometer	Nano drop ND-1000	PeQLab, Erlangen
	6505 UV/Vis Spektrophotometer	Jenway, UK
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
PCR – Cyclers	T3 Thermocycler	Bayer, Leverkusen
	Personal Cyclers	Biometra, Göttingen
Luminometer	Chemi-Smart 5100	PeQLab, Erlangen
Hybridisierungsöfen	Personal HybTM	Stratagene, Waldbronn
	HL-2000 HybriLinker	UVP Laborprodukte
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II, Pulse Controller	Bio-Rad, München
Elektrophorese Systeme	Mini-Trans-blot	Bio-Rad, München
	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, München
Elektrophorese Power Supply	Power Pac 3000	Bio-Rad, München
Mikroskope	Axio Imager. Z1.	Zeiss, Deutschland
	Eclipse E200	Nikon, Japan
	SPD5 confocal microscope	Leica, Deutschland
	LSM-510 Meta laser scanning confocal microscope	Zeiss, Deutschland

### 3. Organismen

*A. nidulans*, *N. crassa*, *E. coli* und *S.cerevisiae* Stämme, mit denen in dieser Arbeit gearbeitet wurde, sind den folgenden Tabellen aufgeführt.

#### 3.1. *Aspergillus nidulans* Stämme

**Tabelle 5: Übersicht über Genotyp und Herkunft der verwendeten *A. nidulans* Stämme.**

Stamm	Genotyp	Quelle
AnKin26	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔkinA::pyrG (ΔkinA)</i>	(Requena <i>et al.</i> , 2001)
SNR1	<i>pabaA1; wA3; ΔargB::trpCΔB; ΔkipA::pyr4; veA1 (ΔkipA)</i>	(Konzack <i>et al.</i> , 2005)
SSK72	<i>wA3; ΔkipA::pyr4; ΔkinA::pyr4; veA1 (ΔkipAΔkinA)</i>	(Konzack <i>et al.</i> , 2005)
TN02A3	<i>pyrG89; argB2, nkuA::argB; pyroA4; veA1</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
RMSO11	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801</i>	(Stringer <i>et al.</i> , 1991)

SNG40	SNZ54 ( <i>alcA::mcherry::uncA<sup>rigor</sup></i> ) transformiert mit <i>fabM::GFP::pyro</i> Kasette; <i>veA1</i>	N. Grün
SNG52	TN02A3 transformiert mit pNG24; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i> ( <i>alcA(p)::sGFP::pab1<sup>1000bp</sup></i> )	N. Grün
SNZ9	TN02A3 transformiert mit pNZ13; <i>pyrG89</i> ; <i>veA1</i> ( $\Delta$ <i>uncA</i> )	(Zekert <i>et al.</i> , 2009)
SNZ14	TN02A3 transformiert mit pNZ15; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i> (GFP- <i>UncA<sup>rigor</sup></i> )	(Zekert <i>et al.</i> , 2009)
SNZ36	SNZ9 gekreuzt mit AnKin26 ( <i>uncA</i> und <i>kinA</i> Doppeldeletion)	(Zekert <i>et al.</i> , 2009)
SNZ54	TN02A3 transformiert mit pNZ15; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i> (mRFP- <i>UncA<sup>rigor</sup></i> )	(Zekert <i>et al.</i> , 2009)
SNZ68	TN02A3 transformiert mit pNZ58; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i> ( <i>alcA::GFP::tlgB</i> )	(Zekert <i>et al.</i> , 2009)
SCoS5	SNZ9 transformiert mit pCoS12 ( <i>alcA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-379aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS6	SNZ9 transformiert mit pCoS13 ( <i>alcA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-618aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS7	SNZ9 transformiert mit pCoS10 ( <i>alcA(p)::mRFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-1474aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS10	SNZ9 transformiert mit pCoS17 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-511aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS15	SNZ9 transformiert mit pCoS35 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-1316aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS16	SNZ9 transformiert mit pCoS38 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-1402aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS20	SNZ9 transformiert mit pCoS13 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-841aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS23	SNZ9 transformiert mit pCoS44 (FP1) ( <i>uncA(p)::sGFP::kinA1-348aa::uncA373-1630aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS24	SNZ9 transformiert mit pCoS46 (FP1 <sup>rigor</sup> ) ( <i>uncA(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup>1-348aa::uncA 373-1630aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS31	SNZ9 transformiert mit pCoS21 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup></i> (vollständig); <i>veA1</i> )	diese Arbeit
SCoS33	SRL1 ( $\Delta$ <i>kipA</i> ) transformiert mit pCoS44 (FP1) ( <i>uncA(p)::sGFP::kinA 1-348aa::uncA 373-1630aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit

SCoS36	AnKin26 transformiert mit pCoS44 (FP1) ( <i>uncA(p)::sGFP::kinA 1-348::uncA 373-1630aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS40	SNZ9 transformiert mit pCoS62 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-379::1316-1402aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS42	SNZ9 transformiert mit pCoS55 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-386aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS44	SNZ9 transformiert mit pCoS61 (FP2 <sup>rigor</sup> ) ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-379::kinA 343-927aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS49	SNZ9 transformiert mit pCoS60 (FP2) ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA 1-379aa::kinA 343-927aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS51	SNZ9 transformiert mit pCoS65 ( <i>alcA(p)::sGFP::uncA 1-379::1316-1402aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS53	SNZ9 transformiert mit pCoS67 (FP3 <sup>rigor</sup> ) ( <i>uncA(p)::sGFP::kipA<sup>rigor</sup> 1-559::uncA 401-1631aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS55	SNZ9 transformiert mit pCoS74 (FP4 <sup>rigor</sup> ) ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> 1-379bp::kipA 543-890aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS57	SNZ14 transformiert mit pCoS73 (Q1314stop Komplementation); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS58	SNZ14 transformiert mit pCoS72 (A1402stop Komplementation); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS61	SNZ9 transformiert mit pCoS80 ( <i>uncA</i> ohne FHA) ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> ohne FHA</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS62	SNZ9 transformiert mit pCoS81 ( <i>UncA</i> ohne CCs) ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup> ohne CC2+CC3</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS64	SNZ9 transformiert mit pCoS10 ( <i>alcA(p)::sGFP::uncA 1-1474aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS72	$\Delta kinA \Delta kipA$ transformiert mit pCoS77 (FP5 <sup>rigor</sup> ) ( <i>uncA(p)::sGFP:: kinA 1-348aa::kipA 543-890aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS73	$\Delta kinA \Delta kipA$ transformiert mit pCoS79 (FP6 <sup>rigor</sup> ) ( <i>uncA(p)::sGFP:: kipA<sup>rigor</sup> 1-555aa:: kinA 343-928aa</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS75	SNZ9 transformiert mit pCoS75 ( <i>UncA</i> ohne 80aa Region) ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA ohne 80aa</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS77	TN02A3 transformiert mit pCoS92 ( <i>alcA(p)::sGFP::srgA<sup>378bp</sup></i> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit

SCoS78	TN02A3 transformiert mit pCoS93 ( <i>alcA(p)::sGFP::srgB</i> <sup>539bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS79	TN02A3 transformiert mit pCoS94 ( <i>alcA(p)::sGFP::wafA</i> <sup>357bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS81	TN02A3 transformiert mit pCoS96 ( <i>alcA(p)::sGFP::refB</i> <sup>801bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS82	TN02A3 transformiert mit pCoS97 ( <i>alcA(p)::sGFP::AN1646</i> <sup>936bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS83	TN02A3 transformiert mit pCoS98 ( <i>alcA(p)::sGFP::sitB</i> <sup>886bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS84	TN02A3 transformiert mit pCoS99 ( <i>alcA(p)::sGFP::AN0865</i> <sup>839bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS85	TN02A3 transformiert mit pCoS100 ( <i>alcA(p)::sGFP::AN10190</i> <sup>640bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS86	TN02A3 transformiert mit pCoS101 ( <i>alcA(p)::sGFP::mcnA</i> <sup>775bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS87	TN02A3 transformiert mit pCoS102 ( <i>alcA(p)::sGFP::refA</i> <sup>938bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS89	TN02A3 transformiert mit pCoS104 ( <i>alcA(p)::sGFP::AN6009</i> <sup>842bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS92	TN02A3 transformiert mit pCoS111 <i>alcA(p)::sGFP::ervA</i> <sup>916bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS93	TN02A3 transformiert mit $\Delta$ <i>refA</i> -Deletionskassette; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS95	TN02A3 transformiert mit $\Delta$ <i>refB</i> -Deletionskassette; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS97	SNZ14 transformiert mit pCoS135 (Komplementationskonstrukt <i>uncA</i> <sup>del80aa</sup> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS98	TN02A3 transformiert mit pCoS133 ( <i>refB(p)::GFP::refB</i> <sup>900bp</sup> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS99	TN02A3 transformiert mit pCoS132 ( <i>refA(p)::GFP::refA</i> <sup>900bp</sup> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS106	TN02A3 transformiert mit $\Delta$ AN5378-Deletionskassette ( <i>sitB</i> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit

SCoS107	TN02A3 transformiert mit $\Delta mcnA$ -Deletionskassette; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS108	TN02A3 transformiert mit $\Delta wafA$ -Deletionskassette; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS111	TN02A3 transformiert mit pCoS122 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::srgA<sup>378bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::unc<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS112	TN02A3 transformiert mit pCoS115 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::sitB<sup>886bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS113	TN02A3 transformiert mit pCoS127 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::ervA<sup>916bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS114	TN02A3 transformiert mit pCoS123 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::srgB<sup>539bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS116	$\Delta mcnA$ transformiert mit pNZ15 und 1531 ( <i>alcA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor 900bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS117	$\Delta sitB$ transformiert mit pCoS21 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS122	$\Delta uncA$ transformiert mit pCoS135 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup></i> ohne 80aa); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS124	SNZ14 transformiert mit pCoS135 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup></i> ohne 80aa); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS126	TN02A3 transformiert mit pCoS155 und pCoS150 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA<sup>tail</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::tubA</i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012) (Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS127	TN02A3 transformiert mit pCoS156 ( <i>alcA(p)::sGFP::uncA<sup>tail</sup></i> ); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS128	TN02A3 transformiert mit pCoS157 ( <i>alcA(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup> <math>\beta</math>5L8</i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS129	SNZ9 transformiert mit pCoS138 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> ohne 80aa); <i>veA1</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
SCoS136	$\Delta kinA$ transformiert mit pCoS176 ( <i>alcA(p)::sGFP::kinA<sup>volle Länge rigor</sup> <math>\beta</math>5L8</i> ); <i>veA1</i> ; <i>argB2</i>	diese Arbeit
SCoS137	$\Delta kinA$ transformiert mit pCoS166 ( <i>alcA(p)::sGFP::kinA<sup>volle Länge rigor</sup> G731+86aa</i> ); <i>veA1</i> ; <i>argB2</i>	diese Arbeit



SCoS138	<i>ΔkinA</i> transformiert mit pCoS165 ( <i>alcA(p)::sGFP::kinA</i> <sup>volle Länge rigor</sup> ); <i>veA1</i> ; <i>argB2</i>	diese Arbeit
SCoS139	TN02A3 transformiert mit pCoS175 <i>sitB(p)::sGFP::sitB</i> <sup>886bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS140	TN02A3 transformiert mit <i>ΔervA</i> -Deletionskassette; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS141	<i>ΔuncA</i> transformiert mit pCoS148 ( <i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> ohne 6R); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS143	<i>ΔkinA</i> transformiert mit pCoS167 ( <i>alcA(p)::sGFP::kinA</i> <sup>volle Länge rigor N904+86aa</sup> ); <i>veA1</i> ; <i>argB2</i>	diese Arbeit
SCoS144	SNZ54 ( <i>alcA::mcherry::uncA</i> <sup>rigor</sup> ) transformiert mit pCoS176 ( <i>alcA(p)::sGFP::kinA</i> <sup>volle Länge rigor β5L8</sup> ); <i>veA1</i> ;	diese Arbeit
SCoS145	TN02A3 transformiert mit pCoS186 ( <i>alcA(p)::sGFP::AN0706</i> <sup>884bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS146	TN02A3 transformiert mit pCoS187 ( <i>alcA(p)::sGFP::AN4207</i> <sup>918bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS147	TN02A3 transformiert mit pCoS188 ( <i>alcA(p)::sGFP::AN6323</i> <sup>915bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS149	TN02A3 transformiert mit pNG11 ( <i>srgB(p)::sGFP::srgB</i> <sup>539bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS150	<i>ΔuncA</i> transformiert mit pNG11 ( <i>srgB(p)::sGFP::srgB</i> <sup>539bp</sup> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS151	TN02A3 transformiert mit pCoS185 ( <i>alcA(p)::sGFP::AN12171</i> <sup>351bp</sup> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS156	TN02A3 transformiert mit <i>nudM::sGFP::pyrG::RB</i> Kassette ( <i>nudM(p)::nudM::sGFP</i> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS157	TN02A3 transformiert mit pCoS200 und pCoS209 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::AN12171</i> <sup>315bp</sup> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA</i> <sup>900bp</sup> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS158	TN02A3 transformiert mit pCoS201 und pCoS209 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::AN0706</i> <sup>884bp</sup> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA</i> <sup>900bp</sup> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS159	TN02A3 transformiert mit pCoS202 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::AN4207</i> <sup>918bp</sup> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA</i> <sup>1300bp</sup> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit

SCoS160	TN02A3 transformiert mit pCoS206 und pCoS209 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::synA<sup>357bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA<sup>900bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS161	TN02A3 transformiert mit pCoS207 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::chsB<sup>1000bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS162	TN02A3 transformiert mit pCoS208 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::chcA<sup>1500bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS163	TN02A3 transformiert mit pCoS203 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::AN6323<sup>913bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS163	TN02A3 transformiert mit pCoS203 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::AN6323<sup>913bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS164	TN02A3 transformiert mit <i>glsA::YFP<sup>C</sup>::pyrG::RB</i> Kassette und pNZ-SI39 ( <i>glsA(p)::glsA::YFP<sup>C</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS165	TN02A3 transformiert mit <i>fabM::YFP<sup>C</sup>::pyrG::RB</i> Kassette und pNZ-SI39 ( <i>fabM(p)::fabM::YFP<sup>C</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS166	TN02A3 transformiert mit <i>bglA::YFP<sup>C</sup>::pyrG::RB</i> Kassette und pNZ-SI39 ( <i>bglA(p)::bglA::YFP<sup>C</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS167	TN02A3 transformiert mit <i>nudM::YFP<sup>C</sup>::pyrG::RB</i> Kassette und pNZ-SI39 ( <i>nudM(p)::bglA::YFP<sup>C</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS168	TN02A3 transformiert mit pCoS210 und pNZ-SI39 ( <i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::pab1<sup>1080bp</sup></i> ; <i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>1300bp</sup></i> ); <i>veA1</i>	diese Arbeit
SCoS169	TN02A3 transformiert mit pCoS211 ( <i>srgA(p)::sGFP::srgA<sup>volle Länge</sup></i> ); <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	diese Arbeit

---

3.2. *Neurospora crassa* StämmeTabelle 6: Übersicht über Genotyp und Herkunft der verwendeten *N.crassa* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
N9717	$\Delta mus-51::bar^+$ ; <i>his-3</i> ; <i>mat A</i>	FGSC
N2524	<i>rid</i> <sup>RIP4</sup> ; <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::bml::sGFP</i> ; <i>mat a</i>	Freitag <i>et al.</i> , 2004
N2281	<i>rid</i> <sup>RIP4</sup> ; <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::1-hH1::sGFP</i> ; <i>mat a</i>	Freitag <i>et al.</i> , 2004
NCoS1	N9717 transformiert mit pCoS139 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::mcherry::nkin2</i> <sup>rigor</sup> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS2	N9717 transformiert mit pCoS136 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::mcherry::nkin2</i> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS3	N9717 transformiert mit pCoS172 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::nkin2</i> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS4	N9717 transformiert mit pCoS173 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::nkin2</i> <sup>rigor</sup> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS5	N9717 transformiert mit pCoS182 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::nkin</i> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS6	N9717 transformiert mit pCoS183 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::nkin</i> <sup>rigor</sup> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS7	N9717 transformiert mit pCoS204 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::ypt52</i> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS8	N9717 transformiert mit $\Delta nkin2$ Deletionskassette ( $\Delta nkin2::hph$ ); <i>his-3</i> ; <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS10	N9717 transformiert mit pCoS212 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::nkin3</i> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS11	N9717 transformiert mit pCoS213 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::nkin3</i> <sup>rigor</sup> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS12	$\Delta nkin2$ transformiert mit pCoS204 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::ypt52</i> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS13	$\Delta nkin2$ transformiert mit pCoS172 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::nkin2</i> <sup>rigor</sup> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit
NCoS14	$\Delta nkin2$ transformiert mit pCoS173 ( <i>his-3</i> <sup>+</sup> :: <i>ccg-1(p)::sGFP::nkin2</i> <sup>rigor</sup> ); <i>mat A</i>	diese Arbeit

### 3.3. *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Tabelle 7: Übersicht über Genotyp und Herkunft der verwendeten *S. cerevisiae* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
AH109	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>trp1901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>LYS2 :: GAL1UAS-GAL1TATA-His3</i> , <i>GAL2UAS-</i> <i>GAL2TATA-Ade2</i> , <i>URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i> , <i>MEL1</i>	Clontech, Heidelberg
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::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech, Heidelberg
yCoS1	Y187 transformiert mit pCoS82 ( <i>tubA</i> in pGADT7)	diese Arbeit
yCoS3	Y187 transformiert mit pCoS84 ( <i>tubB</i> in pGADT7)	diese Arbeit
yCoS4	AH109 transformiert mit pCoS85 ( <i>uncA</i> <sup>tail ohne PH</sup> (951-1497aa) in pGBKT7)	diese Arbeit
yCoS5	AH109 transformiert mit pCoS86 ( <i>uncA</i> <sup>tail mit PH</sup> (951-1631aa) in pGBKT7)	diese Arbeit
yCoS6	AH109 transformiert mit pCoS87 ( <i>uncA</i> <sup>linker</sup> (1-390aa) in pGBKT7)	diese Arbeit
yCoS7	Y186 transformiert mit pCoS88 ( <i>uncA</i> <sup>linker</sup> (1-390aa) in pGADT7)	diese Arbeit
yCoS8	AH109 transformiert mit pCoS89 ( <i>uncA</i> <sup>tail</sup> (352-1631aa) in pGBKT7)	diese Arbeit
yCoS9	Y187 transformiert mit pCoS90 ( <i>uncA</i> <sup>tail</sup> (352-1631aa) in pGADT7)	diese Arbeit
yCoS10	Y187 transformiert mit pCoS129 ( <i>refB</i> (cDNA) in pGADT7)	diese Arbeit
yCoS11	Y187 transformiert mit pCoS134 ( <i>refA</i> (cDNA) in pGADT7)	diese Arbeit
yCoS12	AH109 transformiert mit pCoS128 ( <i>srgA</i> (cDNA) in pGBKT7)	diese Arbeit
yCoS13	AH109 transformiert mit pCoS131 ( <i>srgB</i> (cDNA) in pGBKT7)	diese Arbeit
yCoS14	AH109 transformiert mit pCoS130 ( <i>uncB</i> (cDNA) in pGBKT7)	diese Arbeit
yCoS15	Y187 transformiert mit pCoS154 ( <i>tubA</i> <sup>-Y</sup> in pGADT7)	diese Arbeit
yCoS16	Y187 transformiert mit pCoS153 ( <i>tubB</i> <sup>-Y</sup> in pGADT7)	diese Arbeit

