

Funktionelle Analysen von Steroltransportern in dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans*

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

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

genehmigte
DISSERTATION

von
Nicole Bühler
aus
Lörrach

Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper
Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper
Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2015

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Analysen von Steroltransportern in dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinem sonstigen Prüfungszweck gedient.

Karlsruhe, 22. Oktober 2015

Nicole Bühler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung	5
1.1 Summary	6
2 Einleitung	7
2.1 Polares Wachstum in <i>Aspergillus nidulans</i>	7
2.2 Sterol-reiche Domänen (SRDs) in Pilzen	10
2.3 Oxysterolbinde Protein (OSBP)-verwandte Proteine (ORPs)	12
2.3.1 Homologe oxysterolbinde Proteine (Osh) aus <i>S. cerevisiae</i>	12
2.3.2 Menschliche ORPs	16
2.4 Membrankontaktbereiche (MCS)	23
2.5 Aufbau von Osh4p sowie sein Funktionsmodell in <i>S. cerevisiae</i> und das OSBP-Funktionsmodell	27
2.6 Ziel der Arbeit	30
3 Ergebnisse	31
3.1 <i>Aspergillus nidulans</i> besitzt fünf verschiedene Osh-Proteine	31
3.1.1 Strukturen der <i>A. nidulans</i> Proteine OshA-E	31
3.1.2 OshE bildet im Stammbaum eine eigene Gruppe	33
3.2 Unterschiedliche Lokalisierungsmuster von OshA-E	35
3.3 Verschiedene Phänotypen, Wachstumsverhalten und Konidiosporenanzahlen der <i>osh</i> -Deletionsstämme	51
3.4 Verschiedene Phänotypen in Flüssigmedium, unterschiedliche Biomassen und reduzierte Ergosterolkonzentration der <i>osh</i> -Deletionsstämme	60
3.4.1 $\Delta oshA-E$ mit unterschiedlichen Phänotypen in Flüssigmedium	60
3.4.2 Verschiedene Biomassen und Reduktion der Ergosterolkonzentration von $\Delta oshA-E$	61
3.5 Unterschiedlich starke Expressionen der Gene <i>oshA-E</i> in $\Delta oshA-\Delta oshE$	64
3.6 OshE ist an der Konidiophorentwicklung beteiligt	66
3.7 Verändertes Wachstumsverhalten der <i>osh</i> -Deletionsstämme bei ergosterolassozierten Wirkstoffen	69
3.7.1 $\Delta oshB$ reagiert sensitiv auf Voriconazolbehandlung	70
3.7.2 Verschiedene Sensitivitäten der <i>osh</i> -Deletionsstämme gegenüber ergosterolassozierten Wirkstoffen	72
3.8 Erhöhte Expressionen der Gene <i>cyp51A</i> und <i>cyp51B</i> in $\Delta oshA-\Delta oshE$	74
3.9 Verschiedene Wachstumstest der Deletionsstämme <i>oshA-E</i>	75
3.9.1 Temperaturstress der Deletionsstämme <i>oshA-E</i> bei 42 °C	75
3.9.2 Keine Wachstumsveränderung von $\Delta oshA-E$ auf Glukose-, Glyzerin- und Threoninmedium	77
3.9.3 Zellyse an den Hyphenspitzen bei verschiedenen CFW-Konzentrationen bei $\Delta oshA-E$	79
3.10 Keine signifikanten Veränderungen in den SRDs und den Zellendmarker der <i>osh</i> -Deletionsstämmen	83
4 Diskussion	86

4.1	Transport von Ergosterol an die PM oder Organellen anhand der Proteine OshA-E	86
4.2	Keine signifikanten Veränderungen in den SRDs und den Zellendmarker der <i>osh</i> -Deletionsstämme.....	94
4.3	Stärkere Expressionen der Gene <i>cyp51A</i> und <i>cyp51B</i> in Δ <i>oshA</i> - Δ <i>oshE</i> verändern die Voriconazolanfälligkeit	95
4.4	OshE ist an der Konidiophorentwicklung beteiligt	96
5	Material & Methoden	99
5.1	Chemikalien	99
5.2	Verwendete Organismen und Kultivierungen.....	99
5.2.1	Verwendete Stämme von <i>Aspergillus nidulans</i> und Kultivierung	99
5.2.2	Verwendeter Stamm von <i>Escherichia coli</i> und Kultivierung.....	102
5.3	Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden	103
5.3.1	Gelelektrophorese, DNA-Restriktion und Klonierung von PCR-Fragmenten	103
5.3.2	PCR, verwendete Oligonukleotide und Herstellung DIG-markierter Sonden	104
5.3.3	Herstellung von Deletionskonstrukten und zum Taggen von Genen via Fusion-PCR	109
5.3.4	Hergestellte und verwendete Plasmide.....	109
5.3.5	<i>E. coli</i> Transformation mit anschließender Plasmid-DNA-Präparation	110
5.3.6	Herstellung von <i>A. nidulans</i> Protoplasten und Transformation von Plasmiden oder PCR-Produkten	112
5.3.7	Komplementation und Kreuzungen von <i>A. nidulans</i> Stämmen mit den <i>osh</i> -Deletionsmutanten	113
5.3.8	Präparation von genomischer DNA und Southern Blot von <i>A. nidulans</i> Stämmen	114
5.3.9	Isolierung von RNA aus <i>A. nidulans</i> Stämmen und quantitative Real-time PCR.....	116
5.3.10	Bestimmung der Biomasse und der Ergosterolkonzentration	117
5.4	Methoden zur Bestimmung der Sporenanzahl sowie Wachstum- und ergosterolassozierte Wirkstoff-Assays von <i>A. nidulans</i> Stämmen.....	118
5.4.1	Bestimmung der Sporenanzahl.....	118
5.4.2	Verschiedene Wachstums-Assays.....	119
5.4.3	Behandlung mit ergosterolassozierten Wirkstoffen.....	120
5.5	Mikroskopische Methoden und Färbelösungen.....	121
6	Literaturverzeichnis	123
7	Anhang.....	139
7.1	Zusatz zur Arbeit	139
7.1.1	Keine Wachstumsbeeinträchtigung von Δ <i>oshA-E</i> durch verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffquellen.....	139
	Abkürzungsverzeichnis	142
	Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	143
	Konferenzen.....	143
	Danksagung.....	144

1 Zusammenfassung

Polares Wachstum ist für viele Zellen eine wichtige Eigenschaft. In filamentösen Pilzen findet das Wachstum hauptsächlich an der Hyphenspitze statt, welche an der Zellwand und -membran vergrößert werden. Dafür benötigt die Hyphe einen ständigen Fluss an Lipiden und Proteinen vom Zellkörper bis zur Spitze. Die Doppelschicht der Zellmembranen von Pilzen besteht aus Glycerophospholipiden, Sphingolipiden und Ergosterol. In Mikrodomänen, den sogenannten *lipid rafts*, sind Sphingolipide und Ergosterol in einer Mischung aus Glycerophospholipiden angereichert. An der apikalen Plasmamembran sind Akkumulationen von Ergosterolen, welche als sterolreiche Domänen (SRDs) bezeichnet und mit Hilfe einer Filipinfärbung sichtbar gemacht werden können. Die genaue Rolle und der Bildungsmechanismus der SRDs sind bis heute noch unklar, jedoch sind sie für das polare Wachstum durch die richtige Positionierung von Zellendmarkern wichtig. Der Transport von Ergosterol an die Hyphenspitze könnte für die Organisation der SRDs von zentraler Bedeutung sein.

Die in den Eukaryoten konservierten oxysterolbinde Proteine sind in den nicht-vesikulären Steroltransport involviert. In *Saccharomyces cerevisiae* existieren sieben *oxysterol-binding protein homologues* (OSH1-7). Diese spielen eine Rolle in der Ergosterolverteilung an Membrankontaktbereichen (MCS). In *Aspergillus nidulans* wurden fünf homologe Gene (*oshA-E*) gefunden. Ihre SRD Funktion zur möglichen Bildung oder Organisation und ihre Bedeutung für das polare Wachstum wurden in dieser Arbeit untersucht. Anhand von Lokalisierungsstudien von Fusionsproteinen aus OshA-E mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) konnten Signale von OshA mit dem *late-Golgi*, Signale von OshB und OshE in Assoziation mit dem ER lokalisiert werden, wohingegen OshC und OshD zytoplasmatische Signale zeigten. Signale von OshC wurden in einzelnen Hyphenspitzen und zudem im apikalen Bereich lokalisiert. Die generierten Deletionsstämme *oshA-E* offenbarten Wachstumsdefekte und stärker verzweigte Hyphen im Falle der *oshC*- und *oshD*-Deletionen. Im Zuge von Expressionsanalysen der *osh*-Deletionsstämme konnte durch die Deletion eines einzelnen *osh*-Gens, eine stärkere Expression eines anderen Genes, wie zum Beispiel *oshD* in $\Delta oshB$, beobachtet werden. Zum Teil wurden signifikante Reduktionen der Ergosterolkonzentration, unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber ergosterolassoziierten Wirkstoffen und stärkere Expressionen in den Genen *cyp51* verglichen zum Wildtyp in $\Delta oshA-E$ festgestellt. Vereinzelt wurde eine Veränderung der SRDs in $\Delta oshE$ beobachtet. Eine signifikante Reduktion der Konidiosporen in $\Delta oshE$ führte zur Untersuchung der Konidiophorenentwicklung anhand von *oshE*-Expressionsanalysen im Wildtyp.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ist eine indirekte Beteiligung von OshA-OshE am polaren Wachstum und somit an der Bildung und Organisation der SRD als

wahrscheinlich anzusehen. Das OshE-Protein weist zusätzlich eine Involvierung in der Kondiophorenentwicklung auf.

1.1 Summary

Polarized growth is an important feature for most of the cells. In filamentous fungi growth occurs exclusively at the hyphal tip, where cell wall and cell membrane are enlarged. Hence, the cell needs a continuous flow of lipids and proteins from the cell body to the tip. The cell membrane bilayer from fungi consists of amphipathic lipids like phosphoglycerides, sphingolipids and ergosterol. Microdomains, also called lipid rafts, are composed of sphingolipids and ergosterol in a mixture of phosphoglycerides. At the fungal apical plasma membrane, ergosterol accumulates in the so called sterol-rich domains (SRDs), which are stainable with filipin. The exact role and building mechanism of the SRDs is until now unclear but the SRD structure is important for the right positioning of cell end markers for polarized growth. It is suggested that the transport from ergosterol to the hyphal tip is fundamental for the SRD organisation.

In eukaryotes, conserved oxysterol-binding proteins are involved in the non-vesicular transport. In *Saccharomyces cerevisiae* seven oxysterol-binding protein homologues (OSH1-7) are present which play a role in the distribution of ergosterol at membrane contact sites (MCS). In the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, five homologous genes (*oshA-E*) were found. Their function in development and the organisation of SRDs and their role in polarised growth were investigated in this work. Based on localization studies of GFP fused OshA-E proteins, signals of OshA were found at the late-Golgi, OshB and OshE signals were associated with the ER, whereas OshC and OshD signals were cytoplasmic. In the case of OshC specific signals were additionally found at the apical region of the hyphal tip. Creation of deletion mutants of *oshA-E* showed growth defects and more branching in the case of the *oshC*- and *oshD*-deletions. Expression analyses of the *osh*-deletion strains indicated that through the deletion of one single gene another gene was higher expressed, like for example *oshD* in Δ *oshB*. The ergosterol concentration was in partly significantly reduced. Also different sensitivities against ergosterol associated drugs could be observed. Higher expression of the *cyp51* genes compared to wild type was detected. In the *oshE* deletion strain, SRD alterations were occasionally observed. Significant reduction of conidiospores in Δ *oshE* led to analysis of the *oshE* expression in the wild type strain, which could be shown to be involved in conidiophore development.

The obtained results did not rule out an indirect involvement of OshA-E proteins in polarized growth. They are probably implicated in the development and organization of SRDs. The OshE protein is additionally involved in the development of conidiophores.

2 Einleitung

2.1 Polares Wachstum in *Aspergillus nidulans*

Der filamentöse Ascomycet *Aspergillus nidulans* ist ein im Boden lebender Organismus (Sievers *et al.*, 1997). Er ist an der Remineralisierung organischer Materialien maßgeblich beteiligt (Fischer & Braus, 2006), wodurch Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor recycelt werden können (Archer *et al.*, 2008). Filamentöse Pilze wachsen als lange Zylinder mit einem leicht konischen Apex, welche als Hyphen bezeichnet werden (Riquelme, 2013). Das Hyphenwachstum von filamentösen Pilzen ereignet sich an ihrer Spitze (Riquelme *et al.*, 2011; Takeshita *et al.*, 2014). Daher eignen sich diese Organismen hervorragend zur Untersuchung des polaren Wachstums, das auch in Neuronen, Wurzelzellen oder Pollenschläuchen auftritt (Heath & Geitmann, 2000).

Polarität ist eine fundamentale Eigenschaft für die Entwicklung der Zelle. In filamentösen Pilzen werden für die Polarität eine ständige Synthese und ein selektives Protein-*Targeting* sowie Lipide und Zellwandbausteine benötigt, welche zu spezifischen Domänen am Apex in der Hyphenplasmamembran transportiert werden (Riquelme, 2013). Damit dies geschehen kann werden verschiedene Komponenten wie zum Beispiel die Mikrotubuli (MT) benötigt (Abbildung 1). Mikrotubuli und Aktin, welche sehr dynamisch sind, sowie Septine bilden in *A. nidulans* und anderen filamentösen Pilzen das Zytoskelett (Berepiki *et al.*, 2011; Lichius *et al.*, 2011; Steinberg, 2007; Takeshita & Fischer, 2011).

Septine, eine der drei Zytoskelettkomponenten, kommen außer bei Pflanzen in allen Eukaryoten vor. Sie gehören zur GTPase-Familie und bilden Heteropolymere, welche sich zu höheren Strukturen zusammenlagern. Septine haben eine Vielzahl an Funktionen inne, zu denen die Zellzyklusregulation, die Bildung von Diffusionsbarrieren in Plasmamembranen, die Markierung der Knospungsseite, die gerichtete Sekretion sowie die Septierung gezählt werden. Wenn Septine in der Zellperipherie lokalisiert sind, liegt eine Beteiligung am Membrantransport vor (Lichius *et al.*, 2011). In Pilzen sind sie am vegetativen Wachstum und der Sporulation beteiligt (Spiliotis & Gladfelter, 2012). *A. nidulans* besitzt mehrere Septine, die zum Teil an unterschiedlichen Bereichen in der Zelle als Ringe, Stäbchen oder Filamente lokalisieren (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2012).

Mikrotubuli, eine weitere Komponente des Zytoskeletts, sind für verschiedene Funktionen in der Zelle wichtig. So sind die MT in *A. nidulans* und *S. cerevisiae* unter anderem für den Transport und die Positionierung der Zellkerne entscheidend (Fischer & Timberlake, 1995; Suelmann *et al.*, 1998; Veith *et al.*, 2005). Außerdem dienen MT in filamentösen Pilzen als Transportnetz für Vesikel oder auch mRNA und sind für das schnelle Hyphenwachstum von Bedeutung (Egan *et al.*, 2012; Takeshita *et al.*, 2014).

Der Aufbau des MT setzt sich aus einem Netz von α - und β -Tubulin-Heterodimeren zusammen, welche sich wiederum zu einem Protofilament zusammenlagern und dreizehn dieser Protofilamenten sich dann schließlich zu einer hohlen Röhre anlagern. Die α -Untereinheit ist mit ihrem gebundenen GTP stabil, wohingegen das GTP zu GDP in der β -Untereinheit hydrolysiert werden kann. Dies führt zu einer Instabilität der MT, welche in die MT Katastrophe eintreten (Heald & Nogales, 2002; Nogales *et al.*, 1998). Die MT sind mit ihrem relativ stabilen Minusende an dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) lokalisiert, wohingegen das MT-Plusende der Zellperipherie zugewandt ist und sowohl wachsen, als auch schrumpfen (Katastrophe) und mit einer Reihe anderer Proteine interagieren kann (Akhmanova & Hoogenraad, 2005; Oakley *et al.*, 1990). Die MTOCs enthalten γ -Tubulin und stellen in filamentösen Pilzen die Spindelpolkörper (SPB; *spindle pole bodies*) und die septalen MTOCs (sMTOCs) dar (Oakley *et al.*, 1990; Veith *et al.*, 2005). Entlang der MT wandern die MT-abhängigen Motorproteine Kinesin und Dynein. Die Kinesine laufen zum Plusende (anterograder Transport) und Dynein zum Minusende (reterograder Transport) der MT (Egan *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2008; Takeshita *et al.*, 2014) und vermitteln in filamentösen Pilzen den Organell- und Vesikeltransport (Schoch *et al.*, 2003; Xiang & Plamann, 2003). Die Anzahl der Kinesine variiert in Pilzen, wohingegen nur ein Dynein existiert (Schoch *et al.*, 2003; Yamamoto & Hiraoka, 2003). *A. nidulans* besitzt 11 Kinesine (Rischor *et al.*, 2004). Das Dynein und eines der Kinesine, Kinesin-3, sind am Transport von frühen Endosomen beteiligt (Egan *et al.*, 2012; Steinberg, 2011; Zekert & Fischer, 2009). Die sekretorischen Vesikel werden vermutlich durch Kinesin-1 für eine längere Strecke über MT zur Hyphenspitze transportiert (Markina-Innarriraegui *et al.*, 2013; Pinar *et al.*, 2013). Die transportierten Vesikel akkumulieren sich am Spitzenkörper (SPK), welcher aus zwei Schichten von Vesikeln besteht (Hohmann-Marriott *et al.*, 2006; Riquelme & Sanchez-Leon, 2014). Die äußere Schicht wird aus Makrovesikeln und die Innere aus Mikrovesikeln gebildet (Riquelme & Sanchez-Leon, 2014; Schultzhaus *et al.*, 2015). Der SPK fungiert zum einen durch die akkumulierenden Vesikel als *vesicle supply centre* (VSC), bevor die Vesikel zu den wachsenden Regionen der Hyphenspitzen weitergeleitet werden und dadurch ist der VSC vermutlich für die Hyphenform verantwortlich (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Riquelme *et al.*, 2011). Zum anderen dient der SPK möglicherweise auch als Schaltstelle zwischen dem Langstrecken- und Kurzstreckentransport, also zwischen Mikrotubuli und Aktin (Riquelme, 2013).