### 3.4. *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 8: Übersicht über Genotyp und Herkunft der verwendeten *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
Top10	F' <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i><math>\Delta</math>lacX74</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) 7679, <i>galE15</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> $\lambda$	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F'proAB <i>lacI</i> <sup>Q</sup> Z $\Delta$ M15: Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene, Amsterdam

### 4. Plasmide

Alle Plasmide wurden in chemokompetente Top10 *E. coli* Zellen transformiert und werden in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Übersicht über Genotyp und Herkunft der verwendeten Plasmide.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>ccg-1::GFP</i>	<i>ccg-1(p)::sGFP</i> ; 3'- <i>his-3 flank</i> ; Amp <sup>R</sup>	Honda & Selker, 2009
pJV16	<i>ccg-1(p)::mcherry::sGFP</i> ; 3'- <i>his-3 flank</i> ; Amp <sup>R</sup>	J. Verdín,
pCR2.1	Vektor für Zwischenklonierungen (TOPO); Amp <sup>R</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
pCMB17apx	<i>alcA(p)::GFP</i> , für N-terminale Fusion von GFP mit GOI; enthält <i>N. crassa pyr4</i> ; Amp <sup>R</sup>	Efimov <i>et al.</i> (2006)
pGBKT7	Yeast Two-Hybrid bait Vector, Gal4-BD, Trp	Clontech
pGADT7	Yeast Two-Hybrid prey Vector, Gal4-AD, Leu	Clontech
pNZ15	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA<sup>rigor</sup> 900bp</i> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Zekert <i>et al.</i> (2009)
pNZ64	<i>alcA(p)::GFP::tubA<sup>3,1kb</sup></i> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Zekert
pNZ-SI39	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::uncA<sup>900bp</sup></i> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx mit <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i>	N. Zekert
pNZ-SI40	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA<sup>900bp</sup></i> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Zekert
pNZ-SI49	1.5-kb <i>uncA(p)</i> Fragment in pAS3 mit <i>KpnI-EcoRI</i>	Zekert <i>et al.</i> (2009)
pNZ-SI71	<i>alcA(p)::mRFP1::uncA</i> (cDNA) mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Zekert
pCS4-NZ	pCS2-NZ Mutagenese um G97E Mutation in den <i>p-loop</i> von <i>UncA</i> einzufügen, (KinA <sup>rigor</sup> )	Zekert <i>et al.</i> (2009)
pSK275	<i>ptrA</i> - Pyrithiamin Resistenz als Selektionsmarker	Kubodera <i>et al.</i>

		(2000)
pNG2	<i>alcA(p)::sGFP::synA</i> <sup>357bp</sup> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Grün
pNG6	<i>alcA(p)::sGFP::chsB</i> <sup>1500bp</sup> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Grün
pNG10	<i>srgA(p)::GFP::srgA</i> <sup>378bb</sup> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Grün
pNG11	<i>srgB(p)::GFP::argB</i> <sup>539bb</sup> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Grün
pNG16	<i>alcA(p)::sGFP::chcA</i> <sup>1000bp</sup> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Grün
pNG24	<i>alcA(p)::sGFP::pab1</i> <sup>1000bp</sup> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	N. Grün
1531	<i>A. fumigatus pyro</i> Resistenzplasmid	
pDV25	<i>alcA(p)::sGFP::kinA1-3100bp</i> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	D. Veith
pCoS10	<i>alcA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-1474aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS12	<i>alcA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-379aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS13	<i>alcA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-618aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS17	<i>alcA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-511aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS21	<i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> (vollständig) mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx mit <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i>	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS24	<i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-841aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS35	<i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-1316aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS38	<i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-1402aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS44	<i>uncA(p)::sGFP::kinA1-348aa::uncA373-1630aa</i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP1)	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS46	<i>uncA(p)::sGFP::kinA</i> <sup>rigor</sup> 1-348aa::uncA373-1630aa mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP1 <sup>rigor</sup> )	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS46	<i>uncA(p)::sGFP::kinA</i> <sup>rigor</sup> 1-348aa::uncA373-1630aa mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP1 <sup>rigor</sup> )	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS60	<i>uncA(p)::sGFP::uncA1-445aa::kinA343-928aa</i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP2)	diese Arbeit
pCoS61	<i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-445aa::kinA343-928aa mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP2 <sup>rigor</sup> )	diese Arbeit
pCoS62	<i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> <sup>rigor</sup> 1-1137aa::uncA1316-1402aa mit	diese Arbeit

	<i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx	
pCoS65	<i>alcA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup>1-1137aa::uncA1316-1402aa</i> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS66	<i>alcA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup>1-1137aa::uncA1316-1402aa</i> mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS67	<i>uncA(p)::sGFP::kipA<sup>rigor</sup>1-555aa::uncA 373-1630aa</i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP3 <sup>rigor</sup> )	diese Arbeit
pCoS72	SNZ14 Komplementationskonstrukt um A1402stop Mutation einzufügen ( <i>Ascl-uncA-tail-Pacl-pyro-NotI-uncA-RB-Ascl</i> ) in Topo2.1	diese Arbeit
pCoS73	SNZ14 Komplementationskonstrukt um Q1314stop Mutation in Topo2.1n einzufügen ( <i>Ascl-uncA-tail-Pacl-pyro-NotI-uncA-</i>	diese Arbeit
pCoS74	<i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup>1-445aa::kipA 543-890aa</i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP4 <sup>rigor</sup> )	diese Arbeit
pCoS75	<i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup></i> ohne 1316-1402aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx ( <i>UncA<sup>del80aa</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS76	<i>uncA(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup>1-348aa::kipA 543-890aa</i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP5 <sup>rigor</sup> )	diese Arbeit
pCoS77	<i>uncA(p)::sGFP::kinA1-348aa::kipA 543-890aa</i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP5)	diese Arbeit
pCoS78	<i>uncA(p)::sGFP::kipA1-555aa::kinA343-928aa</i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP6)	diese Arbeit
pCoS79	<i>uncA(p)::sGFP::kipA<sup>rigor</sup>1-555aa::kinA343-928aa</i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pCMB17apx (FP6 <sup>rigor</sup> )	diese Arbeit
pCoS80	<i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup></i> ohne 495-596aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx ( <i>UncA<sup>delFHA</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS81	<i>uncA(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup></i> ohne 679-823aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx ( <i>UncA<sup>delCC2</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS83	<i>uncA<sup>rigor</sup>1-390aa</i> in pGADT7 ( <i>UncA<sup>motor</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS84	<i>tubB</i> (cDNA) mit <i>XbaI-Clal</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS85	<i>uncA 951-1497aa</i> mit <i>EcoRI-SmaI</i> in pGBKT7 ( <i>uncA<sup>tail ohne PH</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS86	<i>uncA 951-1631aa</i> mit <i>EcoRI-SmaI</i> in pGBKT7 ( <i>uncA<sup>tail mit PH</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS87	<i>uncA<sup>rigor</sup> 1-390aa</i> mit <i>EcoRI-SmaI</i> in pGBKT7 ( <i>UncA<sup>motor</sup></i> )	diese Arbeit

pCoS88	<i>uncA</i> 1-390aa) mit <i>EcoRI-XbaI</i> in pGADT7 ( <i>UncA<sup>motor</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS89	<i>uncA3</i> 52-1631aa mit <i>EcoRI-SmaI</i> in pGBKT7 ( <i>UncA<sup>tail</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS90	<i>uncA352-1631aa</i> mit <i>EcoRI-SmaI</i> in pGADT7 ( <i>UncA<sup>tail</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS92	<i>alcA(p)::sGFP::srgA<sup>378bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS93	<i>alcA(p)::sGFP::srgB<sup>399bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS94	<i>alcA(p)::sGFP::wafA<sup>357bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS96	<i>alcA(p)::sGFP::refB<sup>801bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS97	<i>alcA(p)::sGFP::AN1646<sup>936bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS98	<i>alcA(p)::sGFP::sitB<sup>86bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS99	<i>alcA(p)::sGFP::AN0865<sup>839bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS100	<i>alcA(p)::sGFP::AN10190<sup>640bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS101	<i>alcA(p)::sGFP::mcnA<sup>775bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS102	<i>alcA(p)::sGFP::refA<sup>938bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS104	<i>alcA(p)::sGFP::AN6009<sup>842bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS111	<i>alcA(p)::sGFP::ervA<sup>916bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS112	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::srgA<sup>378bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS113	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::srgB<sup>539bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS114	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::wafA<sup>357bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS115	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::sitB<sup>886bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS116	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::mcnA<sup>775bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS117	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::ervA<sup>916bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS118	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::refB<sup>801bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS119	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::refA<sup>938bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS120	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::refB<sup>801bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS121	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::mcnA<sup>775bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS122	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::srgA<sup>378bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS123	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::srgB<sup>539bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS124	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::wafA<sup>357bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS125	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::sitB<sup>886bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS126	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::mcnA<sup>775bp</sup></i> mit <i>Asc1-PacI</i> in pMCB17apx	diese Arbeit



pCoS127	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::ervA<sup>916bp</sup></i> mit <i>Asc1-Pacl</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS128	<i>srgA</i> (cDNA) mit <i>XbaI-BamHI</i> in pGBKT7	diese Arbeit
pCoS129	<i>refB</i> (cDNA) mit <i>XbaI-SacI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS130	<i>uncB</i> (cDNA, 2.ATG) mit <i>NdeI-ClaI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS131	<i>srgB</i> (cDNA) mit <i>XbaI-BamHI</i> in pGBKT7	diese Arbeit
pCoS132	<i>refA(p)::sGFP::refA<sup>938bp</sup></i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS133	<i>refB(p)::sGFP::refB<sup>801bp</sup></i> mit <i>EcoRI-Pacl</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS134	<i>refA</i> (cDNA) mit <i>XbaI-XhoI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS135	SNZ14 Komplementationskonstrukt ohne 80aa (1316-1402) ( <i>Ascl-uncA-tail-Pacl-pyro-NotI-uncA-RB-Ascl</i> ) in Topo2.1	diese Arbeit
pCoS136	NKin2 (vollständig) mit <i>Pacl-EcoR1</i> in pJV16 <i>ccg-1(p)::mcherry::nkin2</i>	diese Arbeit
pCoS138	<i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> ohne 1316-1402aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx ( <i>UncA<sup>del80aa</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS139	NKin2 <sup>rigor</sup> (vollständig) mit <i>Pacl-EcoR1</i> in pJV16 <i>ccg-1(p)::mcherry::nkin2<sup>rigor</sup></i>	diese Arbeit
pCoS143	<i>alcA(p)::sGFP::Umkin-3</i> mit <i>Asc1-Pacl</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCoS144	<i>ervA</i> (cDNA) mit <i>EcoRI-XbaI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS145	AN6009 (cDNA) mit <i>NdeI-XbaI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS146	<i>wafA</i> (cDNA) mit <i>EcoRI-XbaI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS147	AN10190 (cDNA) mit <i>EcoRI-XbaI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS148	<i>uncA(p)::sGFP::uncA</i> ohne 1390-1396aa mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx ( <i>UncA<sup>del6R</sup></i> )	diese Arbeit
pCoS149	SNZ14 Komplementationskonstrukt ohne 6R (1390-1396aa) ( <i>Ascl-uncA-tail-Pacl-pyro-NotI-uncA-RB-Ascl</i> ) in Topo2.1	diese Arbeit
pCoS150	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::tubA<sup>3100bp</sup></i> (inkl. Terminator) mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS151	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::tubA<sup>3100bp</sup></i> (inkl. Terminator) mit <i>Ascl-Pacl</i> in pCMB17apx mit <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i>	Seidel <i>et al.</i> , 2012

pCoS153	<i>tubB</i> <sup>Y</sup> (cDNA) mit <i>XbaI-ClaI</i> in pGADT7 ( <i>TubB</i> <sup>detyr</sup> )	diese Arbeit
pCoS154	<i>tubA</i> <sup>Y</sup> (cDNA) with <i>XbaI-ClaI</i> in pGADT7 ( <i>TubA</i> <sup>detyr</sup> )	diese Arbeit
pCoS155	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA373-1630aa</i> mit <i>AscI-Pacl</i> in pCMB17apx ( <i>uncA</i> <sup>tail</sup> )	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS156	<i>alcA(p)::sGFP::uncA373-1630aa</i> mit <i>AscI-Pacl</i> in pCMB17apx ( <i>uncA</i> <sup>tail</sup> )	Seidel <i>et al.</i> , 2012
pCoS157	<i>alcA(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup>1-1300bp</i> mit modifiziertem $\beta$ 5L8 loop mit <i>AscI-Pacl</i> in pCMB17apx mit <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i> ( <i>KinA</i> <sup>rigor</sup> $\beta$ 5L8)	diese Arbeit
pCoS165	<i>alcA(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup></i> (vollständig) mit <i>AscI-Pacl</i> in pCMB17apx mit <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i>	diese Arbeit
pCoS166	<i>alcA(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup>-KpnI-G731-uncA<sup>86aa</sup></i> in pCMB17apx mit <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i>	diese Arbeit
pCoS167	<i>alcA(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup>-KpnI-N904-uncA<sup>86aa</sup></i> in PMCB17apx mit <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i>	diese Arbeit
pCoS168	<i>alcA(p)::mRFP::kinA<sup>rigor</sup>1300bp</i> mit modifiziertem $\beta$ 5L8 loop mit <i>AscI-Pacl</i> in pCMB17apx mit <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i> ( <i>KinA</i> <sup>rigor</sup> $\beta$ 5L8)	diese Arbeit
pCoS172	<i>ccg-1(p)::sGFP::nkin2</i> mit <i>XbaI-Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit
pCoS173	<i>ccg-1(p)::sGFP::nkin2<sup>rigor</sup></i> mit <i>XbaI-Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit
pCoS175	<i>sitB(p)::sGFP::sitB<sup>886bp</sup></i> mit <i>AscI</i> und <i>Pacl</i> in PMCB17apx	diese Arbeit
pCoS176	<i>alcA(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup></i> (vollständig) mit <i>AscI</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx; <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i> ( <i>KinA</i> <sup>rigor</sup> $\beta$ 5L8)	diese Arbeit
pCoS177	<i>ccg-1(p)::sGFP::uncA<sup>rigor</sup></i> (cDNA) mit <i>XbaI</i> and <i>Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit
pCoS178	<i>sitB</i> (cDNA) mit <i>EcoRI</i> and <i>XbaI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pCoS179	<i>ccg-1(p)::sGFP::uncA</i> (cDNA) mit <i>XbaI</i> and <i>Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit
pCoS181	<i>ccg-1(p)::sGFP::kinA<sup>rigor</sup></i> (vollständig) mit modifizierter $\beta$ 5L8 Schleife in <i>ccg-1::GFP</i> ( <i>KinA</i> <sup>rigor</sup> $\beta$ 5L8)	diese Arbeit
pCoS182	<i>ccg-1(p)::sGFP::Nkin</i> mit <i>XbaI</i> and <i>Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit
pCoS183	<i>ccg-1(p)::sGFP::Nkin<sup>rigor</sup></i> mit <i>XbaI</i> and <i>Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit
pCoS185	<i>alcA(p)::sGFP::AN12171<sup>351bp</sup></i> mit <i>AscI-Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit

pCoS186	<i>alcA(p)::sGFP::AN0706</i> <sup>884bp</sup> mit <i>Asc1-Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS187	<i>alcA(p)::sGFP::AN4207</i> <sup>918bp</sup> mit <i>Asc1-Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS188	<i>alcA(p)::sGFP::AN6323</i> <sup>915bp</sup> mit <i>Asc1-Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS200	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::AN12171</i> <sup>351bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS201	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::AN0706</i> <sup>884bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS202	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::AN4207</i> <sup>918bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS203	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::AN6323</i> <sup>913bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS204	<i>ccg-1(p)::sGFP::Ypt52</i> mit <i>Xba1</i> and <i>Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit
pCoS206	<i>alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::synA</i> <sup>357bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS207	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::chsB</i> <sup>1000bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS208	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::chcA</i> <sup>1500bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS209	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA</i> <sup>900bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx <i>pyroA</i> statt <i>pyr4</i>	diese Arbeit
pCoS210	<i>alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::pab1</i> <sup>1080bp</sup> mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS211	<i>srgA::sGFP::srgA</i> (vollständig) mit <i>Ascl- Pacl</i> in pCMB17apx	diese Arbeit
pCoS212	<i>ccg-1(p)::sGFP::Nkin3</i> mit <i>Xba1</i> and <i>Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit
pCoS213	<i>ccg-1(p)::sGFP::Nkin3</i> <sup>rigor</sup> mit <i>Xba1</i> and <i>Pacl</i> in <i>ccg-1::GFP</i>	diese Arbeit

---

## 5. Kultivierung der Organismen

Die *A. nidulans*- und *E. coli*- Kulturen wurden aerob bei 37°C, *N. crassa* bei 28°C und *S. cerevisiae*- Kulturen bei 30°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 180-200 rpm in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren gezüchtet. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Medium eingewogen. Die verwendeten Medien zur Anzucht von *E. coli* wurden je nach Versuchsansatz mit verschiedenen Antibiotika supplementiert (**Tab. 11**); die *S. cerevisiae* und *A. nidulans*- und *N. crassa* Medien wurden mit verschiedenen Auxotrophiemarkern versetzt (**Tab. 13, Tab.15**). Hitzeempfindliche Lösungen, wie Antibiotika, Aminosäuren und Vitamine wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel).