Aktin zählt ebenfalls zu den Zytoskelett-Komponenten (Abbildung 1). In filamentösen Pilzen bildet F-Aktin (filamentöses Aktin) drei höhere Strukturen mit individuellen Funktionen aus (Takeshita *et al.*, 2014). F-Aktin wird aus linearen Polymeren von globulären Aktin (G-Aktin) Monomeren synthetisiert und bildet verflochtene doppelhelikale Filamente, welche als unabhängige Einheiten sowie als Cluster vorkommen und verschiedene Konformationen annehmen können (Lichius *et al.*, 2011). Diese Konformationen bestimmen die unterschiedlichen Strukturen und funktionellen Charakteristika der Polymere (Lichius *et al.*, 2011). Das dynamische F-Aktin kann durch eine Depolymerisation am Minusende sowie einer Polymerisation am

Plusende mit einer unterschiedlichen Rate zur gleichen Zeit angetrieben werden, was auch als tretmühlenartig beschrieben wird (Wegner, 1976). Das Anknüpfen von neuen G-Aktin Monomeren an Aktinfilamente geschieht hauptsächlich an der Plusseite des Filaments, jedoch ist es auch am Minusende, mit einer langsameren Rate, möglich. Für den Zusammen- oder Abbau des F-Aktins sind weitere Faktoren wie zum Beispiel kleine Rho-ähnliche GTPasen (*small Rho-type GTPases*) wichtig, welche von externen bzw. internen morphogenetischen Signalen reguliert werden und somit an spezifischen Regionen der apikalen PM zu gesteigertem oder vermindertem Nukleieren des F-Aktins an dieser Stelle führen (Lichius *et al.*, 2011). Die erste höhere F-Aktinstruktur sind die F-Aktinringe, welche zusammen mit dem Motorprotein Myosin II in die Septenbildung involviert sind (Taheri-Talesh *et al.*, 2012). Zusätzlich sind die Ringe als kontraktile Aktomyosinringe (*actomyosin rings*), einem Proteinkomplex aus F-Aktin und Myosin, bei der Zytokinese aktiv (Lichius *et al.*, 2011). F-Aktinpatches, welche hier als zweithöhere Struktur erwähnt werden, und die dritte Struktur, die F-Aktinkabel, werden mit Hilfe des Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*)-Komplexes bzw. Formins nukleiert. F-Aktinpatches sind „Körbe“ von vernetzten sowie verzweigten kurzen Aktinfilamenten und lokalisieren hauptsächlich in subapikalen Regionen, in denen die Maschinerie für die Endozytose lokalisiert ist (Araujo-Bazan *et al.*, 2008; Lichius *et al.*, 2011). Die F-Aktinkabel sind lineare, nicht-verzweigte Bündel von langen Aktinmikrofilamenten und lokalisieren am Apex der Hyphenspitze (Lichius *et al.*, 2011). Sie dienen als Transportnetz für Myosin V, das sekretorische Vesikel zur Hyphenspitze transportiert (Berepiki *et al.*, 2011; Lichius *et al.*, 2011; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2012).

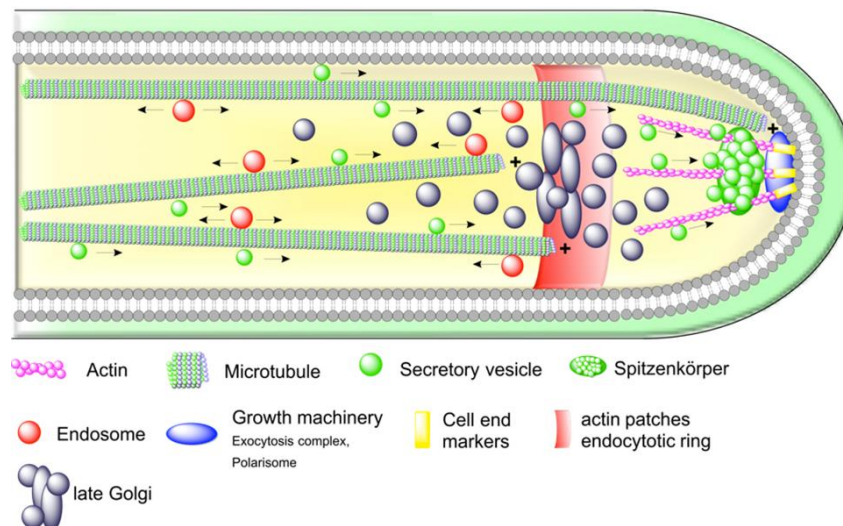


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Hyphenspitze von *A. nidulans* mit Organellen, Zytoskelett und Polaritätsfaktoren basierend auf Proteinlokalisierungen mittels fusionierten Fluoreszenzproteinen (Takeshita *et al.*, 2014).

Die beiden sehr dynamischen Zytoskelette, MT und Aktin, werden durch die Zellendmarker vernetzt, welche eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität haben (Fischer *et al.*, 2008). Zellendmarker sind kortikale Proteine, zu

denen unter anderem TeaA, TeaR und TeaC in *A. nidulans* zählen (Fischer *et al.*, 2008; Higashitsuji *et al.*, 2009; Takeshita *et al.*, 2008). TeaA wird über MT-Plusenden zur Hyphenspitze transportiert und ist durch die Interaktion mit dem prenylierten TeaR in der PM verankert (Takeshita *et al.*, 2008; Takeshita & Fischer, 2011). Zusätzlich kann TeaA mit TeaC an der Hyphenspitze interagieren, welches wiederum mit dem Formin SepA interagiert (Higashitsuji *et al.*, 2009). Das einzige Formin in *A. nidulans* SepA ist an der Hyphenspitze sowie den Septen lokalisiert und katalysiert die Aktinkabelbildung (Higashitsuji *et al.*, 2009; Takeshita & Fischer, 2011).

Die Vesikel, welche über MT und Aktin zum SPK transportiert werden und dort akkumulieren, müssen letztendlich mit der Plasmamembran (PM) fusionieren, so dass die gelieferten Stoffe, wie zum Beispiel Chitin, abgegeben oder in die PM eingebaut werden können. Für die Vesikelfusionierungen mit der Membran werden bei dem letzten Schritt der Exozytose der Exozystkomplex sowie SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins*) benötigt. Der Exozystkomplex vermittelt das Andocken an der PM und die SNAREs erleichtern die Fusion zwischen der Donor- und der Zielfmembran (Riquelme, 2013).

2.2 Sterol-reiche Domänen (SRDs) in Pilzen

Eukaryotische Zellmembranen differenzieren sich in unterschiedliche funktionelle Bereiche (Lingwood & Simons, 2010; Rajendran & Simons, 2005). Sie stellen unter anderem, indem sie für Wasser, Ionen oder Nährstoffe selektiv permeabel sind, eine wichtige Barriere dar (Herman *et al.*, 2015). Die Plasmamembran besteht aus einer Doppelschicht amphipathischer Lipide, welche sich aus Glycerophospholipiden, Sphingolipiden und Sterolen zusammensetzen (Goni, 2014; Head *et al.*, 2014). In einer Mischung aus Glycerophospholipiden können sich Sphingolipide und Sterole in Mikrodomänen anreichern und werden als *lipid rafts* bezeichnet (Maxfield, 2002; Simons & Toomre, 2000). Diese *lipid rafts* wirken an unterschiedlichen Stellen für spezifische Proteinlokalisierungen, wie zum Beispiel für GPI-verankerte und lipidassoziierte Proteine mit und spielen eine wichtige Rolle in der Zellkommunikation und -polarität (Schuck & Simons, 2004; Simons & Toomre, 2000; Stuermer, 2010). Die Größe dieser Mikrodomänen ist unterschiedlich und hängt von der Membranzusammensetzung ab (Pike, 2006). Die heterogenen und sehr dynamischen Sterol-Sphingolipid–angereicherten Domänen wurden mit einer Größe von 10-200 nm definiert, sie kann jedoch von einigen Nanometern bis hin zu ein paar Mikrometern variieren (Pike, 2006; Ziolkowska *et al.*, 2012).

In Pilzen wurde eine Art dieser Mikrodomäne anhand des hohen Sterolgehaltes durch Filipinfärbung charakterisiert und somit folglich als sterolreiche Domäne bezeichnet (Alvarez *et al.*, 2007). Filipin ist ein natürliches, fluoreszierendes sowie ein an Sterol bindendes Antibiotikum und kann durch die Bindung an Sterol dieses mikroskopisch sichtbar machen (Drabikowski *et al.*, 1973). So wurden in *S. cerevisiae* und *Cryptococcus neoformans* unter anderem die Spitze der *mating site* (Bagnat & Simons,

2002; Nichols et al., 2004), in *Schizosaccharomyces pombe* die Zellenden (Wachtler et al., 2003) sowie in *Candida albicans* und *A. nidulans* die Hyphenspitzen (Martin & Konopka, 2004; Pearson et al., 2004; Takeshita et al., 2012) und die Septen (Martin & Konopka, 2004; Takeshita et al., 2012) mit Filipin sichtbar gemacht (Abbildung 2). In einer *A. nidulans mesA*-Mutante, bei der keine Aktinkabel mehr an der Hyphenspitze lokalisieren, wurde eine depolarisierte Filipinfärbung mit vermehrter Färbung im subapikalen Bereich beobachtet. Die Färbung an den Septen war in dieser Mutante allerdings nicht beeinträchtigt, was eine unterschiedliche Regulierung der SRDs an der Hyphenspitze und den Septen vermuten lässt (Alvarez et al., 2007).

Die SRDs sind in Pilzen einzigartig und wurden bisher noch nicht in Säugetierzellen beschrieben (Alvarez et al., 2007). Sie wirken am polaren Wachstum von *C. albicans* (Martin & Konopka, 2004) sowie *A. nidulans* mit (Li et al., 2002; Pearson et al., 2004; Takeshita et al., 2008), jedoch ist weder ein Bildungsmechanismus noch ihre genaue Funktion bekannt (Alvarez et al., 2007). Die SRDs spielen eine wichtige Rolle in der Positionierung von Zellendmarkern und somit auch für das polare Wachstum (Takeshita et al., 2008). Sterole, sowie andere Lipide, welche im ER synthetisiert werden, werden entweder über einen vesikulären oder einen nicht-vesikulären Transport innerhalb der Zelle befördert (Beh et al., 2012; Shapiro et al., 2011). Sterole sind größtenteils wasserunlöslich und werden vermutlich über den nicht-vesikulären Transport zu den Organellen transportiert (Beh et al., 2001).

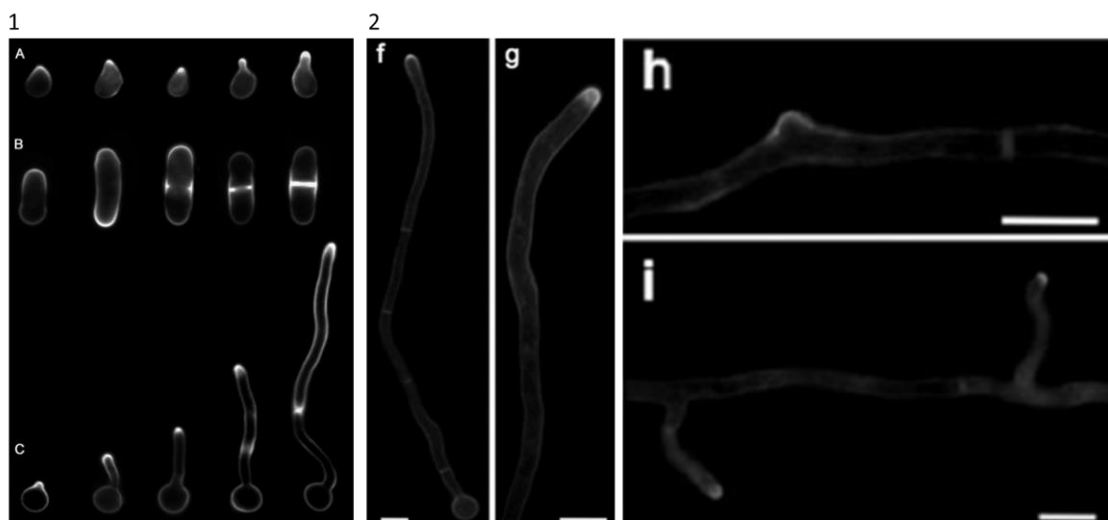


Abbildung 2: Beispiele für SRDs anhand der Filipinfärbungen in unterschiedlichen Organismen. (1) (A) *S. cerevisiae* Zellen zeigen ein Signal an der Spitze der *mating site*. (B) *S. pombe* Zellen weisen in der *log*-Phase Signale am Ende der stabförmigen Zelle und an der Teilungsachse auf. (C) *C. albicans* mit Signalen an den Hyphenspitzen und Septen. (Alvarez et al., 2007); (2) (f-i) *A. nidulans* mit Signal an den Hyphen (f und g), den Septen (f und h) und den Verzweigungen (h und i) (Takeshita et al., 2012).

2.3 Oxysterolbinde Protein (OSBP)-verwandte Proteine (ORPs)

2.3.1 Homologe oxysterolbinde Proteine (Osh) aus *S. cerevisiae*

An dem Transfer während des nicht-vesikulären Steroltransports könnten oxysterolbinde Protein (OSBP)-verwandte Proteine (ORPs; *oxysterol-binding protein-related proteins*) beteiligt sein (Beh *et al.*, 2012). Allgemein können diese Proteine auch noch in der Lipidwahrnehmung (*lipid sensing*), der Zellsignalisierung und dem Vesikeltransport involviert sein (Vihervaara *et al.*, 2011). Die ORPs bilden eine große Familie und gehören zu den Lipidtransferproteinen (Raychaudhuri & Prinz, 2010). Die ORPs sind im ganzen Reich der Eukaryoten vorhanden und besitzen die charakteristische Carboxy-terminale OSBP-verwandte (ORD) Domäne (*OSBP-related domain*) (Raychaudhuri & Prinz, 2010; Ridgway, 2010; Weber-Boyvart *et al.*, 2014). In Säugetieren wurden zwölf Gene gefunden (Lehto *et al.*, 2001) und in *S. cerevisiae* existieren sieben homologe oxysterolbinde Proteine (Osh; *OSBP homolog (Osh) proteins*) (Beh *et al.*, 2001). Die Säugetier ORPs und die Hefe Osh-Proteine teilen sich Sequenzhomologien. Es gibt jedoch auch Unterschiede (Beh *et al.*, 2012), auf welche weiter unten in diesem Abschnitt eingegangen wird. ORPs wurden durch Untersuchungen in einigen Zellmodellen und Organismen als Lipidtransporter oder Vermittler von Lipidsignalen identifiziert, welche eine unerwartete Vielzahl von zellulären Prozessen regulieren (Oikkonen & Li, 2013; Raychaudhuri & Prinz, 2010; Ridgway, 2010). Trotzdem wird ihr genauer molekularer Funktionsmechanismus bis heute schlecht verstanden (Oikkonen & Li, 2013). Die Hefe-Oshs sind einzeln nicht essentiell, teilen sich aber mit der zellulären Sterol-Homöostase eine wichtige Funktion. Die Deletionen von allen sieben ORPs in Hefe sind letal, wohingegen kein offensichtlicher Phänotyp bei Deletionen jedes einzelne *osh*-Gens in Bezug auf das Zellwachstum gefunden wurde (Beh *et al.*, 2001). In verschiedenen Hefe *osh*-Deletionsstämmen mit eingebrachten Konstrukten, welche es erlaubten einzelne Gene gezielt zu aktivieren, führten die Deletionen von sechs *osh*-Genen zu schwerwiegenden Defekten in der Sterol- und Lipidverteilung sowie in der Endozytose, was für eine essentielle Funktion der ORPs spricht (Beh & Rine, 2004). Die Säuger besitzen für den Sphingolipid-Transport zusätzlich noch ein *Ceramid Transportprotein* (CERT), für welches in Hefe kein Homolog existiert; trotzdem gilt für die ORPs allgemein das generelle Beispiel als sterol- und phosphoinositol (PI)-abhängiger Regulator von Lipidmetabolismus und Signalübertragung (Beh *et al.*, 2012; Kajiwara *et al.*, 2014).

Die ORPs besitzen außer der konservierten ORD-Domäne mit dem Erkennungsmotiv EQVSHHPP noch weitere Domänen. Drei der sieben Osh-Proteine (Osh1-7) in Hefe besitzen am Amino-Terminus zusätzliche Domänen wie die *Ankyrin Repeats*, eine *Pleckstrin homology* (PH)-Domäne, ein FFAT (*two phenylalanines in an acid tract*) Motiv (FFAT) und die Golgi *dynamics* (GOLD)-Domäne (Abbildung 3) (Beh *et al.*, 2001; Im *et al.*, 2005; Schulz & Prinz, 2007). PH-Domänen binden an Phosphoinositole (PIs)

und regulieren die Zielbestimmung der Proteine an die Membranen (Beh *et al.*, 2001). Die *Ankyrin Repeats* vermitteln Protein-Protein-Interaktionen und wurden in einigen Proteinen, inklusive den Zytoskelettproteinen und einigen Transkriptionsfaktoren, gefunden (Beh *et al.*, 2001). Protein-Protein-Interaktionen werden auch durch die GOLD Domäne vermittelt (Raychaudhuri & Prinz, 2010). Das FFAT Motiv interagiert mit VAMP (*vesicle-associated membrane protein*)-verbundenen Proteinen (VAPs), welche Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sind (Loewen *et al.*, 2003).

Die Einteilung der sieben Osh-Proteine erfolgt anhand ihrer Strukturähnlichkeiten. Die Gruppe 1 umfasst die Proteine Osh1p (Swh1p) und Osh2p, wohingegen der Gruppe 2 nur Osh3p zugeteilt wurde (Abbildung 3). Gruppe 3 beinhaltet Osh4p (Kes1p)- und Osh5p (Hes1p)-Proteine. Die letzte Gruppe, die Gruppe 4, schließt Osh6p und Osh7p ein (Schulz & Prinz, 2007).