### 5.1. Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*- Kulturen wurden aerob bei 37°C inkubiert und Flüssigkulturen wurden bei 180-200 rpm in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren gezüchtet. Die verwendeten Medien zur Anzucht von *E. coli* wurden je nach Versuchsansatz mit verschiedenen Antibiotika supplementiert (Tab. 11).

**Tabelle 10: Medien für *E.coli*.**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Luria Bertani (LB)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7.5
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 0,19 g KCl; 2 g MgCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 3,6 g Glukose; pH 7.0

**Tabelle 11: Antibiotika für *E.coli* Medien.**

Substanz	Stammlösung/ Lagerung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in Ethanol/ -20°C	100 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml in Wasser/ -20°C	50 µg/ml
Streptomycin	10 mg/ml in Wasser/ -20°C	50 µg/ml

### 5.2. Kultivierung von *A. nidulans*

*A. nidulans*- Kulturen wurden aerob bei 37°C inkubiert und Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren gezüchtet. Die verwendeten Medien zur Anzucht wurden je nach Versuchsansatz mit verschiedenen Auxotrophiemarkern supplementiert (Tab. 12).

**Tabelle 12: Medien und Lösungen für *A. nidulans*.**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlsg.; 20 g Glukose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 ml Vitaminlsg.; 1 ml Spurenelementlsg.; mit 10 M NaOH auf pH ~6.5
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlsg.; 1 ml Spurenelementlsg.; 2 % Glukose, Glycerin, Threonin oder Ethanol; mit 10 M NaOH auf pH 6.5, zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 M KCl supplementiert
Salzstammlösung (20x)	120 g NaNO <sub>3</sub> ; 10,4 g KCl; 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>
Spurenelementlösung (1000x)	22 g ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 11 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 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 ;1,6 g CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O; 1,1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O; 50 g Na <sub>4</sub> EDTA; mit KOH auf pH 6.5- 6.8

Vitaminlösung (1000x)	0,1 g D-Biotin; 0,1 g Pyridoxin-HCl; 0,1 g Thiamin-HCl; 0,1 g Riboflavin; 0,1 g p-Aminobenzoesäure; 0,1g Nicotinsäure
-----------------------	--

**Tabelle 13: Auxotrophiesubstanzen und Marker für *A. nidulans*.**

Substanz	Stammlösung	Eingesetzte Menge pro Liter
Arginin	100x	10 ml
Uracil	-	1 g
Uridin	-	1,2 g
p- Aminobenzoesäure (PABA)	1000x	1 ml
Pyridoxin-HCl	1000x	1 ml
Pyrithiamin	1000x	1 ml

### 5.2.1. Kreuzung von *A. nidulans*

Die Kreuzungspartner wurden auf Komplexmedium- Platten im Abstand von ca. 1,5 cm angeimpft und zwei bis drei Tage bei 37°C inkubiert. An den zusammengewachsen Mycelien wurden aus den Berührungspunkten der Mycelien kleine Agarblöcke ausgeschnitten und auf Minimalmedium- Platten mit geeigneten Auxotrophiemarkern, die nur ein Wachstum des Heterokaryons erlauben, überführt. Nach Verschließen der Platten mit Klebeband zur Erhöhung des CO<sub>2</sub> Partialdruckes zur verbesserung der sexuellen Vermehrung, wurden die Kreuzungspartner für mindestens 14 Tage bei 37°C inkubiert. In diesem Zeitraum bilden sich die Fruchtkörper (Kleistothecien), die mit Hilfe einer sterilen Impfnadel isoliert, auf einer Agarplatte unter dem Binokular durch vorsichtiges Rollen von den Hüllezellen und anhaftenden Konidiosporen befreit und in 0,5 ml H<sub>2</sub>O im Eppendorfgefäß zerdrückt wurden. Aliquots der Ascosporensuspension wurden auf CM-Platten ausplattiert. Nach 2- 3 Tagen Inkubation konnte die Kreuzung ausgewertet werden. Die gekreuzten Kolonien wurden auf Rasterplatten mit 20 Kolonien pro Platte mittels Stempeln auf Medien transferiert, auf denen jeweils einer der zu testenden Auxotrophiemarker fehlte

### 5.3. Kultivierung von *N. crassa*

*N. crassa*- Kulturen wurden aerob bei 28- 30°C inkubiert. Die verwendeten Medien zur Anzucht wurden je nach Versuchsansatz mit verschiedenen Auxotrophiemarkern supplementiert (Tab. 15).

**Tabelle 14: Medien und Lösungen für *N. crassa*.**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Spurenelementlösung (1000x)	50 g C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ; 50 g ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 10 g Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O; 2,5 g CuSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 0,5 g MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 0,5 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,5 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
Salzstammlösung (50x)	150 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> x 5,5 H <sub>2</sub> O; 250 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ; 10 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 5 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 5 ml Spurenelementlösung; 0,025 mg Biotin
Vogel`s Minimalmedium	20 ml Salzstammlösung; 15 g Saccharose
Vogel`s Komplexmedium	20 ml Salzstammlösung; 15 g Saccharose; 5 g Hefeextrakt, 5 g Casaminosäuren
FIGS- Lösung (10x)	200 g Sorbose, 5,0 g Fruktose; 5,0 g Glukose
Vogel`s FIGS	20 ml Salzstammlösung; 1,5 % Agar; 100 ml FIGS (10x) (nach dem Autoklavieren zugeben)

**Tabelle 15: Selektionsmarker für *N. crassa*.**

Substanz	Stammlösung	Eingesetzte Menge pro Liter
Hygromycin	200 mg/ml	200 µg/ml
Histidin	25 mg/ml	0,5 mg/ml
Nourseothricin	5 mg/ml	25 µg/ml

### 5.3.1. Vereinzelung von *N. crassa* Heterokaryen über Mikrokonidien

Da die Konidien von *N. crassa* meist mehrkernig sind, ist es oftmals notwendig Homokaryenvereinzelungen an Transformationen anzuschließen. Mikrokonidien eignen sich hervorragend für Vereinzelungen, weil fast 100% einkernig vorliegen. Hierfür wurde Westergaard`s Medium mit *N. crassa* Konidien des zu vereinzelnden Stammes inokuliert und für fünf Tage bei 28°C und anschließend für zehn Tage bei Raumtemperatur inkubiert, Licht/Dunkel Rhythmus sollte währenddessen beachtet werden. Anschließend wurden die Mikrokonidien, der nur spärlich bewachsenen Platten, mit 2 ml sterilem Wasser resuspendiert und über einen 5µm Millex Durapore Filter (Millipore, SLSV025LS) (nach Ebbole & Sachs, 1990) filtriert und mittels eines kurzen Zentrifugationsschritt bei 2000 g in ein Volumen von 200µl aufkonzentriert (ca. 10<sup>3</sup> bis 10<sup>6</sup> Mikrokonidien pro Platte). Hiervon wurden jeweils 20 µl und 180 µl auf FIGS- Platten (Sorbose) plattiert und bei 30°C für 4 Tage inkubiert. Die hefeartig wachsenden Kolonien wurden dann auf Vogel`s Minimalmedium (Saccharose) vereinzelt und genotypisiert.

### 5.3.1. Kreuzung von *N. crassa*

Zur Kreuzung von zwei Stämmen wurde der Stamm mit dem *mat A* Lokus auf bei Raumtemperatur inkubiert bis die gesamte Westergaard's Platte bewachsen war und dann mit Konidien der anderen Stammes (*mat a* Lokus) betropft wurde. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und mit Aluminiumfolie umwickelt, so dass der CO<sub>2</sub> Partialdruck erhöht wurde (förderlich für sexuelle Vermehrung) und Licht ausgeschlossen wurde, was sonst die asexuelle Vermehrung aktivieren würde. Nach einer Inkubationszeit von fünf bis sieben Tagen bilden sich braune Peritethien, die sich nach 10 Tagen schwarz färben. Stellt man die Platte dann ans Licht, so werden nach kurzer Zeit die Ascosporen herausgeschleudert und fangen sich in den an dem Deckel befindlichen kondensierten Wassertropfen. Die Ascosporen können in diesen Wassertropfen aufgefangen, auf FIGS- Platte überführt und auf dieser durch Ausplattieren vereinzelt werden. Die einzelnen Ascosporen wurden dann mit einer Impfnadel in Schrägagarröhrchen oder Platten zur Vereinzellung überführt. Damit eine hohe Keimungseffizienz der Ascosporen erzielt wird, musste man die Ascosporen dann noch 30 min bei 65°C einem Temperaturschock aussetzen.

**Tabelle 16. : Medien für die *N. crassa* Kreuzung.**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Westergaard's	5 g KNO <sub>3</sub> ; 5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,5 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 0,5g NaCl; 0,5 g CaCl <sub>2</sub> ;
Salzstammlösung (5x)	0,5 ml Spurenelementlösung
Westergaard's Medium	10 ml Westergaard's Salzstammlösung; 5 g Saccharose; 5 mg Biotin; 1% Agar; nach dem Autoklavieren 10 ml 0,1 M C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> INaO <sub>2</sub>  Natriumiodacetat (steril filtriert) zugeben

### 5.4. Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae*- Kulturen wurden aerob bei 30°C inkubiert und Flüssigkulturen wurden bei 220 rpm in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren gezüchtet. Die verwendeten Medien zur Anzucht wurden je nach Versuchsansatz mit verschiedenen Auxotrophiemarkern supplementiert (Tab. 17).

**Tabelle 17: Medien und DO- Lösungen für *S. cerevisiae*.**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
YPDA	10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 30 mg Adenin-Hemisulfat; pH 6.5; 50 ml einer sterilfiltrierten 40% Glukose- Lösung (nach dem Autoklavieren zugeben)
SD-Medium	6,9 g Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids; 100 ml 10x DO- Lösung; pH 5.8; 50 ml einer sterilfiltrierten 40% Glukose- Lösung (nach dem Autoklavieren zugeben)

DO -Leu (10x)	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 (10x)	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 (10x)	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) (10x)	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
DO -Leu -Trp -His -Ade (QDO) (10x)	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

#### 5.4.1. Hefe- Zwei- Hybrid Analysen

Für die Kreuzung (*mating*) wurden jeweils die beiden Köderstämme yCoS4 und yCoS5 (*bait*) in 12 ml SD- Trp angeimpft und bei 30°C, 220rpm inkubiert. Nachdem die Zellen eine Dichte von ca 10<sup>8</sup> Zellen erreicht haben, wurde die Kultur in einen sterilen Schikanenkolben mit 45ml YPDA (mit Ampicillin und Kanamycin) überführt und 1ml der cDNA- Genbibliothek (*library*) zugegeben und bei 30rpm, 30°C für 24h inkubiert. Nachdem bei der mikroskopische Kontrolle diploide Zellen zu erkennen waren, wurde die Kultur abzentrifugiert, gewaschen und verschiedene Konzentrationen auf Platten mit SD- Leu, SD- Trp, SD- Leu/-Trp (zur Ermittlung der Kreuzungseffizienz) und SD-QDO (Identifikation der Interagierenden Klone) ausplattiert. Anschließend wurde der Prozentsatz der Diploiden Zellen bestimmt, was auch als Matingeffizienz bezeichnet wird. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die großen Kolonien der SD-QDO Platten gepickt und für den β- Glaktosidasetest und für die anderen Versuche erneut ausgestrichen. Von den gepickten Kolonien erfolgte die Plasmidisolierung aus Hefe, dann die Transformation in *E. coli* und anschließend die Präparation der Plasmid DNA durchgeführt. Wichtig dabei war es, die transformierten *E.coli* Zellen auf LB<sup>Amp</sup> auszuplattieren, da sich in der Isolierten DNA aus den Hefestämmen beide Plasmide (*prey* und *bait*) befinden, aber nur nach dem interagierenden Protein der cDNA Bibliothek in dem



Plasmid pGADT7 (*prey*) gesucht wurde, das die Ampicillin- Resistenz trägt.

#### 5.4.1.1. $\beta$ - Galactosidase- Test

Mittels dem  $\beta$ -Galaktosidase *Colony- lift- Filter- Assay* wird die  $\beta$ - Galactosidase Aktivität der Kandidatenklone der Hefe- Zwei- Hybrid Analyse qualitativ bestimmt. Die transgene  $\beta$ - Galactosidase unter der Kontrolle des *gal4* Promotors hydrolysiert das Substrat X- Gal (5-Bromo- 4- chloro- 3- indolyl-  $\beta$ - D- Galactopyranosid), was dann zu einer Blaufärbung der Kolonien führt und die Interaktionsstärke visualisiert. In eine leere Petrischale wurde ein steriler Whatman- Filter (den Plattenboden ausfüllend) gelegt und mit einer Lösung aus Z- Puffer und X- Gal befeuchtet. Ein zweiter, steriler Filter wurde auf die Agarplatte mit den 4 Tage alten Hefekolonien der Kandidatenklone gelegt, sodass diese am Filter haften bleiben. Dieser Filter mit den gestempelten Hefekolonien wurde anschließend in flüssigen Stickstoff getaucht um die Zellen so aufzuschließen und damit die intrazelluläre  $\beta$ - Galactosidase freizusetzen. Nach kurzem Auftauvorgang des Filters bei Raumtemperatur wurde dieser mit den Kolonien nach oben zeigend auf den zweiten, mit Z- Puffer<sup>X- Gal</sup> getränkten Filter gelegt. Die Spaltung von X- Gal durch die  $\beta$ -Galactosidase soll abhängig der Interaktionsstärke zu einer Blaufärbung der Kolonien führen. Ergänzend zu den entsprechenden Kandidatenklonen wurde die Positivkontrolle RecT- p53 mitgeführt. Im Falle einer stark positiven Interaktion, sollte die Blaufärbung der Kolonien innerhalb von 30 min bis 8 h auftreten.

**Tabelle 18: Lösungen für den  $\beta$ - Galactosidase- Test mit *S. cerevisiae* Kolonien.**

Lösungen	Zusammensetzung (pro Liter)
Z- Puffer	16,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 5,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5g KCl; 0,246 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
X- GAL	20 mg/ml in DMF (Stammlösung)
Z- Puffer <sup>X-GAL</sup>	100 ml Z- Puffer; 0,27 ml $\beta$ - Mercaptoethanol; 1,67 ml X- Gal Stammlösung

## 6. Molekularbiologische Methoden

### 6.1. Isolierung genomischer DNA aus *A. nidulans* und *N. crassa*

Um Myzel aus *A. nidulans* und *N. crassa* zu gewinnen wurden Petrischalen mit etwa 20 ml Minimalmedium dick mit Sporen beimpft und bei 37°C inkubiert. Nach 12- 15 Std. wurde die aufschwimmende Kahmhaut geerntet, zwischen Papierhandtüchern trockengepresst und mittels flüssigen Stickstoffs gefriergetrocknet. Das Mycel wurde anschließend fein gemörsert und in Extraktionspuffer (50 mM EDTA; 0,2% SDS) bei 68°C aufgeschlossen. Dann wurden die Proteine mit einer 8M Kaliumacetatlösung gefällt und abzentrifugiert. Außer einer

alkoholischen Fällung erfolgte keine weitere Reinigung der genomischen DNA.

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

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

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

**Tabelle 19: Lösungen zur Plasmid-Minipräparation aus *E.coli*.**

Lösungen	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer (100 ml)	5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 ; 2 ml 0,5 M EDTA pH 8.0; 10 mg RNase
Lysispuffer	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Kaliumacetatlösung	1,5 M Kaliumacetat, pH 4.8
TE- Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 mM EDTA pH 8.0

### 6.3. Präparation von Plasmid- DNA aus *S. cerevisiae*

Jeweils in 2 ml Selektionsmedium wurden die Köderstämme (*bait*) mit SD- Trp und die *prey*- Stämme mit SD- Leu angeimpft. Nach 48 h bei 30°C und 220rpm wurden die Kulturen abzentrifugiert. Zum Abbau der Zellwand wurde das Zellpräzipitat in 500 µl Glucanex- Lösung resuspendiert und 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die dabei entstandenen Protoplasten pelletiert und in 250 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 50 µl Lysispuffer zugegeben und 30 min bei 68°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl Kaliumacetatlösung gestoppt und dann eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, um die zellulären Komponenten, das Proteinpräzipitat, zusammen mit der genomischen DNA von der Plasmid-

DNA zu trennen. Die im Überstand gelöste Plasmid- DNA wurde dann mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen und in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

**Tabelle 20: Puffer zur Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*.**

Puffer	Zusammensetzung pro Liter
Glucanex- Lösung	120 mg/ml Glucanex; 60 mg/ml BSA
Resuspensionspuffer	50mM TrisHCl pH 7.5; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Lysispuffer	10% SDS
Kalciumacetatlösung	1,5 M KAc pH 4.8

#### 6.4. PCR (Polymerasekettenreaktion)

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

**Tabelle 21: Verwendete Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
<b><i>uncA</i> Amplifizierung</b>	
<i>uncA_AscI_fwd</i>	GGGCGCGCCCGGCARGGCGCCAGGAGGTGGTG
<i>uncA_PacI_rev1</i>	CTTAATTAACCTAGCACCGGTGGCTCCAGTCG
<i>uncA_linker_PacI</i>	GTT AAT TAA TTA CTT CGC TCG TAA CTG TGC CAG
<i>uncA_linker_rev</i>	GTT AAT TAA TTA CTT CGC TCG TAA CTG TGC CAG
<i>uncA_spec_fwd</i>	GGG CGC GCC CGG CAT GCT CCA AGT GCA GGG GCG G
<i>uncA_1kb<sup>tail</sup>_XbaI_fwd</i>	GGC TCT AGA GAC AAT GCC GAT GGA ACG
<i>uncA_1kb<sup>tail</sup>_AscI_fwd</i>	GGG CGC GCC CGG CAT GGA CAA TGC CGA TGG AAC G
<i>80aa_fwd_xbaI</i>	GGC TCT AGA CTC CAA GTG CAG GGG CG
<i>AscI_uncA_3kb_fwd</i>	GGC GCG CCG CTT GAA AAC CCG TTC TCC GAG

<i>NotI</i> _RB_uncA_fwd	GCG GCC GCA TCC CGC CTA TTA TCT AG
<i>AscI</i> _RB_uncA_rev	CGG CGC GCC CTG AGT GTC ATT TAC TC
uncA_3kb_fwd_ <i>EcoRI</i>	CGA ATT CAT GAG GCA ACT GCA CCA GTA C
<i>EcoRI</i> _uncA_fwd	GGA ATT CAT GGC GCC AGG AGG TG
uncA_linker_ <i>XbaI</i> _rev	GCT CTA GAT TAG CCA AGC TTC GCT CGT AAC TG
uncA_oPH_ <i>SmaI</i> _rev	GTT CCC GGG TTA AGC GTA GAA CCG CGG CG
uncA_oM_ <i>EcoRI</i> _rev	GGA ATT CCG TTA TGC CGA CTC TGC GAA G
uncA_linker_ <i>SmaI</i> _rev	GTT CCC GGG TTA GCC AAG CTT CGC TCG
uncA_oM_ <i>XbaI</i> _rev	GGT CTA GAT CAT CTC CCG GAC CTG TTG G
uncA_full_ <i>SmaI</i> _rev	GTT CCC GGG TCA TCT CCC GGA CCT GTT G
uncA_RB_linker_fwd	CCG GGA GAT GAT TAA TTA AGC TCT ATG TCT TCG TGG CTG
<i>KpnI</i> _86aa_fwd	GCG GTA CCA CGT ATA TAC GCC CGC AAT CG
<i>KpnI</i> _86aa_rev	CCG GTA CCA CGC CTG CGC CGT CGG C
uncA_ <i>PacI</i> -pSN_fwd	GTT AAT TAA CAT GGC GCC AGG AGG TGG
uncA_ <i>XbaI</i> -pSN_fwd	GTC TAG ATC ATC TCC CGG ACC TGT TGG
<b><i>kinA</i> Amplifizierung</b>	
<i>kinA</i> _Sacl_fwd	GCG GAG CTC AAA CAG TTA CTT CGC CG
<i>kinA</i> _PacI-pSN_fwd	CTT AAT TAA CAT GGC GTC CTC TAC CTC TAA C
<i>kinA</i> _XbaI-pSN_rev	GTC TAG ATC ATC GTC TAT CAA AAA ACC AAC TGG
<b><i>kipA</i> Amplifizierung</b>	
<i>kipA</i> _1.6kb_ <i>XbaI</i> _rev	CTC TAG ACA CGC GGC TGC CTG CAT CAC CAC CGC C
<i>kipA</i> _AscI_fwd	GGG CGC GCC CGG GAT GTC TAC ACT GCC GCA G
<i>kipA</i> _tail_ <i>XbaI</i> _fwd	GTC TAG AGA GCA GAA GAG GCG TTT GGT GG
<i>kipA</i> _tail_ <i>PacI</i> _rev	GTT AAT TAA TCA TGC ACT TGG ACG ACT GTT TAG TG
<b><i>tubA</i> Amplifizierung</b>	
<i>XbaI</i> _tubA_fwd	GCT CTA GAG CAT GAG AGA AGT CAT TAG TTT G
tubA_ <i>Clal</i> _rev	CCA TCG ATT TAG TAC TCA ACT TCC TCA CC
tubA_-Y_ <i>Clal</i> _rev	CCA TCG ATT TAC TCA ACT TCC TCA CCC TCC
<b><i>tubB</i> Amplifizierung</b>	
<i>XbaI</i> _tubB_fwd	GAT CTA GAA TAT GCG AGG CGA GGT TTG

tubB_ <i>Clal</i> _rev	CCA TCG ATT TAG TAC TCG GCT TCT TC
tubB_ <i>-Y</i> _Clal_rev	CCA TCG ATT TAC TCG GCT TCT TCG CC
<b><i>uncB</i> Amplifizierung</b>	
UncB1.ATG_ <i>Ndel</i> _fwd	GGA ATT CCA TAT GAT GGC AAC CGA CCG CAC TG
UncB2.ATG_ <i>Ndel</i> _fwd	GGA ATT CCA TAT GAT GGC GCT GGA CCC TCG
UncB_full_ <i>Clal</i> _rev	ATC GAT GGT CAG TTC CCC AAG ATG TCC CC
<b><i>DENN/ MADD</i> Amplifizierung</b>	
AN4349_ <i>Ascl</i> _fwd	CGG CGC GCC TAT GCC CTT TCC CAC ATC
AN4349_ <i>Pacl</i> _rev	CCT TAA TTA ACG AAC ATG GGT ACG TAG TC
AN4349_ <i>Xbal</i> _fwd	CCT CTA GAG GAT GCC CTT TCC CCA CAT C
AN4349_ <i>XhoI</i> _rev	CTA TCT CGA GTT AGG GGG GTG AGA TGG
AN4349_LB_fwd	CTC AAC AAG AGC GGT GCT AAG GTG
AN4349_RB_rev	CAG AGG AGC GCA CGT TCT ATA C
AN4349_ltr1_fwd	CGA GGA GCC ACA ACA ATC
AN4349_ltr1_rev	GGA GGA TAG CGG TCG AG
AN4349_ltr2_fwd	CGA CAA GAA GAA GGC AGG C
AN4349_LB_fwd	CGG AAT TCC GAC GCT GGT CGA CGC C
AN4349_LB_rev	GCG GTA CCG TTG AGG TGA GAT GGT CG
AN0575_ <i>Ascl</i> _fwd	GGG CGC GCC TAT GGG TGC GTC TCT GAG
AN0575_ <i>Pacl</i> _rev	GCT TAA TTA ACT GAG GAT GCG GGA G
AN0575_RB_rev	GAT GAC AGC TGC GAT GTA CGA G
AN0575_ <i>Xbal</i> _fwd	CCT CTA GAG GAT GGG TGC GTC TCT GAG
AN0575_ <i>Sacl</i> _rev	CTT GAG CTC CTA CGC GAG CAT GCG AG
AN0575_LB_fwd	GAT CAT CCC TGA GCC AGA GAA C
AN0575_LB_fwd	CGG AAT TCC GAC CTG GAT GCC TCA CTG C
AN0575_LB_ <i>KpnI</i> _rev	GCG GTA CCA TTG GCG AGC GAA GAC GG
AN0575_ltr1_fwd	GGC TGC CTG AGA TCC TGG
AN0575_ltr1_rev	CGG CTC GCG ACC AGA CGC
AN0575_ltr2_fwd	CAT CTC CGT TCC GCC TAC
AN0575_ltr2_rev	GGC GTC ACG AGA GTA CTG

***rab3* Amplifizierung**

AN4281\_AscI\_fwd GGG CGC GCC TAT GAA CCC TGA GTG G  
 AN4281\_PacI\_rev CCT TAA TTA ACT CTA TCA GCT TTC CAT AC  
 AN4281\_XbaI\_fwd CCT CTA GAG GAT GAA CCC TGA ATA CGA TTA C  
 AN4281\_BamHI\_rev CAG GAT CCC TAA CAG CAG CCA CC  
 AN4281\_NdeI\_fwd GGA ATT CCA TAT GAT GAA CCC TGA ATA CGA TTA C  
 AN4281full\_PacI\_rev GCT TAA TTA ACT AAC AGC AGC CAC CGG C  
 AN6974\_NdeI\_fwd GGA ATT CCA TAT GAT GGC TGG CAC TAG AAA C  
 AN6974\_AscI\_fwd GGG CGC GCC TAT GGC TGG CAC TAG AAA CTA TG  
 AN6974\_PacI\_rev GCT TAA TTA ACT CTG GAA TGA ACG CTC G  
 AN6974\_XbaI\_fwd CCT CTA GAG GAT GGC TGG CAC TAG AAA C  
 AN6974full\_PacI\_rev GCT TAA TTA ATC AAC AAC ACT TTC CTC CGG C

***pyroA* Amplifizierung**

PacI\_pyro\_fwd CTT AAT TAA GAA TGC AAA ATG CAT CAA AGA AC  
 NotI\_pyro\_rev GCG GCC GCG GAC ATC AGA TGC TGG AT  
 pyro\_compl\_fwd GTC ACG CTC GTC GTT TG  
 pyro\_compl\_rev CTT CCT CAA CCT CTC GAT TC

***hph* Amplifizierung**

hph\_begin\_rev GGA ATA GAG TAG ATG CCG ACC G  
 hph\_fwd GAC AGA AGA TGA TAT TGA AGG AGC  
 hph\_rev GAT TTC AGT AAC GTT AAG TGG AT

***nat* Amplifizierung**

nat\_fwd GAT TTC AGT AAC GTT AAG TGG ATG GCG GCT CTG AGG TGC AGT  
 GG  
 nat\_rev GAC AGA AGA TGA TAT TGA AGG AGT CAG GGG CAG GGC ATG CTC  
 ATG

***Nkin2* Amplifizierung**

Nkin2\_PacI\_fwd CTT AAT TAA CAT GGC TCC AGG CAT GGC  
 Nkin2\_XbaI\_rev GCT CTA GAT CAA AAC CTC AAC TGA CTG  
 Nkin2\_LB\_fwd GGA GAG GTT GGT CGG ATG AAG

Nkin2_920bp_rev	CTA GCC TTG TTT CCC TCG TCC ATC
Nkin2_-1,14kb_fwd	GGA CAT TAG GAC GGA AGC TGG
<b>Deletion von <i>Nkin2</i></b>	
DNkin2_P1_fwd	CGA GCT GTG ATG TTG TCA GAC ATC
DNkin2_P2_rev	ATC CAC TTA ACG TTA CTG AAA TCG GTG GCG CGA GAT AGC TCT AAC G
DNkin2_P3_fwd	CTC CTT CAA TAT CAT CTT CTG TCG GAA GGG ATG GGA TAT GAT GAT G
DNkin2_P4_rev	CGG AGA TTA TTA TTA CTC TAT AGC GC
DNkin2_P7_fwd	CAG AAT CTA GCA CAG GGC ATG C
DNkin2_P8_rev	CTA AGG AGT AGG ACC TAT ATA TAG G
DNkin2_fwd	GTA TGC CAA CCT GAG CTG TTA G
DNkin2_fwd	GGA CGT CTA TAA GTA ATT GTA TTT TAC C
<b><i>Nkin3</i> Amplifizierung</b>	
Nkin3_Pacl_fwd	GTT AAT TAA CAT GCC GAA CTC CCT CGA C
Nkin3_Xbal_rev	CTC TAG ATC ATA TGA TAT TAG TCC TCA C
Nkin3_-1,33kb_fwd	CAT CTG CAG CCA GCT GTT AGC
Nkin3_520bp_rev	GAG CCA GTC TGA CCG TAG G
<b>Deletion von <i>Nkin3</i></b>	
DNkin3_P1_fwd	CTC ACG CCC AGA CCT TGA AC
DNkin3_P2_rev	ATC CAC TTA ACG TTA CTG AAA TCG CGC GGC TCC AAA GAT ATG TCG
DNkin3_P3_fwd	CTC CTT CAA TAT CAT CTT CTG TCA CGA AGT TGG TCT GGA TTC GAC G
DNkin3_P4_rev	GAA TGA GGA GAA GTA GAA CAC CAG
DNkin3_P7_fwd	GAG AGC GGG ATC CAT TTG CAT TG
DNkin3_P8_rev	GGC TTC TCT CCT CCT CTT CAA G
<b><i>Nkin</i> Amplifizierung</b>	
Nkin_Pacl_fwd	GTT AAT TAA CAT GTC GTC AAG TGC GAA TAG
Nkin_Xbal_rev	CTC TAG ATT ACG ACT TCT GGA AGA ACC

**ypt52 Amplifizierung**

Ypt52\_Pacl\_fwd GTT AAT TAA CAT GGC CGA TAC GAA CGC G

Ypt52\_Xbal\_rev CTC TAG ATT AAC AGG CGC AAC CTT CC

**Umkin-3 Amplifizierung**

Um\_kin3\_AscI\_fwd CGG CGC GCC TAT GGC CGA CTC GGG C

Um\_kin3\_Pacl\_rev CTT AAT TAA TCA GCA AAA CAC ATG GCC CGC

**Amplifizierung der Hefe- Zwei- Hybrid Kandidaten**

AN8179\_AscI\_fwd CGG CGC GCC TAT GAA TAA TAA CAG CAA ACA AAT ACC

AN8179\_Pacl\_rev CCT TAA TTA ACC AAC TCT GGA CTC TGG C

AN2941\_AscI\_fwd GGG CGC GCC TAT GTT CAT TGA CCA TCG G

AN2941\_Pacl\_rev CCT TAA TTA ACT GCA TGG CAG TCC ATC

AN2941\_check\_rev GCC TGA TGA TGC TGG TGT TAG

AN2941\_EcoRI\_fwd GCG AAT TCA TGT TCA TTG ACC ATC GG

AN2941\_BamHI\_rev GCG GAT CCT CAA TAA CTG GAA AAA GAG

AN2941\_LB\_rev GAA CAG TTC CTT AAT GAA CCT GG

AN2941\_check\_rev GCT TGT GGT TGG CCT GAG CTT G

AN11317\_AscI\_fwd CGG CGC GCC TAT GCT TCG CAC CGC TCC

AN11317\_Pacl\_rev CCT TAA TTA ACG TGT TAG CTG GCC GAC AC

AN11317\_LB\_rev CAT CGA ACA GGT AAA CTC TGG C

AN11317\_check\_rev CGG GTC AAT GCT AAC AGT GTT TC

AN11317\_EcoRI\_fwd CCG AAT TCA TGC TTC GCA CCG CTC

AN11317\_Xbal\_rev GGT CTA GAC TAT TTC TCG CCG AAC CAG

AN11317\_RB\_fwd GTG TAG TGC CAG TAC GAG TG

AN10190\_AscI\_fwd CGG CGC GCC TAT GAG CTG TGA CAT ATG CAC

AN10190\_Pacl\_rev CCT TAA TTA ACG AAG GTC AAG GAT ACC

AN10190\_EcoRI\_fwd CGG AAT TCA TGA GCT GTG ACA TAT GC

AN10190\_Xbal\_rev CCT CTA GAT CAC CTA TGT CTA AGT TTA GTC C

AN6009\_AscI\_fwd CGG CGC GCC TAT GAC TAC AGA TAG TGC CCT GTC

AN6009\_Pacl\_rev GCT TAA TTA ACA TAC ATG CCG GGT GG

AN6009\_NdeI\_fwd CAA CAT ATG ATG ACT ACA GAT AGT GCC



AN6009_Xbal_rev	CGT CTA GAT CAC CTA TAC GTG ATC AC
AN1646_AscI_fwd	CGG CGC GCC TAT GGC GTC CGA AGC TAA C
AN1646_PacI_rev	CCT TAA TTA AGT TGC AAT CAG TCA GGT GAC
AN0865_AscI_fwd	CGG CGC GCC TAT GGC CTC GAC ATA CCC
AN0865_PacI_rev	CCT TAA TTA AGC GTA GCT GCT GCT CTC
<b>Amplifizierung von potenziellen UncA Interaktoren</b>	
AN5378_AscI_fwd	GGG CGC GCC TAT GGC CGC GGC TTG G
AN5378_PacI_rev	GCT TAA TTA AGC GTG GCA GGT ATG TAT G
AN5378_EcoRI_fwd	GTG AAT TCA TGG CCG CGG CTC G
AN5378_Xbal_rev	CCT CTA GAC TAA TCC TTC TCC GCA TCC TC
AN5378_check_rev	GAG CAG ACT GTC CAA TCC ATG
AN5378_LB_rev	GTA GGC ATC CAG GAG CAG ATA
AN5378_check_rev	GCC ACC ACC AAC GTA CGA CG
P-AN5378_EcoRI_fwd	CAT GAA TTC GGA ATC TCA TAA CTG CAT C
P-AN5378_KpnI_rev	GAG GTA CCG GCA AAT TCG AGT TGA TTG
AN1117_AscI_fwd	GGG CGC GCC TAT GGC GCA AAT TCG
AN1117_PacI_rev	CCT TAA TTA ACT GAC AAC CAC GCG C
AN1117_EcoRI_fwd	GTG AAT TCA TGG CGC AAA TTC GTG
AN1117_Xbal_rev	CCT CTA CAT TAA TAG ACC TTC TTC TTC TCG
AN1117_check_rev	GTG CAG CTG ATG CAT TGT CAG
AN6323_AscI_fwd	CGC GCG CGC CTA TGG CCG AGC TTA CCA TCG
AN6323_PacI_rev	GCT TAA TTA ACT ACC GAC AAT AGA CGC GAG G
AN0706_AscI_fwd	CGG GCG CGC CTA TGT TTC GAA TCC TCG AAT C
AN0706_PacI_rev	GCT TAA TTA ACT AGT TGA GCC TTA GCA GGT TG
AN4207_AscI_fwd	CGG GCG CGC CTA TGG CAT CCC GTG AGT TTC
AN4207_PacI_rev	GCT TAA TTA ACT ACT TCA GAG CAC GCA CAA G
AN12171_AscI_fwd	CCG GCG CGC CTA TGG ACC ACG CAG ATC C
AN12171_PacI_rev	GCT TAA TTA ACT AGC CAA CAT CAT CGA CAA G
nudM_P1_fwd	GCG GCA CTC TCG AAG AAC TCG
nudM_P2_rev	CTC CAG CGC CTG CAC CAG CTC CAA AAG GTC GGT TCA ATA GCA

nudM_P3_fwd	ATC AGT GCC TCC TCT CAG ACA GCAG ACC TTT TCT ATG GGC TG
nudM_P4_rev	CGA TTA CCG GTT CGT ACA CC
nudM_P7_fwd	GCC TTG GAT TGC ACG AGC CG
nudM_P8_rev	CTG GGC TGG ATT GCT GGT CAC
<b>Standardprimer</b>	
GFP Innen Primer	CCATTACCTGTCCACACAATCTGCC
Af_pyrG_begin_rev	GGT CAA TCA CTG GTA ACT CCA CG
alcA_end_fwd	CAA CAG TTC TCT ACT CAG TTA ATT AGC
GFP_pSN_fwd	CAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA G
mcherry_pJV16_fwd	GAA TGG TGA GCA AGG GCG AGG AG
pyrG_cassette_rev	CTG TCT GAG AGG AGG CAC TGA T
GFP-GA-linker	GGA GCT GGT GCA GGC GCT G
YFP-C_fwd	ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC
YFP-N_fwd	ATG GTG AGC AAG GGC GAG G

---

### 6.5. Site- directed mutagenesis

Das Einführen der *rigor* Mutation wurde mit Hilfe des QuickChangeXL Site- directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde für UncA G116E modifiziert und für dessen Homolog Nkin2 in *N. crassa* wurde das G115E ausgetauscht. In KipA wurde G223E modifiziert und für das konventionelle Kinesin, KinA, wurde das G97E verändert, in dessen *N. crassa* Homolog Nkin analog G93E und in Nkin3 (UncB Homolog) T146P und G149E. Auch zum Einbringen von Restriktionsschnittstellen und Stoppkodons an spezifischen Sequenzen wurde diese Methode verwendet. Für diese PCRs wurde die *Pfu-Turbo-Polymerase* (Stratagene, Amsterdam) verwendet, die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 22 aufgeführt. Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde die DNA für 1 min bei 95°C denaturiert. Dann folgten 18 Zyklen bei 95°C 50 s, 60°C 50 s, 68°C 7 bis 12 min (1 min pro kb), sowie ein finaler Amplifikationsschritt von 7 min bei 68°C. Anschließend wurde das methylierte Vorlagen-Plasmid mit *DpnI* verdaut und das mutierte Plasmid in TOP10-Zellen transformiert. Die Punktmutationen wurden mittels Sequenzierung (MWG, Ebersberg) bestätigt.