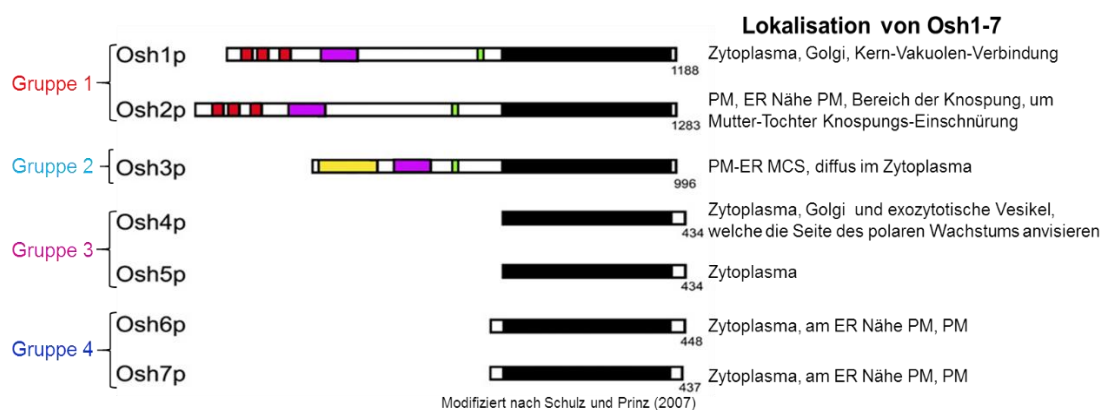


Abbildung 3: Proteinstruktur und Lokalisation von Osh1-7 in *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Proteine weisen unterschiedliche Aminosäurelängen auf (434-1283 AS). Die konservierte ORD (schwarz) und zusätzliche Domänen sind bei Osh1-7 vorhanden. Rot: *Ankyrin Repeats*, lila: *Pleckstrin homology* (PH) Domäne; grün: „two phenylalanines in an acid tract“ (FFAT) motif, schwarz: *Oxysterol-binding protein-related Domäne* (ORD), gelb: *Golgi dynamics* (GOLD) Domäne; modifiziert nach (Alfaro *et al.*, 2011; Beh *et al.*, 2001; Kvam & Goldfarb, 2004; Levine & Munro, 2001; Li *et al.*, 2002; Schulz & Prinz, 2007; Schulz *et al.*, 2009; Stefan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2005a)

Die Osh1-7 Proteine lokalisieren in Hefezellen an verschiedenen Orten (Abbildung 3).

Die Lokalisierung von Osh1p wird im Zytoplasma (Kvam & Goldfarb, 2004), dem Golgi (Levine & Munro, 2001) und der Kern-Vakuole-Verbindung (NVJ; *nucleus-vacuole junction*) zusammen mit Nvj1p (ER-Membranprotein) beobachtet (Levine & Munro, 2001; Wang *et al.*, 2005a). Frühere Studien zeigen, dass $\Delta nvj1$ Hefezellen in der stationären Phase eine Delokalisierung von GFP-Osh1 von beiden Organellen (Kern und Vakuole) aufweisen und dafür die *Ankyrin Repeats* des Proteins wichtig sind (Levine & Munro, 2001). Die *Ankyrin Repeats* von Osh1 können zusätzlich zu Nvj1p mit Vac8 (Protein der Vakuolenmembran) interagieren. Eine Interaktion dieser beiden Proteine ist für die NVJ bedeutsam (Levine & Munro, 2001). Die Mutante $\Delta osh1$ zeigte bei 25°C auf Minimalmedium mit wenig Tryptophan eine Wachstumsbeeinträchtigung, wohingegen bei höheren Temperaturen im Vergleich zum Wildtyp keine

Beeinträchtigung festgestellt wurde (Levine & Munro, 2001). Osh1p interagiert mit Hilfe seines FFAT-Motivs mit dem ER ansässigen VAP-Protein Scs2p (Loewen *et al.*, 2003).

Osh2p lokalisiert am ER in der Nähe der PM und an Orten des polaren Wachstums (Levine & Munro, 2001; Schulz *et al.*, 2009). An den ER-PM Kontaktbereichen (MCS; *membrane contact site*) lokalisiert Osh3p (Stefan *et al.*, 2011). Die Deletionen der Gene *Osh2* ($\Delta osh2$) und *Osh3* ($\Delta osh3$) zeigten bei Temperaturen von 25-37 °C das gleiche Wachstum wie der verwendete Wildtyp (Levine & Munro, 2001). Osh2p und Osh3p lokalisieren unabhängig voneinander zusammen mit den orthologen VAP-Proteinen Scs2p und Scs22p und regulieren eventuell zusammen die Enzymaktivität der Phosphoinositol-Phosphatase Sac1p an PI4P (Phosphoinositol-4-phosphat) an der ER-PM MCS (Stefan *et al.*, 2011; Weber-Boyyat *et al.*, 2014).

Die Lokalisation von Osh3p an den PM-ER Kontaktbereichen ist vermutlich PI4P-abhängig. So zeigte die Deletion der PH-Domäne von Osh3p, eine überwiegende Lokalisierung von Osh3 ^{ΔPH} im Zytoplasma, dadurch wurde postuliert, dass Osh3p PI4P oder PI4,5P₂ (Phosphoinositol-4,5-bisphosphat) in der PM erkennt (Stefan *et al.*, 2011). Die Struktur von PI4P-gebundenem Osh3p wurde aufgeklärt und es wurde hierbei interessanterweise festgestellt, dass die Bindungsstelle für Sterolmoleküle zu klein ist und Osh3p somit keine Funktion in der Sterolbindung haben kann. Jedoch fanden die Autoren heraus, dass am Eingang des Liganden-Hohlraumes eine Spalte vorliegt, die die PI-Hälfte von PI4P beherbergt und die Aminosäurereste, welche die Spalte „auskleiden“, in allen ORPs hoch konserviert sind. (Olkkonen, 2013; Tong *et al.*, 2013).

Das bekannteste der Osh-Proteine ist das Osh4p, was auch als Kes1p bezeichnet wird und unter den ORPs wahrscheinlich das am besten untersuchte Protein darstellt (Beh *et al.*, 2012). Osh4p wird an der PM, an Golgi-Membranen und an Orten des polaren Wachstums und der Sekretion beobachtet (Alfaro *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2014). Osh4p lokalisiert in Abhängigkeit von Sec6 in Verbindung mit exozytotischen Vesikeln, welche an den Ort des polaren Wachstums transportiert werden (Alfaro *et al.*, 2011). *osh* Δ *osh4-1^{ts}*-Hefezellen (*osh* Δ bezieht sich auf die Deletion aller *OSH*-Gene) zeigen einen Defekt im Koppeln von exozytotischen Vesikeln mit der PM an Stellen des polaren Wachstums (Alfaro *et al.*, 2011). In sekretorischen Vesikeln wurde eine Reduktion des PI4P Levels im Zusammenhang mit Osh4 gezeigt und in *osh1-7* Δ *osh4^{ts}*-Zellen sind zwei Exozystuntereinheiten, Sec15p und Sec3p, an den polaren Sekretionsstellen bei einem Temperaturwechsel falsch lokalisiert. Die Exozystuntereinheit Sec15p assoziiert mit sekretorischen Vesikeln die zu den Sekretionsstellen geliefert werden und Sec3p kann direkt die Seite der Exozytose in der PM erkennen (Ling *et al.*, 2014).

Des Weiteren reguliert Osh4 durch die Bindung von verschiedenen PIs das PI4P-Level am Golgi (Fairn *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2013; Stefan *et al.*, 2011). Es wird auch postuliert, dass Osh4p mit Hilfe von PI4P mit Auswirkungen auf den sekretorischen Membrantransport sowie die Stoffwechselkontrolle bindet und, dass diese Membranverbindungen durch die Sterolbindung negativ reguliert werden. Dies

wurde mit einer Mutante (*osh4/kes1^{Y97F}*) gezeigt, die in der Sterolbindung fehlerhaft war und somit die Zellproliferation, aufgrund der verbesserten PI4P-abhängigen Verbindung mit dem TGN (*trans*-Golgi-Netzwerk) und den Endosomen, stört (Mousley *et al.*, 2012). Der Osh4p-vermittelte Wachstumsarrest war teilweise durch Aminosäuremängel verursacht, bedingt durch die Inhibierung der Expression der Aminosäure-Permease, und Störung der *Target of rapamycin complex 1* (TORC1)-Signalisierung. Die Genexpression wird normalerweise von Gcn4, einem transkriptionellen Aktivator des allgemeinen Aminosäure-Kontroll- (CAAC) Regulons, angetrieben. Die von Osh4p erzeugte TGN/endosomale Signalisierung ist bisher nicht verstanden, aber könnte in die Sphingolipid-Anreicherung in TGN/endosomalen Membranen involviert sein. Diese Untersuchungen stehen jedoch nicht im Einklang mit einer einfachen Funktion von Osh4p als einem Sterol- und PI4P-Transporter, sondern suggerieren, mit Einfluss auf mehrere zelluläre Funktionen, eine komplexe Rolle in der TGN/endosomalen PI4P/Sphingolipid-Signalisierung (Oikkonen, 2013).