**Tabelle 22: Für die *site-directed mutagenesis* verwendete Oligonukleotide** (gewünschte Mutation ist **fett** markiert).

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
UncA P-Loop Gly fwd	GGT CAG ACC GGT TCG <b>GAG</b> AAG TCT TAC TCG
UncA P- Loop Gly rev	CAG GTA ADA CTT <b>CTC</b> CGA ACC GGT CTG ACC
KinA rigor P-Loop fwd	CGG TCA AAC CGG TGC <b>AGA GAA</b> GTC GTA TAC
KinA rigor P-Loop rev	GTA TAC GAC TTC <b>TCT</b> GCA CCG GTT TGA CCG
Nkin rigor P-Loop fwd	CGG CCA GAC GGG TGC <b>CGA GAA</b> ATC ATA CAC
Nkin rigor P-Loop rev	GTG TAT GAT TTC <b>TCT</b> GCA CCC GTC TGG CCG
Nkin2 rigor P-Loop fwd	GGT CAA ACC GGT TCC <b>GAG</b> AAG TCC TAC TCG
Nkin2 rigor P-Loop rev	CGA GTA GGA CTT <b>CTC</b> GGA ACC GGT TTG ACC
Nkin3 rigor P-Loop fwd	GGT CAG <b>CCT</b> GGC TCG <b>GAG</b> AAG TCT TAT AC
Nkin3 rigor P-Loop rev	GTA TAA GAC TTC <b>TCC</b> GAG CCA <b>GGC</b> TGA CC
KipA G223E fwd	GGT ATG ACC GGA ACT <b>GAG</b> AAA ACC TTT TCT ATG
KipA G223E rev	CAT AGA AAA GGT TTT <b>CTC</b> AGT TCC GGT CAT ACC
UncA Q1314stop fwd	CAG AGC TTA ACG CTT <b>AGA</b> AAG GCG CAC TTA GC
UncA Q1314stop rev	GCT AAG TGC GCC TTT <b>CTA</b> AGC GTT AAG CTC TG
UncA A1402stop fwd	CGC TCC AAG TGT <b>AGG</b> GGC GGA CGT ATA TAC
UncA A1402stop rev	GTA TAT ACG TCC GCC <b>CCT</b> ACA CTT GGA GCG

## 6.6. Einfügen und Deletieren von Domänen via Mutagenese-PCR (*moving window*)

Zur Insertion bzw. Deletion von Domänen wurden Oligonukleotide gewählt, die am 5' Ende ein Phosphatrest besitzen und im Falle von Insertionen Überhänge beinhalten. Diese Primer binden direkt an der zu modifizierenden Stelle, hierbei muss das Leseraster unbedingt beachtet werden. Das gesamte Plasmid wurde anschließend mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert und hierdurch spezifisch Sequenzen eingebracht bzw. deletiert. Das durch Expression in *E.coli* methylierte Ausgangsplasmid wurde anschließend mit *DpnI* verdaut. Durch die Phosphatreste am 5'Ende konnte das neu amplifizierte Plasmid mittels der T4-Ligase ligiert und in *E. coli* transformiert werden.

**Tabelle 23: Für diese Methode verwendete Oligonukleotide** (gewünschte Mutation ist **fett** markiert).

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
del80aa fwd	GTG CAG GGG CGG CGT ATT GCA GAG CTT AAC G
del80aa rev	CGT TAA GCT CTG CAA TAC GCC GCC CCT GCA C
del FHA fwd	CCC CAG GAA GCA AGG GCT GAA C (PHO)
del FHA rev	CTT TTT CGG TGT ACT CAA ACC GAT AAA TCC (PHO)
del CC2+3 fwd	CAC CCA GTG CCA AGA ATC TAC GAG AAT G (PHO)
del CC2+3 rev	CAT ATG AGC AAG CCT ATC CGG ATC CAT C (PHO)
KinA-Kpnl-N <sup>904</sup> fwd	AAC GAA CCT GTC GCG GCC GTC CAG (5'PHO)
KinA-Kpnl-N <sup>904</sup> rev	<b>GGT ACC</b> GCC TCC GCC GCC GCC AC (5'PHO)
KinA-Kpnl-G <sup>731</sup> fwd	AGC AAG AGC CTA CAA CAG CAG ATT GC (5'PHO)
KinA-Kpnl-G <sup>731</sup> rev	<b>GGT ACC</b> GGC AGC GCC ATT GGT GGA C (5'PHO)
KinA β5L8 loop fwd	<b>TGT TGG AGG ACC CGA TGA</b> GGT TTA CGA AGT CAT GCG (5'PHO)
KinA β5L8 loop rev	<b>AAC CGT TCG GTG GCA</b> CCT TTG ACA TAA ACA CCT C (5'PHO)
uncA_del6R fwd	ATT GCA GAG CTT AAC GCT GCG AAA GGC
uncA_del6R rev	AGA GGT GAT ATA GTC ACG AAC AAG CGA GAC

### 6.7. DNA- Restriktionsspaltung, Agarose- Gelelektrophorese

Der Restriktionsverdau wurde mit 10 µl Gesamtvolumen angesetzt und von dem Restriktionsenzym wurden 0,5 µl eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 bis 2 h bei 37 °C in den vom Hersteller angegebenen Puffern inkubiert. Anschließend wurden die DNA- Fragmente auf ein 1 %-iges Agarose-Gel aufgetragen und in 0,5-fachen TAE-Puffer (50x Stammlösung: 40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden zum Beladen der Geltaschen mit Ladepuffer versetzt. Zum Vergleich wurde ein Größenmarker (1kb DNA Ladder; NEB) mitgeführt. Die Gele wurden für 15 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/µl in 0,5xTAE) gefärbt, die DNA-Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Für weitere Klonierungsschritte wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (Zymoclean gel extraction kit, Zymo Research, UK).

### 6.8. Dephosphorylierung von verdauter DNA

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

*blunt end* Ligationen eingesetzt.

### **6.9. Phosphorylierung von PCR- Produkten**

Nach der Aufreinigung von PCR-Produkten für *blunt end* Ligationen wurden diese mit der *T4 Polynukleotid Ligase* (PNK) behandelt, was zur Phosphorylierung des 5´ Endes der DNA führt und somit die Ligationsrate mit dephosphorylierten Vektoren deutlich erhöht.

### **6.10. DNA- Ligationen**

Ligationen wurden mit der *T4 Ligase* von NEB (Frankfurt) bei 16°C über Nacht in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Konzentrationen der Insert- bzw. Vektor- DNA wurden vorher photometrisch gemessen. Für die Ligation von kohäsiven Enden lag das Verhältnis von Vektor zu Insert bei etwa 1:3. Für TA- Klonierungen wurden die PCR-Produkte direkt in pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert.

### **6.11. Transformation**

Mit Hilfe von Transformationen wurde das Genom der Organismen gezielt modifiziert. Hierfür gibt es verschiedene Methoden die Zellen "kompetent" zu machen, so dass diese fremde DNA aufnehmen können.

#### **6.11.1. Transformation von *E. coli* Zellen**

*E. coli* wurde in dieser Arbeit lediglich als Wirt verwendet, um Plasmid- DNA zu vervielfältigen. Zwei unterschiedliche Methoden wurden hierfür herangezogen: Zum einen wurden chemo- und zum anderen elektrokompente Zellen mit den im Folgenden beschriebenen Protokollen transformiert.

##### **6.11.1.2. Chemokompente Transformation**

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

##### **6.11.1.2. Elektrokompente Transformation**

Die bei - 80 °C gelagerten elektrokompenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 5 µl der Hefe- Plasmid- DNA vermischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde ein Elektroschock bei 200 OHM, 25 µFD und 2,5 KV durchgeführt. Nach anschließender Zugabe

von 300 ml vorgewärmtem SOC- Puffer wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf vorgewärmte LB- Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

### 6.11.2. Transformation von *A. nidulans*

#### 6.11.2.1. KCl- Methode

Für die Transformation von *A. nidulans* (Yelton *et al.*, 1984) wurden 500 ml Minimalmedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern mit etwa  $10^9$  Konidien inokuliert. Die Pilzsuspension inkubierte je nach Stamm für 12- 15 h bei 30 °C auf einem Schüttler (180 rpm). Anschließend wurden die jungen Hyphen über ein Stück steriles Miracloth filtriert und mit Myzel-Waschlösung (MWL) gründlich gewaschen. In 5 ml osmotischem Medium (OM) wurde das Myzel resuspendiert und nach Zugabe von 180 mg Glucanex (GeWe, Bad Kreuznach) für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 10 mg BSA zugegeben und für 1-3 h bei 30 °C und 70 rpm inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Protoplasten wurden sie durch Gradientenzentrifugation vom restlichen Myzel getrennt, in dem die Myzelsuspension mit 10 ml Überschichtungs-Puffer (ÜP) vorsichtig überschichtet und 18 min bei 5000 g in einem HB-6 Ausschwingrotor (SORVALL, Bad Homburg) zentrifugiert wurde. Die Protoplastenbande, die sich an der Phasengrenze gebildet hatte, wurde vorsichtig entnommen, mit Sorbitol- Tris- Kalzium- Puffer (STC) gewaschen und anschließend 10 min bei 7000 g pelletiert. Die gewaschenen Protoplasten wurden in 200 µl STC resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Helber-Zählkammer (Firma W. Schreck, Hofheim) bestimmt. Für einen Transformationsansatz wurden etwa  $10^6$  Protoplasten in 100 µl STC aufgenommen. Zu den Protoplasten wurden 5-10 mg DNA (in 100 µl STC gelöst) zugegeben und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml Polyethylenglykol-Lösung (PL) und eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min. Nach Zugabe von 8 ml STC wurde der Ansatz auf drei große Platten (MM mit 0,6 M KCl) verteilt und für 3 Tage inkubiert.

**Tabelle 24: Lösungen für die KCl- *Aspergillus*- Protoplastentransformation.**

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

### 6.11.2.2. MMR- Methode

Für dieses alternative *A. nidulans* Transformationsprotokoll wurden 300 ml Minimalmedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern mit etwa  $10^9$  Konidien inokuliert. Die Pilzsuspension inkubierte je nach Stamm für 12- 15 h bei 30°C auf einem Schüttler (180 rpm). Anschließend wurden die jungen Hyphen über ein Stück steriles Miracloth filtriert und mit sterilem Wasser gewaschen. 1 g des gewaschenen Myzels wurde entnommen und in 10 ml Lösung 2 in einem 50 ml Falcon resuspendiert. Nach Zugabe von 200 mg GlucanX (GeWe, Bad Kreuznach) wurde das Myzel für 5 min auf Eis gestellt. Zum Verdau der Zellwand wurde die Myzellösung in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und für 1,5 h bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Protoplasten wurde 10 ml Lösung 2 zugegeben und die Protoplasten auf zwei 50 ml Falcons aufgeteilt. Diese wurden dann vorsichtig mit Lösung 5 überschichtet und 12 min bei 4.000xg bei 4 °C zentrifugiert. Die Protoplastenbande, die sich an der Phasengrenze gebildet hatte, wurde vorsichtig entnommen, mit zweifachem Volumen von Lösung 6 gewaschen und anschließend 12 min mit 2.800xg bei 4 °C pelletiert. Die gewaschenen Protoplasten wurden in 200- 1000 µl Lösung 7 (je nach Anzahl der Transformationsansätze; 200 µl pro Ansatz) resuspendiert. Zu den Protoplasten wurden 5-10 µg DNA (in 50 µl Lösung 7 gelöst) zugegeben und mit 50 µl Lösung 8 für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 1 ml Lösung 8 weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung 7 wurde der Ansatz mit handwarmem Top-Agar auf 30 ml aufgefüllt und auf 3 MMR-Platten aufgeteilt und für 3 Tage inkubiert.

**Tabelle 25: Medien für die *Aspergillus*- MMR- Protoplastentransformation.**

Lösungen und Medien	Zusammensetzung
Glukose (10x)	200 g Glukose pro Liter; autoklavieren
Ammonium Ttrat (100x)	9,2 g pro Liter
MMR (500ml)	10 ml Salzstammlösung (ohne Stickstoff); 0,5 ml Spurenelementlösung; 171 g Saccharose; 7,5 g Agar; pH 6.8; nach dem Autoklavieren 10ml Ammoniumttrat und 50 ml Glukose (10x) zugeben
MMR- TOP (500ml)	10 ml Salzstammlösung (ohne Stickstoff); 0,5 ml Spurenelementlösung; 171 g Saccharose; 3 g Agar
Lösung 2 (50ml)	14,9 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ; 1,8 ml $0,2MNa_2HPO_4$ ; 0,7 ml $NaH_2PO_4(0,2M)$ ; pH5.5; steril filtrieren
Lösung 5 (100ml)	10,9 g Sorbitol; 10ml 1M TrisHCl pH7.5

Lösung 6 (100ml)	18,22 g Sorbitol; 1ml 1M TrisHCl pH7.5;
Lösung 7 (100ml)	18,22 g Sorbitol; 1ml 1M TrisHCl pH7.5; 1ml 1M CaCl <sub>2</sub>
Lösung 8 (50ml)	30 g PEG-4000 oder PEG-6000; 0,5ml TrisHCl 1M pH7.5

### 6.11.3. Transformation von *N. crassa*

#### 6.11.3.1. Herstellung elektrokompetenter *N. crassa* Zellen

Hierfür wurde jeweils ein 125ml Erlenmeyerkolben, gefüllt mit 25 ml festem Vogel's Minimalmedium, mit einer Impföse voll *N. crassa* Konidien inokuliert und für 7-14 Tage bei 30°C inkubiert. Um die Konidien anschließend zu Ernten, wurden 50 ml steriles dH<sub>2</sub>O in den Erlenmeyerkolben gegeben und das Ganze wurde dann stark gevortext, bis sich alle Konidien in dem Wasser gelöst hatten. Danach wurde die Sporensuspension für 5 min bei 5000 rpm pelletiert und zweimal mit 1 M Sorbitol gewaschen. Zum Quantifizieren der Sporenkonzentration wurde eine 20 fache Verdünnung in einer Zählkammer ausgezählt und eine Konzentration von  $2.5 \times 10^9$ /ml mittels Verdünnen eingestellt. Diese Zellen waren nun zum unmittelbaren Verwenden geeignet, konnten aber auch in aliquotierter Form (60 µl) bei -80°C aufbewahrt werden.

#### 6.11.3.2. Elektroporation von *N. crassa* Konidien

Die *Neurospora* Zellen wurden nicht wie *Aspergillus* durch Protoplastierung, sondern mittels Elektroporation transformiert. Hierfür wurden die Zellen, wenn sie gefroren waren, zweimal mit 1 ml 1M Sorbitol gewaschen und anschließend jeweils bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorffzentrifuge für 2 min pelletiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Konidien erneut in ca. 60 µl 1M Sorbitol resuspendiert. Zur Transformation wurden 500 bis 1000ng linearisierte und dephosphorylierte Plasmid-DNA in einem Volumen von 10 µl verwendet. Die Konidien wurden auf Eis mit der DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit 0,2 mm *gap* überführt. Sorgfältig abgetrocknete Küvetten wurden mit einem Elektroporator, hier Biorad Gene Pulser Elektroporator, bei 600 OHM, 25 µFD und 1,5 KV transformiert; der Puls dauerte ungefähr 12-14 msec. Sofort danach wurde 1 ml gekühltes 1M Sorbitol auf die Zellen gegeben und die Transformanten wurden auf 4 Platten FIGS Agar (mit Selektionsmarker) ausplattiert und für 5 Tage bei 30°C inkubiert. Auf diesem Agar wächst *N. crassa* Hefe ähnlich und zeigt Koloniewachstum und produziert erst nach mehr als einer Woche das markante Luftmycel, welches ein Vereinzeln der einzelnen Klone unmöglich macht.



**Tabelle 26: Medien für die *N. crassa* Transformation.**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
FIGS (10x)	200 g Sorbose, 5,0 g Fruktose; 5,0 g Glukose
Vogel's FIGS Medium	20 ml Salzstammlösung; 1,5 % Agar; 100 ml FIGS (10x) (nach dem Autoklavieren zugeben)
Topagar	20 ml Salzstammlösung; 15 g Saccharose, 1 % Agar;

### 6.11.3. Transformation von *S. cerevisiae*

#### 6.11.3.1. Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Hefen wurden 25 ml YPDA mit je einer Kolonie von AH106 oder Y187 angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurde 1 ml entnommen und in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml YPDA Medium überführt. Die Kultur wurde 4-6 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine OD600 von 0,5 bis 0,7 erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 15 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und 3 min bei 500 g wieder abzentrifugiert. Anschließend wurde nochmals mit 10 ml SORB- Medium gewaschen und die Zellen für 3 min bei 500 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 360 µl SORB resuspendiert und mit 40 µl *carrier*- DNA (10 mg/ml *salmon sperm DNA*, Invitrogen), die vorher bei 100 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt wurde, versetzt. Die frisch hergestellten kompetenten Zellen wurden innerhalb der nächsten Stunden weiter verwendet oder bei -80 °C aliquotiert gelagert.

#### 6.11.3.2. Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation kompetenter *S. cerevisiae* Zellen wurden zu den 50 µl Aliquots, die bei 80 °C gelagert und langsam auf Eis aufgetaut wurden, 2 µl Plasmid-DNA (3000 ng/µl) hinzugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren wurden 300 µl LIT-PEG zugegeben und wieder vorsichtig invertiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend für 15 min in 42 °C überführt. Anschließend wurden die Zellen 3 min bei 500g abzentrifugiert und mit 1 ml YPDA- Medium gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 TE-Puffer resuspendiert und auf SD- Platten mit den Selektionsmarkern ausplattiert.

**Tabelle 27: Lösungen für die Transformation von *S. cerevisiae*.**

Lösungen	Zusammensetzung
LIT-PEG	100 mM LiAc; 10 mM Tris-HCl; pH 8.0; 1 mM EDTA; 40 % PEG 3350

SORB	100 mM LiAc; 10 mM Tris- HCl; pH 8.0; 1 mM EDTA/ NaOH; 1 M Sorbitol; pH 8.0 mit Essigsäure einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7.4 ; 1 mM EDTA pH 8.0

### 6.12. DNA- DNA- Hybridisierung (Southern Blot Analyse)

Die Southern Blot Analysen wurden mit DIG markierten Sonden durchgeführt, die nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) hergestellt wurden. Zunächst wurde genomische DNA präpariert, mit einem geeigneten Restriktionsenzym über Nacht verdaut und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Positionen der einzelnen Markerbanden wurden durch Ausstanzen mit einer Pipettenspitze festgehalten. Danach wurde das Gel 10 bis 20 min in 250 mM HCl bei RT gewaschen und anschließend durch zweimaliges Waschen in Denaturierungspuffer denaturiert. Danach wurde das Gel kurz mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und in Neutralisierungspuffer zweimal 15 min neutralisiert. Die Äquilibrierung erfolgte in 20x SSC bei RT. Danach wurde die Blotapparatur wie folgt aufgebaut und das Gel über Nacht geblotet: Eine Brücke von angefeuchtetem (20x SSC) Whatman Papier mit Kontakt zu zwei Vorratsgefäßen mit 20x SSC wurde auf eine Glasplatte gelegt, dann wurde das Gel mit der Oberseite nach unten aufgelegt, dann folgte die in 20x SSC angefeuchtete Membran und darauf drei trockene Lagen Whatman Papier, dann mehrere Lagen saugfähiges Papier und anschließend ein leichtes Gewicht. Nach dem Transfer wurden die Markerbanden mit Bleistift auf der Membran markiert und die DNA auf der Membran durch *UV- crosslinking* (254 nm 1 min pro Seite) fixiert. Die anschließende Prähybridisierung erfolgte 1 h bei 68°C mit vorgewärmten DIG- Standard- Hybridisierungspuffer. Pro ml wurden 2 µl der Sonde (verdünnt in 40 µl dH<sub>2</sub>O) mit DIG- Standard- Hybridisierungspuffer eingesetzt, nachdem sie 5 min bei 100°C aufgekocht wurde. Sonde und Membran wurden so über Nacht bei 68°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion, dazu wurde die Membran erst zweimal bei RT in 2x Waschlösung gewaschen und dann noch zweimal bei 68°C in 0,5x Waschlösung. Danach wurde die Membran 30 min in Blockierungspuffer bei RT geblockt und anschließend der *POD*- markierte Antikörper zur Detektion zugegeben (2 µl in 20 mL frischen Blockierungspuffer) (Roche; Cat. # 11093274910) und 30 min bei RT inkubiert. Zur Detektion wurde die Membran in einen Plastikfilm gewickelt und gleichzeitig mit 1,4 ml geeignetem Farbreagenz (1 ml Lösung A + 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 µl Lösung B mischen) versetzt und für 2 min inkubiert. In der Dunkelkammer wurden anschließend die Autoradiographiefilme auf die Membran gelegt und so lange exponiert, bis Banden zu erkennen waren (1 min bis 2 h).

**Tabelle 28: Lösungen und Puffer für den Southern Blot.**

Lösungen	Zusammensetzung
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; pH7.0 mit konz. HCl
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7.5 mit NaOH
10x Blockierungslösung	10% Blocking reagent in Maleinsäurepuffer
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH; 1,5M NaCl
Neutralisierungspuffer	0,5 M TrisHCl, pH 7.5; 1,5 M NaCl
DIG Standard HYB Puffer	5 x SSC; 0,02 % SDS; 1 % Blockierungslösung; 0,1 % N-Laurylsarcosine
2x Waschlösung	2x SSC; 0,1 % SDS
0,5x Waschlösung	0,5x SSC; 0,1 % SDS
Waschpuffer	0,3 % Tween 20 in Maleinsäurepuffer
Blockierungspuffer	1% Blockierungslösung in Maleinsäurepuffer
AP- Puffer	0,1 M TrisHCl, pH 9.5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Lösung A	200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8.6) 50 mg Luminol (Sigma A4685)
Lösung B	11 mg p-Hydroxycoumarinsäure (Sigma C9008) in 10 ml DMSO lösen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 7. Biochemische Methoden

### 7.1. Zellaufschluss und Proteinextraktion aus *A. nidulans*

Das Myzel einer 24 Stunden lang gewachsenen Flüssigkultur (50 ml) wurde über Miracloth gefiltert, gründlich gewaschen und trocken gepresst. Mit flüssigem Stickstoff wurde es fein gemörsert und in etwa der gleichen Menge Lysepuffer (50 mM Tris, pH 7.9; 0,1 % Triton X 100; 10 % Glycerin; 15 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin; 1 mg/ml Leupeptin; 1 mg/ml Pepstatin) aufgenommen. Das Gemisch wurde 30 min bei 4 °C schüttelnd inkubiert und anschließend bei 10000 g für 15 min abzentrifugiert. Die Konzentration der so gewonnenen Extrakte lag bei 6- 8 mg Protein/ ml. Die Proteinextrakte wurden in Aliquots bei -20°C gelagert.

### 7.2. Fraktionierung von *Aspergillus* mittels Saccharosedichte-zentrifugation

Für die Fraktionierung von *A. nidulans* Zellextrakten wurden 400 ml Minimalmedium (mit Threonin als C-Quelle um den *alcA* Promotor in den korrespondierenden Stämmen zu

induzieren) mit entsprechenden Auxotrophiemarkern und etwa  $10^6$  Konidien angeimpft. Die Pilzsuspension inkubierte 28 h bei 37°C in einem Schüttler (180 rpm). Anschließend wurden die jungen Hyphen über ein Stück Whatman Papier No.1 mittels Vakuumfiltration geerntet und zweimal mit H<sub>2</sub>O und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen und Materialien durchgeführt. Anschließend wurde das Gewicht bestimmt (ungefähr 10 g) und mit 10 ml 5 % Saccharosepuffer gemischt. Danach wurde das Mycel in eine Braunsche Flasche überführt und mit 15 g Glasperlen (425-600 Microns, Sigma) und erneut mit weiteren 10 ml 5 % Saccharosepuffer versetzt. Die Braunsche Flasche wurde mit zwei Gummibändern fixiert und in einem Braunschen Homogenisator (Braun, Melsungen) gespannt und mittels CO<sub>2</sub> Fluss während des Aufschlussprozesses (4 x 30 sec). Der Zellaufschluss wurde lichtmikroskopisch anschließend überprüft. Das Homogenisat wurde in ein 15 ml Falkonröhrchen pipettiert und 5 min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand ohne Glasperlen wurde in ein neues 15ml Falcon überführt. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt.

Ein, zuvor in einem *quick-seal* Beckman Zentrifugenröhrchen (Beckman 344326) mit 10 % bis 65 % Saccharosepuffer generierter, linearer Saccharosegradient (Volumen ca. 35 ml), wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette mit dem *A. nidulans* Zellextrakt überschichtet. Dabei musste strengstens darauf geachtet werden, dass weder während der Herstellung des Dichtegradienten noch während dem Überschichten Luftblasen in dem Zentrifugenröhrchen entstehen, denn dies würde in dem folgenden Zentrifugationsschritt den Saccharosegradienten aufwirbeln und vermischen. Nach dem Überschichten wurde das plastene Zentrifugenröhrchen mittels Hitze verschlossen und anschließend 4 h bei 4°C und 50.000g in einer Beckman L8-70M Ultrazentrifuge mit dem korrespondierenden Beckman 70Ti Rotor zentrifugiert. Danach wurde das Zentrifugat mit einem ISCO Fraktionator mit 70 % Saccharosepuffer fraktioniert. Pro Fraktion wurden 20 sec kalkuliert, was zu einem Volumen von ungefähr 2 ml führte. Zur Analyse der einzelnen Fraktionen wurde jeweils die Proteinkonzentration nach Bradford, sowie mittels eines Refraktometers die Dichte bestimmt. Anschließende Untersuchungen erfolgten mit SDS- PAGE und Western Blot. Die interessanten Fraktionen wurden in ein SDS- Gel geladen, kurz nach Einlauf in das Trenngel ausgeschnitten und zur anschließenden Identifizierung der einzelnen Proteine mittels Massenspektrometrie, LC-ESI-MS/MS, zu der Firma Toplab (Martinsried) gesendet.

**Tabelle 29: Puffer für die Saccharose Dichtezentrifugation.**

Lösungen	Zusammensetzung pro Liter
50mM Phosphatpuffer	0,614 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 6,46 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 8.2
5 % Saccharosepuffer	33mM Phosphatpuffer; 5 % Saccharose
10 % Saccharosepuffer	33mM Phosphatpuffer; 10 % Saccharose

65 % Saccharosepuffer	33mM Phosphatpuffer; 65 % Saccharose
70 % Saccharosepuffer	33mM Phosphatpuffer; 70 % Saccharose

### 7.3. Proteinisolierung aus *S. cerevisiae*

Zur Proteinextraktion wurde von allen Stämmen eine 2 ml Übernachtskultur angesetzt. Diese wurde dann in frisches Medium überimpft und bei 30°C, 220rpm inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Dabei ist zu beachten, dass alle Schritte auf Eis und gekühlt ablaufen um den möglichen Abbau der Proteine durch Protasen zu verhindern. Das Präzipitat wurde in 60°C heißem Hefe- Aufschlusspuffer resuspendiert, in Eppendorfgefäße mit Glasperlen überführt und für 10min auf 70°C erhitzt. Um den Aufschluss der Zellen zu verbessern, wurden die Eppendorfgefäße anschließend stark gevortext. Abschließend wurden die Proben abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei 95°C für 5 min aufgekocht. Anschließend wurden die Proben für die SDS- PAGE verwendet.

**Tabelle 30: Puffer für die Proteinisolierung aus *S. cerevisiae*.**

Lösungen	Zusammensetzung für 100 ml
Aufschlusspuffer- Stammlösung	48 g Urea; 5 g SDS; 4ml 1M Tris- HCl (pH 6.8); 20 µl 0,5 M EDTA; 40mg Bromphenolblau in H <sub>2</sub> O
Aufschlusspuffer <sup>final</sup>	1 ml Aufschlusspuffer- Stammlösung; 10 µl β-Mercaptoethanol; 70 µl Proteaseinhibitorlösung; 50 µl 0,1M PMSF; ergibt 1,13 ml AP <sup>final</sup>

### 7.4. Proteinbestimmung nach Bradford

In Eppendorfgefäßen wurden entweder 800 µl deionisiertes Wasser für den Blindwert oder der Differenzbetrag zwischen Probenvolumen (2 - 10 µl) und 800 µl deionisiertes Wasser für die Probenansätze vorgelegt. Nach Zugabe der entsprechenden Proteinprobe zu den Probenansätzen wurden 200 µl Proteinfärbelösung (Roti-Quant; Roth, Karlsruhe) zu diesen und zum Blindwert zupipettiert und die Ansätze wiederholt durch Schwenken gemischt. Nach 5 min wurde die Absorption der Proben gegen den Blindwert bei 595 nm am Photometer (Pharmacia Ultraspec III) gemessen. In gleicher Weise wurde mit einer Standardproteinlösung (BSA - Rinderserumalbumin, 1 mg/ml) verfahren, wobei in sechs Ansätzen mit 1, 2, 4, 6, 8 und 10 µl eine Eichkurve zur Berechnung der Proteinkonzentration der Proben erstellt wurde.

### 7.5. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese und Western Blot

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgt nach dem diskontinuierlichen System nach Lämmli (1970) in Tris- Glycin- Puffer. Für die Natriumdodecyl-Sulfat Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS- PAGE) wurden 7,5 %ige Gele verwendet. Etwa 20 ml der zu trennenden Proteinlösung wurde mit 4x SDS- Ladepuffer gekocht, davon wurden maximal 25 µl pro Tasche geladen. Die Elektrophorese wurde in der Mini-PROTEAN II von BioRad (München) bei 120 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF Membran (WESTRAN Clear Signal, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Um den Größenstandard sichtbar zu machen und den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurde die Membran mit PonceauS- Lösung gefärbt. Anschließend wurde 30 min mit TBS-T geblockt. Der primäre Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers in TBS-T verdünnt und 1,5 h mit der Membran inkubiert. In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper aus Hase gegen den N-Terminus von GFP (Roche, Mannheim) verwendet. Danach wurde die Membran viermal mit reichlich TBS-T gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Der Sekundärantikörper war gegen Hase-IgG (Sigma, Taufkirchen) gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Danach wurde dreimal mit TBS-T und zweimal mit TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz, die Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers der Reaktionslösungen (Sigma, Taufkirchen).

**Tabelle 31: Lösungen für SDS- PAGE und Western Blot.**

Lösungen	Zusammensetzung
Rotiphorese Gel 30	30 %ige Acrylamid/ Bisacrylamidlg., im Verhältnis 37,5 : 1
Trenngel, 8 %	1,3 ml Rotiphorese Gel 30; 2,3 ml H <sub>2</sub> O; 1,3 ml 1.5 M Tris pH 8.8; 50 µl 10 % SDS; 50 µl 10 % APS; 6 µl TEMED
Sammelgel, 4 %	420 µl Rotiphorese Gel 30; 1,7 ml H <sub>2</sub> O; 310 µl 1 M Tris 6.8; 25 µl 10 % SDS; 25 µl 10 % APS; 2,5 µl TEMED
Ladepuffer (4x)	0,24 M Tris-HCl (pH 6.8); 8 % SDS; 40% Glycerin; 12% DTT; 0.004% Bromphenolblau
Tris-Glycin Puffer	25 mM Tris-HCl; 250 mM Glycin; 0,1% SDS
Transfer Puffer	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 20 % Methanol; pH 8.3
TBS	50 mM Tris, pH 7.4; 200 mM NaCl;
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween 20
Detektionslösung A	50 mM 100 mM Tris-HCl pH 5.8; 12.5 mg Luminol
Detektionslösung B	11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
Coomassie Lösung	0,1 % Coomassie Blau R-250; 50 % Methanol; 10 % Essigsäure

## 8. Mikroskopische Methoden

Die mikroskopischen Beobachtungen und Bilder wurden an einem Zeiss Axio Imager Z.1 mit einer Zeiss AxioCamMR Kamera durchgeführt. Die Aufnahmen von *A. nidulans* und *N. crassa* entstanden mit einem 63er Plan- ApoChromat- Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Jena) und eines 100er Plan- ApoChromat- Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Jena) gemacht. Das Mikroskop und die Kamera wurden mit der Zeiss AxioVision Software bedient. Als Quelle für Fluoreszenzlicht diente eine HBO103 Quecksilberdampfampe (Osram).

Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde das DIC-Verfahren (Differential Interference Contrast, nach Nomarsky) angewandt. Mit dieser Methode werden Unterschiede in der optischen Dichte des Präparats in Kontrastunterschiede des Bildes konvertiert. Damit lassen sich pseudoplastische Bilder erstellen, die allerdings nicht die wahren räumlichen Strukturen wiedergeben.

Nachbearbeitung der Aufnahmen, wie Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Helligkeitsregulierung Korrektur von  $\gamma$ -Werten und Maßstabsskalierung, erfolgte mit Hilfe der Axiovision-Software (Carl Zeiss), ImageJ und Adobe Photoshop.

**Tabelle 32: Verwendete Filter für die Fluoreszenzmikroskopie.**

Fluorophor	Anregungsspektrum (nm)	Emmissionsspektrum (nm)
eGFP	450 - 490	515 - 565
YFP	510 - 20	530
dsRED	546	580
DAPI	365	395
CFP	430	474

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

Um biologisches Material, zum Beispiel auskeimende Sporen mit Hilfe des Mikroskops zu beobachten, wurden Deckgläschen mit Hilfe einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert und in ebenso sterile Petrischalen gelegt. Die Deckgläschen wurden dann mit 400  $\mu$ l des entsprechend mit Auxotrophiemarkern supplementierten Mediums (C- Quelle mit 2% Glycerin statt Glukose bei Untersuchungen von *alcA* regulierten Fusionsproteinen) betropft und danach mit den dazugehörigen Sporen einer frischen Pilzkultur mittels eines sterilen Zahnstochers beimpft. Die Proben wurden bei Raumtemperatur oder bei 30°C jeweils im Dunkeln inkubiert. Um diese Proben am nächsten Tag zu untersuchen, wurden die Deckgläschen aus der Schale genommen, das Medium leicht abgetropft und dann mit der

bewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt, mit Immersionsöl beschichtet und unter dem Mikroskop betrachtet.

Für DAPI- Färbungen (Kernanfärbung) wurden die über Nacht auf Deckgläschen gewachsenen Hyphen mit 25 µl *Mounting Medium mit Vectashield DAPI* (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) für 5 min inkubiert, anschließend wurde das DAPI-Mediumgemisch erneut mit Medium gewaschen und anschließend sofort mikroskopiert.

## 8.2. Präparation von *N. crassa* für die Mikroskopie

Hierfür wurden Minimalmedium- Platten mit entsprechenden Auxotrophiemarkern mit Konidien des zu untersuchenden Stammes am Rand der Petrischale angeimpft und bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Die Keimung beginnt nach ungefähr 10 h, davon abhängig wurde die Inkubationszeit gemessen, je nachdem welcher Zelltyp mikroskopiert werden sollte. Um diese Proben am nächsten Tag zu untersuchen, wurden die Platten für 30 min unter Licht positioniert, um die Expression des *ccg-1* Promotors zu aktivieren. Dann wurde ein Agarblöckchen mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit der bewachsenen Seite nach oben auf einen Objektträger gelegt, mit einem Deckgläschen versehen mit Immersionsöl beschichtet und nach 5 min Erholungszeit unter dem Mikroskop betrachtet.

Für Fusionen von zwei Stämmen des gleichen *mat* Lokus wurden die Konidien beider Stämme gemischt, auf den Rand einer Platte überimpft und wie oben beschrieben weiter verfahren.

Die unterschiedlichen Färbungen zur detaillierten Charakterisierung des *N. crassa Nkin2* Deletionsstammes erfolgten mit jeweils mit 10 µl des Farbstoffes (**Tab. 33**), welcher zuvor in Vogel's Minimalmedium zur gewünschten finalen Konzentration verdünnt wurde. Der Tropfen wurde direkt auf den vorbereiteten Agarblock mit den *N. crassa* über Nacht bei 28°C gewachsenen Hyphen getropft und zwischen 5 und 20 min bei RT inkubiert und anschließend direkt mikroskopiert.