Der Steroltransport mit exogenem Sterol wurde in Hefemutanten von Osh4p getestet. Dafür wurde zum einen ein Stamm *oshΔ osh4-1* (*oshΔ* bezieht sich auf die Deletion der anderen *OSH*-Gene), welcher ein temperatur-sensitives Allel von einem der *Osh*-Gene (*osh4-1*) besitzt, und zum anderen ein Stamm, der alle *Osh*-Proteine (*OSH⁺*) besitzt, verwendet. Die Veresterung von exogenem Sterol war in der *oshΔ*-Mutante langsamer als bei *OSH⁺*. Deswegen wird postuliert, dass Osh4p und andere *Osh*-Proteine für einen effizienten Transfer von exogenem Cholesterol von der PM zum ER benötigt werden (Raychaudhuri *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde bei einem *in vitro*-Assay die Bindung von Ergosterol und dessen Transport zwischen einer Donor- und Akzeptormembran mit Osh4p gezeigt (Raychaudhuri *et al.*, 2006).

Die Lokalisierung von Osh5p ist im Zytoplasma (Schulz & Prinz, 2007) vorhanden und könnte eine Rolle beim Steroltransport zwischen der PM und dem ER spielen (Raychaudhuri *et al.*, 2006). Die Einzeldelation von Osh5p hatte kaum Auswirkungen auf das Wachstum (Beh *et al.*, 2001).

Die beiden Proteine Osh6p und Osh7p lokalisieren an der ER-PM MCS und beide sind fähig Phosphatidylserin (PS) zu binden (Maeda *et al.*, 2013; Moser von Filseck *et al.*, 2015a; Schulz *et al.*, 2009). Es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass PS über den nicht-vesikulären Transport vom ER (seinem Biosyntheseort) zur PM (seiner Aktivitätsstelle) anhand von Osh6p transportiert wird (Maeda *et al.*, 2013; Moser von Filseck *et al.*, 2015a). In Hefezellen, bei denen Osh6 und Osh7 ausgeschaltet wurden, zeigte sich ein Defekt im PS-Transport vom ER zur Plasmamembran (Maeda *et al.*, 2013). Zusätzlich wurde in einer neueren Studie gezeigt, dass *in vitro* die PS-Transportaktivität von Osh6p durch einen PI4P-Gradienten stimuliert wird, wenn dieser Gradient schon vorher zwischen den Membranen existiert (Moser von Filseck *et al.*, 2015a). Osh6p und Osh7p interagieren mit Vps4p, einem Mitglied der AAA (*ATPase associated with a variety of cellular activities*)-Familie, welche diverse zelluläre Aktivitäten, wie zum Beispiel die energie-

abhängige Proteinfaltung, besitzen. Die genaue Funktion dieser Interaktion ist jedoch unklar (Wang *et al.*, 2005a).

Im Zytoplasma konnten bis auf Osh2p alle anderen Osh-Proteine mit einem diffusen und unspezifischen subzellulären Signal lokalisiert werden (Kvam & Goldfarb, 2004; Levine & Munro, 2001; Li *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005a).

Die Liganden, welche an die ORD binden, sind bei einigen Oshs noch nicht eindeutig geklärt. Die Identifizierung der Liganden erfolgte anhand von Strukturanalysen oder durch *in vitro* Bindungs- oder Transport-Assays (de Saint-Jean *et al.*, 2011; Im *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2013; Moser von Filseck *et al.*, 2015a; Raychaudhuri *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2013). Der Ligand Cholesterol ist bei Osh1p nicht eindeutig, jedoch wurde dieser für Osh2p identifiziert (Schulz *et al.*, 2009). Osh3p bindet PI4P und auch Cholesterol ist als Ligand nicht ausgeschlossen (Schulz *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2013). Osh4p kann die verschiedenen Liganden Ergosterol, Cholesterol, 7-Hydroxycholesterol (7-OHC), 20-Hydroxycholesterol (20-OHC), 25-Hydroxycholesterol (25-OHC), Dehydroergosterol, 16,22-Diketoscholesterol und PI4P binden, wohingegen die Bindungen für PIP₂ und PS nicht eindeutig geklärt sind (de Saint-Jean *et al.*, 2011; Im *et al.*, 2005; Raychaudhuri *et al.*, 2006). Osh5p bindet Cholesterol (Schulz *et al.*, 2009) und Osh6p sowie Osh7p binden beide PS sowie PI4P (Maeda *et al.*, 2013; Moser von Filseck *et al.*, 2015a). Die Idee des gemeinsamen Liganden PI4Ps ist für alle Oshs sowie ORPs nach wie vor angesehen (Moser von Filseck *et al.*, 2015a).

Die Bindung von Lipiden/Sterolen sowie PIs bzw. PI4P sind zwei wichtige Funktionen der Osh-Proteine (Olkkonen, 2013). Doch wie das Ergosterol an die PM der Hyphenspitze in filamentösen Pilzen gelangt und dadurch die SRD-Struktur entstehen kann, ist noch unklar.

2.3.2 Menschliche ORPs

Für die menschlichen ORPs wird postuliert, dass sie in der Regulation des Lipidmetabolismus, dem Vesikeltransport und im zellulären Signalprozess eine wichtige Rolle spielen. Die Hefe-Oshs hingegen sind in den intrazellulären Steroltransport, in die Vesikelknospung vom Golgi-Apparat und der Etablierung der Zellpolarität involviert (Hynynen *et al.*, 2009).

Nachfolgend werden die Domänen der menschlichen ORPs (Abbildung 4) benannt und es wird kurz auf ihre Funktion eingegangen, sollte sich diese von den Motiven bzw. Domänen der Hefe-Oshs unterscheiden. Die Proteine ORP5 und ORP8 besitzen zu den anderen Domänen zusätzlich noch eine Transmembrandomäne (Abbildung 4), wodurch sie im ER verankert werden (Du *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2008). Die zweite Spleißvariante von ORP3 besitzt anstelle der ORD eine nicht-verwandte Sequenz zur ORD. Die Domänen bzw. Motive regulieren die Membranzielbestimmung und die

Funktion der ORPs durch die Interaktion mit zellulären Proteinen und Lipiden (Vihervaara *et al.*, 2011). Anhand ihrer Genstruktur und der Aminosäuresequenzhomologien werden sie in sechs Unterfamilien (Abbildung 4) eingeteilt, jedoch unterscheiden sich die ORPs in ihren Expressionsmustern, den subzellulären Lokalisierungen und in ihren Substratspezifitäten. Die Säugetierproteine ORP1, ORP4 sowie ORP9 besitzen durch unterschiedliche Promotoren sowohl lange (l; *long*) als auch kurze (s; *short*) Varianten, ORP3 weist durch das Spleißen acht verschiedene Isoformen auf (Vihervaara *et al.*, 2011). Für mehrere Säugetier ORPs wie OSBP, ORP9L und ORP5 wurde *in vitro* gezeigt, dass die ORD wichtig für einen Transfer von Cholesterol zwischen Membranen ist (Du *et al.*, 2011; Ngo & Ridgway, 2009). Zusätzlich binden alle ORPs noch verschiedene PIPs (Phosphoinositole) (Ngo *et al.*, 2010).

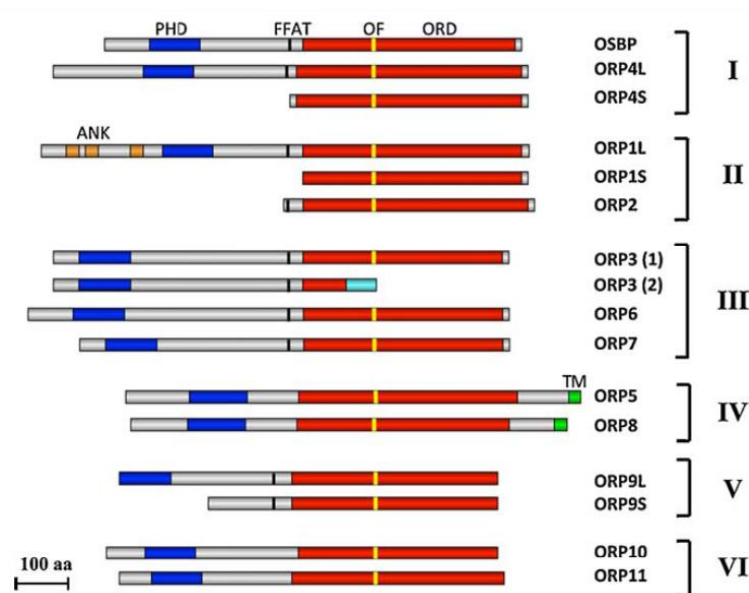


Abbildung 4: Schematische Abbildung der menschlichen ORP-Familie. Die Hauptstrukturelemente der ORPs sind identifiziert. Die römischen Zahlen deuten auf die Unterfamilien mit den nahe verwandten Proteinen hin. Die Farbcodes sind: rot: *OSBP-related* (ligandenbinde) Domäne; gelb: *OSBP-fingerprint* (OF) Motiv; dunkelblau: *Pleckstrin homology* (PH) Domäne; orange: *Ankyrin Repeats* (ANK); schwarz: *VAP targeting* (FFAT) Motiv; türkis: nicht verwandte Sequenz zur ORD in der ORP3 Spleißvariante 2; grün: Transmembrandomäne (TM); L und S in den Proteinennamen weisen auf die langen und kurzen Varianten hin (Vihervaara *et al.*, 2011).