**Tabelle 33: Verwendete fluoreszente Farbstoffe, deren Fluoreszenzkanal und die verwendeten finalen Konzentrationen.**

Farbstoff	Kanal	finale Konzentration
FM4-64	CFP	25 µM
CAMC	DAPI	10 µM
Calcofluor	DAPI	25 µM
MitoTracker Red	dsRed	20 µM



## VII. Literatur

**Abenza J.F., Pantazopoulou A., Rodríguez J.M., Galindo A. & Peñalva M.A. (2009).** Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* 10, 57-75.

**Abenza J.F., Galindo A., Pantazopoulou A., Gil C., de los Ríos V. & Peñalva M.A. (2010).** *Aspergillus* RabB Rab5 integrates acquisition of degradative identity with the long distance movement of early endosomes. *Mol. Biol. Cell* 21, 2756-2769.

**Abenza J.F., Galindo A., Pinar M., Pantazopoulou A., de los Ríos V. & Peñalva MA. (2012).** Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement. *Mol. Biol. Cell* 23, 1889-18901.

**Adio S., Bloemink M., Hartel M., Leier S., Geeves M.A. & Woehlke G. (2006).** Kinetic and mechanistic basis of the nonprocessive Kinesin-3 motor NcKin3. *J. Biol. Chem.* 281, 37782-37793.

**Adio S. & Woehlke G. (2009).** Properties of the kinesin-3 NcKin3 motor domain and implications for neck function. *FEBS J.* 276, 3641-3655.

**Al-Bassam, J., Cui, Y., Klopfenstein, D., Carragher, B.O., Vale, R.D. & Milligan, R.A. (2003).** Distinct conformations of the kinesin Unc104 neck regulate a monomer to dimer motor transition. *J. Cell Biol.* 163, 743-753.

**Ally, S., Larson, A.G., Barlan, K., Rice, S.E. & Gelfand, V.I. (2009).** Opposite-polarity motors activate one another to trigger cargo transport in live cells. *J. Cell Biol.* 187, 1071-1082.

**Araujo-Bazan, L., Penalva, M. A. & Espeso, E. A. (2008).** Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 67, 891-905.

**Arce C.A., Rodriguez J.A., Barra H.S. & Caputo R. (1975).** Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur. J. Biochem.* 59, 145-149.

**Badin-Larçon, A.C., Boscheron, C., Soleilhac, J.M., Piel, M., Mann, C., Denarier, E., Fourest-Lieuvain, A., Lafanechère, L., Bornens, M. & Job, D. (2004).** Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 5577-5582.

- Barkus, R.V., Klyachko, O., Horiuchi, D., Dickson, B.J. & Saxton, W.M. (2008).** Identification of an axonal kinesin-3 motor for fast anterograde vesicle transport that facilitates retrograde transport of neuropeptides. *Mol. Biol. Cell* 19, 274-283.
- Barrowman J., Bhandari D., Reinisch K. & Ferro-Novick S. (2010).** TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 759-763.
- Bartnicki-García, S., Hergert, F. & Gierz G. (1989).** Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma* 153, 46-57.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D.D., Gierz, G., López-Franco, R. & Bracker, C.E. (1995).** Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp. Mycol.* 19, 153-159.
- Bartnicki-Garcia, S. (2006).** Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res.* 6, 957-965
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A. & Feldbrügge, M. (2012).** Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J. Cell Sci.* 125, 2740-2752.
- Behnia R. & Munro S. (2005).** Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438, 597-604.
- Belden, W.J. & Barlowe, C. (2001).** Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* 294,1528-1531.
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J. Y., Tilsner, J. & Read, N. D. (2010).** F-actin dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 9, 547-557.
- Bistis, G.N., Perkins, D.D. & Read, N.D. (2003).** Different cell types in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsletters.* 50, 17-19.
- Bloom G.S. (2001).** The UNC-104/KIF1 family of kinesins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 36-40.

**Borkovich K.A., Alex L.A., Yarden O., Freitag M., Turner G.E., Read N.D., Seiler S., Bell-Pedersen D., Paietta J., Plesofsky N., Plamann M., Goodrich-Tanrikulu M., Schulte U., Mannhaupt G., Nargang F.E., Radford A., Selitrennikoff C., Galagan J.E., Dunlap J.C., Loros J.J., Catcheside D., Inoue H., Aramayo R., Polymenis M., Selker E.U., Sachs M.S., Marzluf G.A., Paulsen I., Davis R., Ebbole D.J., Zelter A., Kalkman E.R., O'Rourke R., Bowring F., Yeadon J., Ishii C., Suzuki K., Sakai W. & Pratt R. (2004).** Lesson from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 68, 1-108.

**Cai, Q., Lu, L., Tian, J.H., Zhu, Y.B., Qiao, H. & Sheng, Z.H. (2010).** Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-lysosomal function in neurons. *Neuron* 68, 73-86.

**Campanati, L., Bré, M.H., Levilliers, N. & de Souza, W. (1999).** Expression of tubulin polyglycylation in *Giardia lamblia*. *Biol. Cell* 91, 499-506.

**Cao, X., Ballew, N. & Barlowe, C. (1998).** Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.* 17, 2156-2165.

**Coe, J.G., Lim, A.C., Xu, J. & Hong, W. (1999).** A role for Tlg1p in the transport of proteins within the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10, 2407-2423.

**Collinge, A.J. & Trinci, A.P. (1974).** Hyphal tips of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.* 99, 353-368

**Conde, C. & Cáceres, A. (2009).** Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 319-332.

**Dagenbach, E.M. & Endow, S.A. (2004).** A new kinesin tree. *J. Cell Sci.* 1, 3-7.

**Davis, R.H. (2000).** *Neurospora*: contributions of a model organism. *Oxford University Press, New York.*

**Delcroix, J.D., Valletta, J.S., Wu, C., Hunt, S.J., Kowal, A.S. & Mobley, W.C. (2003).** NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 39, 69-84.

**Dietrich K.A., Sindelar C.V., Brewer P.D., Downing K.H., Cremo C.R. & Rice S.E. (2008).** The kinesin-1 motor protein is regulated by a direct interaction of its head and tail. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8938-8943.

- Dix, D.R., Bridgham, J.T., Broderius, M.A., Byersdorfer, C.A. & Eide, D.J. (1994).** The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 26092-26099.
- Dunlap, J.C., Borkovich, K.A., Henn, M.R., Turner, G.E., Sachs, M.S., Glass, N.L., McCluskey, K., Plamann, M., Galagan, J.E., Birren, B.W., Weiss, R.L., Townsend, J.P., Loros, J.J., Nelson, M.A., Lambreghts, R., Colot, H.V., Park, G., Collopy, P., Ringelberg, C., Crew, C., Litvinkova, L., DeCaprio, D., Hood H.M., Curilla, S., Shi, M., Crawford, M., Koerhsen, M., Montgomery, P., Larson, L., Pearson, M., Kasuga, T., Tian, C., Baştürkmen, M., Altamirano, L. & Xu, J. (2007).** Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. *Adv. Genet.* 57, 49-96.
- Dunn S., Morrison E.E., Liverpool T.B., Molina-París C., Cross R.A., Alonso M.C. & Peckham M. (2008).** Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell Sci.* 121, 1085-1095.
- Efimov V.P., Zhang J. & Xiang X. (2006).** CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 17, 2021-2034.
- Egan, M.J., McClintock, M.A. & Reck-Peterson, S.L. (2012).** Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 637-645.
- Erck C., Peris L., Andrieux A., Meissirel C., Gruber A.D., Vernet M., Schweitzer A., Saoudi Y., Pointu H., Bosc C., Salin P.A., Job D. & Wehland J. (2005).** A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7853-7858.
- Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H. M. & Goldman R. D. (2009).** Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J. Clin. Invest.* 119, 1763-1771.
- Espeut, J., Gausson, A., Bieling, P., Morin, V., Prieto, S., Fesquet, D., Surrey, T., & Abrieu, A. (2008).** Phosphorylation relieves autoinhibition of the kinetochore motor Cenp-E. *Mol. Cell* 29, 637-643.
- Fischer-Parton,, S., Parton, R.M., Hickey, P.C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H.A. & Read, N.D. (2000).** Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J. Microsc.* 198, 246-259.
- Fisher, M.C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw S. L. & Gurr, S. J. (2012).** Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 494, 186-194.

- Freitag M, Ciufetti, L.M. & Selker (2001).** Expression and visualization of Green Fluorescent Protein (GFP) in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsletter* 48, 15-19.
- Freitag, M., Hickey, P.C., Raju, N.B., Selker, E.U. & Read, N.D. (2004).** GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 897-910.
- Fuchs, F., Prokisch, H., Neupert, W. & Westermann, B. (2002).** Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J. Cell Sci.* 115,1931-1937.
- Fuchs F. & Westermann B. (2005).** Role of Unc104/KIF1-related motor proteins in mitochondrial transport in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 16, 153-161.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catchside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex ,L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C. & Birren, B. (2003).**The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422, 859-868.
- Geli M.I. & Riezman H. (1998).** Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J. Cell Sci.* 111, 1031-1037.
- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C.F. & Südhof, T.C. (1997).** The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 387, 810-814.
- Grenningloh, G., Soehrman, S., Bondallaz, P., Ruchti, E. & Cadas, H. (2004).** Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J. Neurobiol.* 58, 60-69.
- Grosshans B.L., Ortiz D. & Novick P. (2006).** Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11821-11827.
- Grün, N. (2011).** Etablierung von Vesikelmarkern in *Aspergillus nidulans*. Diplomarbeit. Karlsruhe Institut für Technolgy (KIT).

- Hackney D.D. & Stock M.F. (2000).** Kinesin's IAK tail domain inhibits initial microtubule-stimulated ADP release. *Nat. Cell Biol.* 5, 257-260.
- Hall, D.H. & Hedgecock, E.M. (1991).** Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* 65, 837-847.
- Hallak, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S. & Caputto, R. (1977).** Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* 73, 147-150.
- Hammond J.W., Cai D. & Verhey K.J. (2008).** Tubulin modifications and their cellular functions. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 1541-1555.
- Heald, R. & Nogales, E. (2002).** Microtubule dynamics. *J. Cell Sci.* 115, 3-4.
- Hendricks, A.G., Lazarus, J.E. & Holzbaur, E.L. (2010).** Dynein at odd angles? *Nat. Cell Biol.* 12, 1126-1128.
- Hirokawa, N., Nitta, R. & Okada, Y. (2009).** The mechanisms of kinesin motor motility: lessons from the monomeric motor KIF1A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 877-884.
- Hirokawa, N., Niwa, S. & Tanaka, Y. (2010).** Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610-638.
- Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D. & Brown, P.O. (2008).** Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol.* 6: e255.
- Holleran, E.A., Tokito, M.K., Karki, S. & Holzbaur, E.L. (1996).** Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. *J. Cell Biol.* 135, 1815-1829.
- Holt, C.E. & Bullock, S.L. (2009).** Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* 326, 1212-1216.
- Horio T. & Oakley B.R. (2005).** The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 918-926.
- Howe, C.L. & Mobley, W.C. (2005).** Long-distance retrograde neurotrophic signalling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 40-48.

- Ikegami K., Heier R.L., Taruishi M., Takagi H., Mukai M., Shimma S., Taira S., Hatanaka K., Morone N., Yao I., Campbell P.K., Yuasa S., Janke C., Macgregor G.R. & Setou M. (2007).** Loss of alpha-tubulin polyglutamylolation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3213-3218.
- Ikegami K. & Setou M. (2010).** Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. *Cell Struct. Funct.* 35, 15-22.
- Janke, C. & Bulinski, J. C. (2011).** Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 773–786.
- Jaworski, J., Hoogenraad, C. C. & Akhmanova, A. (2007).** Microtubule plus-end tracking proteins in differentiated mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 619-637.
- Jena B.P. (2011).** Role of SNAREs in membrane fusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 713, 13-32.
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M. & Neefjes, J. (2007).** Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J. Cell Biol.* 176, 459-471.
- Jolly A.L., Kim H., Srinivasan D., Lakonishok M., Larson A.G. & Gelfand V.I. (2010).** Kinesin-1 heavy chain mediates microtubule sliding to drive changes in cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 12151-12156.
- Jones S., Richardson C.J., Litt R.J. & Segev N. (1998).** Identification of regulators for Ypt1 GTPase nucleotide cycling. *Mol. Biol. Cell* 9, 2819-2837.
- Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C. & Neefjes, J. (2005).** Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6, 1070-1077.
- Khawaja S., Gundersen G.G. & Bulinski J.C. (1988).** Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J. Cell Biol.* 106, 141-149.
- Kim, Y., Yun, C.W. & Philpott, C.C. (2002).** Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 3632-3642.
- King, S.J. & Schroer, T.A. (2000).** Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Cell Biol.* 2, 20-24.

- Kirk, K.E. & Morris, N.R. (1991).** The tubB alpha-tubulin gene is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 5, 2014-2023.
- Kirk, K.E. & Morris, N.R. (1993).** Either alpha-tubulin isogene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* 13, 4465-4476.
- Klopfenstein, D.R., Tomishige, M., Stuurman, N. & Vale, R.D. (2002).** Role of phosphatidylinositol (4,5) biphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* 109, 347-358.
- Kniemeyer, O. (2011).** Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics* 11, 3232-3243.
- Kubodera T., Yamashita N. & Nishimura A. (2000).** Pyrithiamine resistance gene (ptrA) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1416-1421.
- Konishi, Y. & Setou, M. (2009).** Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat. Neurosci.* 12, 4465-4476.
- Konzack, S., Rischitor, P.E., Enke, C. & Fischer, R. (2005).** The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 497-506.
- Koushika, S.P., Schaefer, A.M., Vincent, R., Willis, J.H., Bowerman, B. & Nonet, M.L. (2004).** Mutations in *Caenorhabditis elegans* cytoplasmic dynein components reveal specificity of neuronal retrograde cargo. *J. Neurosci.* 24, 3907-3916.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E. & Wordeman, L. (2004).** A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.* 167, 19-22.
- Lee, J.R., Shin, H., Choi, J., Ko, J., Kim, S., Lee, H.W., Kim, K., Rho, S.H., Lee, J.H., Song, H.E., Eom, S.H. & Kim, E. (2004).** An intramolecular interaction between the FHA domain and a coiled coil negatively regulates the kinesin motor KIF1A. *EMBO J.* 23, 1506–1515.



- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K.M., Schliwa, M., Kahmann, R. & Bölker, M. (1997).** Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 16, 3464-3473.
- Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A. & Steinberg, G. (2006).** A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J.* 25, 2275-2286.
- Leong, Y. H., Ismail, N., Latiff, A. A., Manaf, N. A. & Rosma, A. (2011).** Determination of aflatoxins in commercial nuts and nut products using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin J.* 4, 119–127.
- Levivier, E., Goud, B., Souchet, M., Calmels, T.P., Mornon, J.P. & Callebaut, I. (2001).** uDENN, DENN, and dDENN: indissociable domains in Rab and MAP kinases signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 688-695.
- Li, F.Q., Li, Y.W., Wang, Y.R. & Luo, X.Y. (2009).** Natural occurrence of aflatoxins in Chinese peanut butter and sesame paste. *J. Agric. Food Chem.* 13, 3519-3524.
- Ligon, L.A., Tokito, M., Finklestein, J.M., Grossman, F.E. & Holzbaur, E.L. (2004).** A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity. *J. Biol. Chem.* 279, 19201-19208.
- Lillie, S.H. & Brown, S.S. (1994).** Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 125, 825-842.
- Ma Y., Takeuchi M., Sugiura R., Sio S.O. & Kuno T. (2009).** Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. *Genes Cells* 14, 1015-1028.
- Marat, A.L., Dokainish, H. & McPherson, P.S. (2011).** DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *J. Biol. Chem.* 286, 13791-800.
- Marhoul, J.F. & Adams, T.H. (1996).** *Aspergillus fabM* encodes an essential product that is related to poly(A)-binding proteins and activates development when overexpressed. *Genetics* 144, 1463-1470.
- Marx A., Hoenger A. & Mandelkow E. (2009).** Structures of kinesin motor proteins. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 66, 958-966.
- May G.S., Gambino J. & Morris N.R. (1985).** Identification and functional analysis of beta-tubulin genes by site specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* 10, 712-719.

- Mayr, M.I., Hümmer, S., Bormann, J., Grüner, T., Adio, S., Woehlke, G. & Mayer, T.U. (2007).** The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr Biol.* 17, 488-498.
- Mialhe A., Lafanechère L., Treilleux I., Peloux N., Dumontet C., Brémond A., Panh M.H., Payan R., Wehland J., Margolis R.L. & Job D. (2001).** Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res.* 61, 5024-5027.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. & Hirokawa, N. (2001).** All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7004-7011
- Morris, N. R., Lai, M. H. & Oakley, C.E. (1979).** Identification of a gene for  $\alpha$ -tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell.* 16, 437-442.
- Morris, N.R., Osmani, S.A., Engle, D.B., & Doonan, J.H. (1989).** The genetic analysis of mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Bioessays.* 6, 196-201.
- Morris, N.R., James, S.W. & O'Connell, M.J. (1992).** Mitotic regulation in *Aspergillus nidulans*. *Ciba Found Symp.* 170, 115-123.
- Mouriño-Pérez, R.R, Roberson, R.W. & Bartnicki-García, S. (2006).** Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 43, 389-400.
- Müller, M.J., Klumpp, S. & Lipowsky, R.(2008).** Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4609-4614.
- Nakata, T. & Hirokawa, N. (1995).** Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. *J. Cell Biol.* 131, 1039-1053.
- Nayak T., Szewczyk E., Oakley C.E., Osmani A., Ukil L., Murray S.L., Hynes M.J., Osmani S.A. & Oakley B.R. (2006).** A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172,1557-1566.
- Nitta R., Okada Y. & Hirokawa N. (2008).** Structural model for strain-dependent microtubule activation of Mg-ADP release from kinesin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1067-1075.
- Niwa, S., Tanaka, Y. & Hirokawa, N. (2008).** KIF1B $\beta$ - and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nat. Cell Biol.*10, 1269-1279

**Oakley B.R. & Rinehart J.E. (1985).** Mitochondria and nuclei move by different mechanisms in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* 101, 2392-2397.

**Oakley, C. E. & Oakley, B. R. (1989).** Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338, 662-664.

**Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y. & Hirokawa, N. (1995).** The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* 81,769-780.

**Okada, Y. & Hirokawa, N. (2000).** Mechanism of the single-headed processivity: diffusional anchoring between the K-loop of kinesin and the C terminus of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 640-645.