Die Lokalisierungen und Funktionen der Säugetier ORPs lassen sich nicht immer eins zu eins mit denen der Hefe-Homologen vergleichen. So wird die Mehrzahl der menschlichen ORPs in dem cholesterin-reichen Organ, dem Gehirn, mit einem hohen Niveau exprimiert (Lehto *et al.*, 2004). Die ORPs im Menschen wurden zusätzlich zum Gehirn noch in anderen Geweben oder Organen gefunden und sind in viele verschiedene Funktionen involviert, weshalb hier nur auf ein paar mögliche Funktionen der sechs Unterfamilien eingegangen wird.

Die Erste der sechs Unterfamilien (Abbildung 4) wird vom OSBP und den beiden Varianten ORP4S und ORP4L gebildet (Vihervaara *et al.*, 2011).

OSBP ist zwischen dem Zytosol und den Membranen des Golgi-Apparats in Abhängigkeit vom zellulären Cholesterolgehalt und vom Transportstatus verteilt anzufinden (Mohammadi *et al.*, 2001; Ridgway *et al.*, 1992). Eine OSBP-Depletion verteilt die beiden *intra*-Golgi v-SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors*) GS28 (*Golgi SNARE of 28 kDa*) und GS15 (*Golgi SNARE of 15 kDa*) überall im Zytoplasma ohne die Lokalisation von Golgi t-SNAREs Syntaxin5 zu beeinflussen. Zusätzlich reduziert die Depletion von OSBP das Golgi-Enzym Mannosidase II und mislokalisiert die γ -COP (γ -Untereinheit des *coat protein complex I* (COP-I)) vom Golgi. γ -COP ist ein Bestandteil der COP-I-Vesikel, welche am *intra*-Golgi Transport beteiligt sind. Es wird postuliert, dass der Golgi Cholesterolspiegel, welcher durch OSBP kontrolliert wird, essentiell für die Golgi Lokalisation von *intra*-Golgi v-SNAREs ist, welche mit Hilfe eines angemessenen COP-I-Vesikel Transports reguliert werden (Nishimura *et al.*, 2013).

Zusätzlich lokalisiert OSBP neben dem Golgi-Apparat noch am ER. Diese beiden Interaktionen werden durch die PH-Domäne (Lagace *et al.*, 1997; Levine & Munro, 1998) sowie der FFAT-Domäne in Verbindung mit VAP (*vesicle-associated membrane protein-associated protein*) (Wyles & Ridgway, 2004), einem Typ II-Integralmembranprotein mit Verankerung im ER, vermittelt. OSBP wurde als ein *sterol-sensing scaffolding factor* identifiziert, der die Dephosphorylierung und dadurch die Aktivität wichtiger Komponenten (ERK, *extracellular-signal regulated kinases*) des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) Signalweges reguliert (Wang *et al.*, 2005b; Wang *et al.*, 2008). OSBP agiert auch als Sterolsensor und ist wahrscheinlich in die Regulation der Sphingomyelin-Synthese durch die Kontrolle der Lokalisation und Aktivität der PI4-Kinase II α sowie der Kontrolle des Ceramid-Transporters (CERT) involviert. CERT ist für den Transport von Ceramid vom ER zum Golgi, welches durch die Golgi-ansässige Ceramid-Synthase zu Sphingomyelin synthetisiert wird, zuständig (Banerji *et al.*, 2010; Perry & Ridgway, 2006). OSBP spielt vermutlich auch eine Rolle als sterol-abhängiger Regulator für den Leber Triacylglycerol (TAG)-Metabolismus und hat möglicherweise eine Funktion in der insulin-induzierten Signalkaskade (Olkkonen *et al.*, 2012).

OSBP könnte auch eine Rolle in Bakterien und Viren spielen, die für ihre eigene intrazelluläre Replikation und die Freisetzung ihrer Nachkommen das OSBP „kapern“ (Amako *et al.*, 2009; Auweter *et al.*, 2012). Die Untersuchung des Hepatitis C Virus (HCV) offenbarte, dass die PH-Domäne von OSBP, durch welche OSBP zum Golgi geleitet wird, durch eine Mutation in dieser Domäne nicht mehr funktionsfähig ist und somit die Freigabe der HCV-Partikel inhibiert. Zusätzlich konnte eine Interaktion von OSBP mit der N-terminalen Domäne I des HCV NS5A (*non-structural 5A*) Proteins nachgewiesen werden. Die Autoren postulierten eine funktionelle Rolle von OSBP im HCV Reifungsprozess (Amako *et al.*, 2009).

Die beiden Varianten von ORP4 (ORP4L und ORP4S) können *in vitro* Cholesterol zwischen Liposomen transferieren. ORP4L kann auch anhand der PH-Domäne PI4P im Golgi-Apparat binden. Die PH-Domäne bei ORP4L wird für eine normale Organisation des Vimentin-Netzwerks benötigt (Charman *et al.*, 2014). Das Intermediärfilamentprotein Vimentin ist in die Veresterung und den Transport von LDL-abgeleitetem Cholesterol verwickelt (Evans, 1994; Sarria *et al.*, 1992). Die Vimentinbindungsstelle liegt in der sterolbindenden Domäne von ORP4, aber ein N-terminaler Leucin-Repeat des FFAT-Motivs, die bei ORP4S fehlt, erhält die Integrität des Intermediärfilamentnetzwerkes aufrecht (Wyles *et al.*, 2007). In CHO (Chinesehamster ovary)-Zellen bewirkt die Überexpression von ORP4S ein Kollaps des Vimentin-Netzwerks in dicke Bündel oder inhibiert die Veresterung des LDL-Cholesterols. Daher wird postuliert, dass die Vimentin-ORP4-Interaktion in die Cholesterollieferung zum ER involviert sein könnte (Wang *et al.*, 2002). Jedoch ist die funktionelle Relevanz der ORP4-Vimentin-Interaktion bisher noch nicht bekannt, allerdings binden andere ORPs und VAP (*vesicle-associated membrane protein-associated protein*) an Aktin und MT Zytoskelette und beeinträchtigen deren Aktivität (Charman *et al.*, 2014). Das *Silencing* aller ORP4 Varianten in HEK293- und HeLa-Zellen resultierte in einem Wachstumsarrest, aber nicht in Zelltod. In nicht-transformierten Darmepithelzellen (*intestinal epithelial cells*; IEC-18) verursachte das *Gene-Silencing* von ORP4 Apoptose, welche durch Caspase 3 (*cysteinylnl-aspartate specific protease 3*) und Poly (ADP-Ribose)-Polymerase Verarbeitung, einer DNA Spaltung und einer JNK- (*Jun N-terminal Kinase*) Phosphorylierung gekennzeichnet war. IEC-18, welche mit onkogenem H-Ras transformiert wurden, hatten eine erhöhte Expression von ORP4L- und ORP4S-Proteinen und waren gegenüber dem wachstum-inhibierenden Effekt des ORP4 *Silencing* resistent. Die Autoren postulierten, dass ORP4 das Überleben von schnell proliferierenden Zellen unterstützt (Charman *et al.*, 2014).

Die Proteine ORP1S, ORP1L und ORP2 (Abbildung 4) bilden die zweite Unterfamilie (Vihervaara *et al.*, 2011).

ORP1 besitzt zwei Varianten des Proteins und beide wurden in verschiedenen Geweben gefunden. ORP1S ist hauptsächlich in der Skelettmuskulatur und im Herz zu finden, wohingegen ORP1L die häufigste Form in Gehirn und Lunge ist (Johansson *et al.*, 2003). ORP1S ist größtenteils zytoplasmatisch lokalisiert und ORP1L lokalisiert an späten Endosomen (LE, *late endosomes*), die durch die Interaktion der *Ankyrin Repeats* mit der aktiven GTP-gebundenen Form von Rab7 vermittelt wird (Johansson *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2005). Durch diese Interaktion wird das Positionieren der Endosomen an den „Mikrotubulischienen“ reguliert (Johansson *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde ein signifikanter Anteil von ORP1S, jedoch nur sehr wenig von ORP1L, im Zellkern gefunden (Johansson *et al.*, 2003).

ORP2 lokalisiert als Sterolrezeptor an Lipidtropfen (LDs, *lipid droplets*) in der Menschenzelllinie A431 (Epithelhautzellen). LDs sind intrazelluläre Organellen und bestehen aus einem neutralen Lipidkern, der von einer Monoschicht von Phospholipiden und Cholesterol umgeben ist. Das *Silencing* von ORP2 verminderte die TAG Hydrolyse und steigerte die Cholesterol-Esterbildung, welche jedoch nur beobachtet wurden, wenn die LD-Bildung durch die Behandlung mit Oleaten verbessert worden war. Somit spielt ORP2 möglicherweise eine Rolle in der Regulation des neutralen Lipidmetabolismus, möglicherweise als Faktor, der den zellulären Metabolismus von Triacylglycerolen mit dem des Cholesterols integriert (Hynynen *et al.*, 2009).