**Osmani, S.A. & Ye, X.S. (1996).** Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *Biochem. J.* 317, 633-641.

**Peris L., Wagenbach M., Lafanechère L., Brocard J., Moore A.T., Kozielski F., Job D., Wordeman L. & Andrieux A. (2009).** Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* 185, 1159-1166.

**Qiang, L., Yu, W., Andreadis, A., Luo, M. & Baas P.W. (2006).** Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J. Neurosci.* 26, 3120-3129.

**Quinones G.B., Danowski B.A., Devaraj A., Singh V. & Ligon L.A. (2011).** The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Mol. Biol. Cell.* 7,1045-1057.

**Ramos-García S.L., Roberson R.W., Freitag M., Bartnicki-García S. & Mouriño-Pérez R.R. (2009).** Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 8, 1880-1890.

**Requena, N., Alberti-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P., Liese, R. & Fischer, R. (2001).** Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 42, 121-132.

**Richardson M.D. & Kokki M.H. (1999).** New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections. *Ann. Med.* 31,327-335.

**Riquelme, M., Reynaga-Peña, C.G., Gierz, G. & Bartnicki-García, S. (1998).** What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genet. Biol.* 24, 101-109.

- Riquelme M., Gierz G. & Bartnicki-García S. (2000).** Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* 146, 1743-1752.
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J.M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J.A., Beltrán-Aguilar, A. & Freitag, M. (2007).** Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.* 6,1853-1564.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-García, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S., Fleißner, A., Freitag, M., Lew, R., Mouriño-Pérez, R., Plamann, M., Rasmussen, C., Richthammer, C., Roberson, R., Sánchez-Leon, E., Seiler, S. & Watters, M. (2011).** Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha- a model cell for polarized growth. *Fungal Biol.* 115, 446-474.
- Rischitor, P.E., 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.
- Sacher M., Kim Y.G., Lavie A., Oh B.H. & Segev N. (2008).** The TRAPP complex: insights into its architecture and function. *Traffic* 9, 2032-2042.
- Sampson, K. & Heath, I.B. (2005).** The dynamic behaviour of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol.* 151, 1543-1555.
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R.W., Bartnicki-García, S. & Riquelme, M. (2011).** Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryot Cell.* 10, 683-695.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. & Wittinghofer, A. (1990).** The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15, 430-434.
- Schink K.O. & Bölker M. (2009).** Coordination of cytokinesis and cell separation by endosomal targeting of a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor in *Ustilago maydis*. *Mol. Biol. Cell* 20, 1081-1088.
- Schliwa, M. & Woehlke, G. (2001).** Molecular motors. Switching on kinesin. *Nature* 24, 424-425.
- Schliwa, M. & Woehlke, G. (2003).** Molecular motors. *Nature* 422, 759-765.
- Schoch, C.L., Aist, J.R., Yoder, O.C. & Gillian Turgeon, B. (2003).** A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 39, 1-15.

- Schuchardt, I., Assmann, D., Thines, E., Schuberth, C. & Steinberg, G. (2005).** Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Biol. Cell* 16, 5191-5201.
- Schulze E., Asai D.J., Bulinski J.C. & Kirschner M. (1987).** Posttranslational modification and microtubule stability. *J. Cell Biol.* 105, 2167-2177.
- Schuster, M., Kilaru, S., Ashwin, P., Lin, C., Severs, N. J. & Steinberg, G. (2011a).** Controlled and stochastic retention concentrates dynein at microtubule ends to keep endosomes on track. *EMBO J.* 30, 652-664.
- Schuster, M., Lipowsky, R., Assmann, M. A., Lenz, P. & Steinberg, G. (2011b).** Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 3618-3623.
- Schuster, M., Kilaru, S., Fink, G., Collemare, J., Roger, Y. & Steinberg, G. (2011c).** Kinesin-3 and dynein cooperate in long-range retrograde endosome motility along a nonuniform microtubule array. *Mol. Biol. Cell* 22, 3645-3657.
- Schuster, M., Treitschke, S., Kilaru, S., Molloy, J., Harmer, N.J. & Steinberg, G. (2011d).** Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J.* 31, 214-227.
- Seeger M.A. & Rice S.E. (2010).** Microtubule-associated protein-like binding of the kinesin-1 tail to microtubules. *J. Biol. Chem.* 285, 8155-8162.
- Seidel, C. (2009).** Untersuchung des Kinesin-3 Motors UncA in *Aspergillus nidulans*. Diplomarbeit. Karlsruhe Institut für Technology (KIT).
- Seidel, C., Zekert, N. & Fischer, R. (2012).** The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 tail is necessary and sufficient to recognize modified microtubules. *PLoS ONE* 7, e30976.
- Seiler, S., Nargang, F.E., Steinberg, G. & Schliwa, M. (1997).** Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* 16, 3025-3034.
- Seiler S, Plamann M, & Schliwa M. (1999).** Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Curr Biol.* 9, 779–785
- Seiler, S., Kirchner, J., Horn, C., Kallipolitou, A., Woehlke, G. & Schliwa, M. (2000).** Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nat. Cell Biol.* 2, 333-338.

- Seiler, S. & Plamann, M. (2003).** The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 14, 4352-4364.
- Setou M., Seog D.H., Tanaka Y., Kanai Y., Takei Y., Kawagishi M. & Hirokawa N. (2002).** Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417, 83-87.
- Sheetz, M. P., Steuer, E. R. & Schroer T. A. (1989).** The mechanism and regulation of fast axonal transport. *Trends Neurosci.* 12, 474-482.
- Sheir-Neiss, G., Lai, M. & Morris, N. R. (1978).** Identification of a gene for  $\beta$ -tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 15, 639-647.
- Shin H., Wyszynski M., Huh K.H., Valtschanoff J.G., Lee J.R., Ko J., Streuli M., Weinberg R.J., Sheng M. & Kim E. (2003).** Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha. *J. Biol. Chem.* 278, 11393-11401.
- Song, Y.H., Marx, A., Müller, J., Woehlke, G., Schliwa, M., Krebs, A., Hoenger, A. & Mandelkow, E. (2001).** Structure of a fast kinesin: implications for ATPase mechanism and interactions with microtubules. *EMBO J.* 20, 6213-6225.
- St Johnston, D. (2005).** Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 363-675.
- Stearman, R., Yuan, D.S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R.D. & Dancis, A. (1996).** A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271, 1552-1557.
- Steinberg G., Wedlich-Söldner R., Brill M. & Schulz I. (2001).** *Microtubules in the fungal pathogen Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J. Cell Sci.* 114, 609-622.
- Steinberg, G. (2007).** Hyphal growth: a tale of Motors, lipids, and the spitzenkörper. *Eukaryot. Cell* 6, 351-360.
- Steinberg, G., Schuster, M., Theisen, U., Kilaru, S., Forge, A. & Martin-Urdiroz, M. (2012).** Motor-driven motility of fungal nuclear pores organizes chromosomes and fosters nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* 198, 343-355.
- Stettler, O., Moya, K.L., Zahraoui, A. & Tavitian, B. (1994).** Developmental changes in the localization of the synaptic vesicle protein rab3A in rat brain. *Neuroscience* 62, 587-600.

- Stringer M.A., Dean R.A., Sewall T.C. & Timberlake W.E. (1991).** Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev.* 5, 1161-1171.
- Suelmann, R., Sievers, N. & Fischer, R. (1997).** Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 25, 757-769.
- Suelmann R. & Fischer R. (2000).** Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 45, 42-50.
- Sun H.Y., Wang L., Liu J.W. & Peng M. (2009).** Improved production of raw starch degrading enzyme by *Aspergillus oryzae* F-30 using methyl glucoside sesqui-stearate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 78-84.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E.A., Peñalva, M.A., Osmani, S.A. & Oakley, B.R. (2008).** The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 19,1439-1449.
- Tomishige, M., Klopfenstein, D.R. & Vale, R.D. (2002).** Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. *Science* 297, 2263-2270.
- Trinci, A.P. & Collinge, A.J. (1974).** Occlusion of the septal pores of damaged hyphae of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals. *Protoplasma* 80, 57-67.
- Uchida, M., Mouriño-Pérez, R.R., Freitag, M., Bartnicki-García, S. & Roberson, R.W. (2007).** Microtubule dynamics and the role of molecular motors in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 683-692.
- Upadhyay S. & Shaw B.D. (2008).** The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 68, 690-705.
- Valdez-Taubas J., Harispe L., Scazzocchio C., Gorfinkiel L. & Rosa A.L. (2004).** Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 42-51.
- Vale, R.D. & Milligan, R.A. (2000).** The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288, 88-95.
- Varga, V., Helenius J., Tanaka, K., Hyman, A. A., Tanaka, T. U. & Howard, J. (2006).** Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat. Cell Biol.* 8, 957-962.

- Vaughan, K.T. & Vallee, R.B. (1995).** Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J. Cell Biol.* 131, 1507-1516.
- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V.P. & Fischer, R. (2005).** Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Sci.* 118, 3705-3716.
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S. & Riquelme, M. (2009).** Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 74, 1044-1053.
- Verhey, K.J., Lizotte, D.L., Abramson, T., Barenboim, L., Schnapp, B.J. & Rapoport, T.A. (1998).** Light chain-dependent regulation of Kinesin's interaction with microtubules. *J Cell Biol.* 143, 1053-1066.
- Verhey, K.J. & Rapoport, T.A. (2001).** Kinesins carries the signal. *Trends Biochem. Sci.* 26, 545-550.
- Verhey, K.J. & Hammond, J.W. (2009).** Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 765-777.
- Wade, R. H. (2007).** Microtubules: an overview. *Methods Mol. Med.* 137, 1-16.
- Wagner W., Bielli P., Wacha S. & Ragnini-Wilson A. (2002).** Mlc1p promotes septum closure during cytokinesis via the IQ motifs of the vesicle motor Myo2p. *EMBO J.* 21, 6397-6408.
- Walch-Solimena C., Collins R.N. & Novick P.J. (1997).** Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J. Cell Biol.* 137, 1495-1509.
- Weatherbee, J.A. & Morris, N.R. (1984).** *Aspergillus* contains multiple tubulin genes. *J. Biol. Chem.* 259, 15452-15459.
- Weber, K., Schneider, A, Westermann, S., Müller, N. & Plessmann, U. (1997).** Posttranslational modifications of alpha- and beta-tubulin in *Giardia lamblia*, an ancient eukaryote. *FEBS Lett.* 419, 87-91.
- Webster D.R., Gundersen G.G., Bulinski J.C. & Borisy G.G. (1987).** Assembly and turnover of deetyrosinated tubulin *in vivo*. *J. Cell Biol.* 105, 265-276.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M.W. & Steinberg, G. (2002).** A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 21, 2946-2957.



- Weil, C.F. Oakley, C. E. & Oakley, B. R. (1986).** Isolation of mip (microtubule-interacting protein) mutations of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 6, 2963-2968.
- Westerholm-Parvinen, A., Vernos, I. & Serrano, L. (2000).** Kinesin subfamily UNC104 contains a FHA domain: boundaries and physicochemical characterization. *FEBS Lett.* 486, 285-290.
- Westermann, S. & Weber, K. (2003).** Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* 4, 938-947.
- Wiese, C. & Zheng, Y. (2006).** Microtubule nucleation:  $\gamma$ -tubulin and beyond. *J. Cell Sci.* 119, 4143-4153.
- Xiang X. & Fischer R. (2004).** Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41, 411-419.
- Yaffe M.P., Harata D., Verde F., Eddison M., Toda T. & Nurse P. (1996).** Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11664-11668.
- Yelton M.M., Hamer J.E. & Timberlake W.E. (1984).** Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 1470-1474.
- Yu, Y.B. (2002).** Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54, 1113-1129.
- Yun, C.W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P.O., Botstein, D., Kaplan, J. & Philpott, C.C. (2000a).** Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J. Biol. Chem.* 275, 10709-10715.
- Yun, C.W., Tiedeman, J.S., Moore, R.E. & Philpott, C.C. (2000b).** Siderophore-iron uptake in *saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J. Biol. Chem.* 275, 16354-16359.
- Zekert, N. & Fischer, R. (2009).** The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol. Biol. Cell* 20, 673-684.
- Zekert, N., Veith, D. & Fischer, R. (2010).** Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryot. Cell* 9, 795-805.

**Zhang J., Li S., Fischer R. & Xiang X. (2003).** Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol. Biol. Cell* 14, 1479-1488.

**Zhang, J., Yao, X., Fischer, L., Abenza, J.F., Peñalva, M.A. & Xiang, X. (2011).** The p25 subunit of the dynactin complex is required for dynein-early endosome interaction. *J. Cell Biol.* 193, 1245-1255.

## VIII. Anhang



**Auf der beiliegenden CD befinden sich folgende Datensätze:**

**Film 1:** Subzelluläre Lokalisierung des DENN/MADD- Proteins RefB (AN0575) in *A. nidulans* TN02A3 (SCoS 98 - *refB(p)::GFP::refB*<sup>900bp</sup>).

**Film 2:** Subzelluläre Lokalisierung des Siderophor-Transporters SitB (AN5378) in *A. nidulans* TN02A3 (SCoS 83 - *alcA(p)::sGFP::sitB*<sup>886bp</sup>).

**Film 3:** Subzelluläre Lokalisierung des *S. cerevisiae* ERV29 Homologs ErvA (AN1117) in *A. nidulans* TN02A3 (SCoS 92 - *alcA(p)::sGFP::ervA*<sup>916bp</sup>).

**Film 4:** Subzelluläre Lokalisierung der BiFC- Analyse zwischen UncA und SynA in TN02A3 (SCoS160 - *alcA(p)::YFP<sup>N</sup>::synA*<sup>357bp</sup>; *alcA(p)::YFP<sup>C</sup>::uncA*<sup>900bp</sup>).

**Film 5:** Subzelluläre Lokalisierungen des im Y2H identifizierten Kandidaten McnA (AN2941) in *A. nidulans* TN02A3 (SCoS 86 - *alcA(p)::sGFP::AN2941*<sup>775bp</sup>).

**Film 6: a)** Subzelluläre Lokalisierung von mcherry-Nkin2 in einer Verzweigung von *N. crassa* 9717 (NCoS2 - his-3<sup>+</sup>::ccg-1(p)::mcherry::Nkin2).

**b)** Subzelluläre Lokalisierung von GFP-Nkin2 in einer Primärhyphe von *N. crassa* 9717 (NCoS4 - his-3<sup>+</sup>::ccg-1(p)::sGFP::Nkin2).

**Film 7:** Subzelluläre Lokalisierung von GFP-Ypt52 in einer jungen Hyphe von *N. crassa* 9717 (NCoS 7 - his-3<sup>+</sup>::ccg-1(p)::sGFP::Ypt52).

**Film 8: a)** Subzelluläre Lokalisierung von GFP-Ypt52 in einer jungen Hyphe von *N. crassa*  $\Delta$ Nkin2 (NCoS 12 - his-3<sup>+</sup>::ccg-1(p)::sGFP::Ypt52).

**b)** Subzelluläre Lokalisierung von GFP-Ypt52 in einer jungen Hyphe und einer Verzweigung von *N. crassa*  $\Delta$ Nkin2 (NCoS 12 - his-3<sup>+</sup>::ccg-1(p)::sGFP::Ypt52).

**c)** Subzelluläre Lokalisierung von GFP-Ypt52 in einem Keimling von *N. crassa*  $\Delta$ Nkin2 (NCoS 12 - his-3<sup>+</sup>::ccg-1(p)::sGFP::Ypt52).

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Reinhard Fischer dafür danken, dass er mir das Erarbeiten dieses spannenden Themas in einer sehr freien und selbstbestimmten Weise ermöglicht hat. Er stand mir jederzeit mit seinem Fachwissen und seiner Erfahrung zur Seite und gab mir oft Motivation, insbesondere in den heißen Phasen der Revision meiner ersten Publikation und in den letzten Zügen der Dissertation. Er ermöglichte mir diverse Dienstreisen zu nationalen und internationalen Konferenzen, wo ich meine Arbeit präsentieren konnte. Auch gab Reinhard mir die Möglichkeit für ein halbes Jahr nach Ensenada, Mexiko, aufzubrechen, um dort in der Gruppe von Meritxell Riquelme-Pérez neue Methoden zu lernen und die Vorzüge des internationalen Arbeitens kennen zu lernen.

Der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg danke ich für die Finanzierung eines Großteils meiner Doktorarbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Holger Puchta für seine freundliche Bereitschaft das Korreferat dieser Arbeit zu übernehmen.

Weiterhin danke ich Nadine Zekert für die herzliche, sehr kompetente und immer wieder lustige Zusammenarbeit. Sie gab mir in schwierigen Zeiten immer wieder neue Ideen- und Motivationsschübe und ihr verdanke ich die Grundlagen meines molekularbiologischen Arbeitens und einen Teil meiner Liebe zur Wissenschaft.

Allen jetzigen und ehemaligen Kollegen der Westhochschule gilt ein großes Lob. Im Besonderen möchte ich Julio Rodriguez-Romero, Saturnino Herrero de Vega, Norio Takeshita, Elisabeth Poth, Stefanie Rech, Sylvia Müller, Fabienne Cochard-Rein, Tamara Bürger, Ramona Fetzner, Sonja Sand, Beatrice Gutt und Nathalie Grün für die vielen schönen Momente danken.

Auch auf der anderen Seite der Erde haben mich sehr viele Menschen auf dem oftmals steinigen Weg der Promotion begleitet, der aber in der Sonne Mexikos, dem Pazifik und den liebenswürdigen Menschen dort das reinste Vergnügen war. Eddy, Adriana, Jovani, Roxy, Rosita, Diego und natürlich den beiden "Investigadoras" Meritxell und Rosa gilt ein großes *gracias*. Die Zeit mit euch war herrlich! Im Besonderen möchte ich die Unterstützung durch Alexander Lichius hervorheben, der mir sowohl in Mexiko als auch zurück hier in Karlsruhe so unbeschreiblich viel Halt und wissenschaftliche Unterstützung gegeben hat.

Ein riesen Dankeschön gilt allen meinen Freunden, die unentwegt hinter mir stehen. Danke, Anastasia, Katrin, André, Karin, Thomas, Annette, Niko, Jenny, Daniel, Flo, Fabian und alle anderen, die nicht mehr auf diese Seite passen. Ihr seid die Besten!

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich von Beginn an bedingungslos in meinem Vorhaben, Biologin zu werden, gefördert und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben. Ohne Euch wäre das Alles nicht möglich gewesen!

Sergio, eres lo más preciado que tengo. Muchissimas gracias por todo.