Die dritte Unterfamilie (Abbildung 4) wird von den zwei Varianten von ORP3 (1 und 2) sowie ORP6 und ORP7 gebildet (Lehto *et al.*, 2004; Vihervaara *et al.*, 2011).

ORP3 kommt in den Nieren sowie im Lymphgewebe vor (Lehto *et al.*, 2001; Lehto *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde die Expression von ORP3 auch in Epithelzellen, neuronalen und blutbildenden Zellen sowie in bestimmten Krebsformen wie Leukämie gefunden (Lehto *et al.*, 2008). ORP3 ist an der Plasmamembran sowie dem ER lokalisiert und interagiert via des FFAT-Motivs mit dem ER-Membranprotein VAPA (*vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein A*) (Lehto *et al.*, 2005; Weber-Boyvatz *et al.*, 2015). Eine ORP3-Phosphorylierung kontrolliert die Verbindung mit VAPA (Weber-Boyvatz *et al.*, 2015). ORP3 interagiert mit R-Ras, einer kleinen GTPase, welche Zelladhäsion, -verbreitung und -migration reguliert. *Gene-Silencing* von ORP3 in menschlichen embryonalen Nierenzellen HEK293 (*human embryonic kidney*) resultierte in einer veränderten Organisation des Aktin Zytoskeletts, beeinträchtigte Zell-Zell-Adhäsion, verstärkte die Zellausbreitung und führte zum Anstieg der β 1-Integrin-Aktivität (Lehto *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Stimulation von Zellen mit PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*) die Rekrutierung des ORP3-VAPA-Komplexes zur PM Seite verstärken, welche den ER-PM-Kontaktbereich repräsentieren könnten. In PMA-stimulierten Zellen wurde ein neues konserviertes FFAT-ähnliches Motiv gefunden, welches die ORP3-VAPA Interaktion reguliert und für die ORP3-VAP vermittelnde Kontrolle von R-Ras und β 1-Integrin-Aktivität erforderlich ist (Weber-Boyvatz *et al.*, 2015).

ORP6 ist im Gehirn und der Skelettmuskulatur zu finden und wurde in Mauszellen und menschlichen Zellen untersucht (Lehto *et al.*, 2004). Im Gehirn waren die höchsten Expressionen von ORP6 im Occipitallappen, in dem Temporallappen, in der Großhirnrinde, der Hirnbrücke (Pons) und der Putamen aufzufinden. Das ORP6 Protein wurde in einer Vielzahl von Mausgeweben, einschließlich Epidermis-Epithelzellen und adnexalen Strukturen der Haut, nachgewiesen sowie in respiratorischen Epithelien detektiert (Lehto *et al.*, 2004). Das endogene ORP6 ist in

embryonalen Karzinomzellen der Maus überwiegend mit der Kernmembran verbunden (Lehto *et al.*, 2004). ORP6 ist am ER (Lehto *et al.*, 2004) und anhand der PH-Domäne an der PM zu finden (Lehto *et al.*, 2005). Der Ligand, der durch ORP6 gebunden wird, ist bisher noch nicht bekannt (Olkkonen, 2013).

ORP7 wird in Epithelien des Magen-Darmtraktes stark exprimiert und lokalisiert am Golgi, sowie in kultivierten Zellen, teilweise am ER (Lehto *et al.*, 2004). ORP7 interagiert mit dem GATE-16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*) Protein, welches eine Rolle in der Autophagosom-Biogenese spielt (Zhong *et al.*, 2011). GATE-16 wurde als peripheralmembranes Protein des Golgi-Komplexes identifiziert und interagiert mit dem Golgi v-SNARE GS28 (*Golgi SNARE of 28 kDa*). GATE-16 hält GS28 in einer transport-fähigen Form und schützt es vor der Proteolyse (Muller *et al.*, 2002). Beim *knock-down* von ORP7 waren die GS28 Proteine vermehrt vorhanden, wohingegen eine Überexpression von ORP7 zu einer Reduktion der GS28-Proteine führte. Zusätzlich zeigte die ORP7-Überexpression in den meisten Zellen die Bildung von Vakuolenstrukturen, welche als RFP-LC3 (RFP, *red fluorescent protein*; LC, *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) induziert wurden. RFP-LC3 repräsentieren autophagische Elemente. GATE-16 wurde auch in den vakuolären ORP7-positiven Elementen gefunden, was darauf hindeutet, dass überschüssiges ORP7 einen erhöhten Einfluss von GATE-16 in Autophagosomen hat. Ein Ligand von ORP7, das 25-Hydroxycholesterol (25-OH), könnte die proteasom-vermittelte Degradierung von GS28 erleichtern, ein Effekt, der von ORP7 abhängt. Somit wird postuliert, dass ORP7 die GS28 Proteinestabilität durch GATE-16 Abscheidung negativ reguliert und 25-OH einen Effekt auf GS28 und die Golgi-Funktion haben könnte (Zhong *et al.*, 2011).

ORP5 und ORP8 (Abbildung 4) bilden die vierte Unterfamilie (Vihervaara *et al.*, 2011).

ORP5 kann Sterol *in vitro* zwischen Liposomen transportieren und ist mit seiner Transmembrandomäne im ER verankert. Eine Akkumulation in späten Endosomen (LE, *late endosomes*) und Lysosomen, welche an den Cholesterol-Transportdefekt in Niemann Pick C (NPC) Fibroblasten erinnern, wird durch einen ORP5 *knock-down* verursacht. Das Cholesterol akkumulierte in limitierenden Membranen von endosomalen Kompartimenten in ORP5-dezimierten Zellen, wohingegen der Abbau von NPC1 oder beiden ORP5 und NPC1 in luminalen Akkumulationen von Cholesterol resultiert. Die Depletion von ORP5 führte zusätzlich zu Mislokalisierungen von *trans-Golgi*-ansässigen Proteinen an endosomalen Kompartimenten, welche von einem funktionellen NPC1 abhängen. Somit könnte durch die Kooperation von ORP5 mit NPC1 einen Austritt von Cholesterol an Endosomen/Lysosomen an MCS (*membrane contact sites*) vermittelt werden (Du *et al.*, 2011).

ORP8 ist vermutlich in die transkriptionelle Kontrolle des Lipid-Metabolismus involviert. ORP8 interagiert physisch mit der Zellkernporenkomplex-Komponente NUP62

(*nucleoporin*). Es wurde gezeigt, dass ORP8 den Hauptanteil des aktiven Kern-SREBPs (*sterol-regulatory element binding protein*) reguliert und dies dementsprechende Auswirkungen auf den Lipidmetabolismus *in vivo* und *in vitro* hat. SRBP ist ein Transkriptionsfaktor, der zusammen mit dem SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) die zelluläre Cholesterol-Biosynthese und -Aufnahme sowie die Fettsäuresynthese kontrolliert (Zhou *et al.*, 2011). Außerdem hat ORP8 Auswirkungen auf die Expression von ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A 1*) und den zellulären Cholesterol-Efflux. Eine gesteigerte ABCA1-Expression wurde durch die Hochregulation der Promotoraktivität von LXR (Leber X Rezeptoren) via einem *Gene-Silencing* von ORP8 in Makrophagen gefunden (Yan *et al.*, 2008). Die Expression von ORP8 wurde in Makrophagen, Leber, Milz, Nieren und Gehirn gefunden und ORP8 ist durch die Transmembrandomäne mit dem ER verbunden (Yan *et al.*, 2008).

In die fünfte Unterfamilie sind die beiden Proteine ORP9L und ORP9S (Abbildung 4) integriert (Vihervaara *et al.*, 2011).

ORP9 lokalisiert am ER und am Golgi (Ngo & Ridgway, 2009; Wyles & Ridgway, 2004), jedoch ist seine Rolle im Bezug auf die Sekretion und den Lipidtransport bisher unbekannt. Zusätzlich vermittelt ORP9L *in vitro* einen PI4P-abhängigen Cholesterol-Transport zwischen Liposomen. Deshalb wird postuliert, dass seine primäre *in vivo*-Funktion der Steroltransfer zwischen dem Golgi und dem ER ist. *Gene-Silencing* von ORP9L verursacht eine Golgi-Fragmentierung, die Inhibierung des *Vesikular stomatitis Virus* Glykoprotein-Transport vom ER und die Akkumulation von Cholesterol in Endosomen/Lysosomen (Ngo & Ridgway, 2009). Das *Silencing* der ORP9L-Expression in CHO-Zellen resultierte in der Cholesterol-Akkumulation in filipin-positiven Endosomen/Lysosomen, aber beeinträchtigte nicht die zelluläre Cholesterolmenge oder -synthese, wodurch postuliert wird, dass die Cholesterolbewegung zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat letztendlich andere *downstream* Kompartimente beeinflussen soll (Ngo *et al.*, 2010). Die Überexpression von ORP9S führte zur kompletten Einstellung des Proteintransports und dem Zellwachstum und wird somit als dominant negativer Inhibitor angesehen. ORP9L und ORP9S könnten Sterolbinde- oder Transferproteine sein, welche eine entgegengesetzte Auswirkung auf den ER-Golgi-Transport haben sollen (Ngo & Ridgway, 2009). ORP9L könnte für die Aufrechterhaltung eines optimalen Cholesterolspiegels im sekretorischen Signalweg erforderlich sein (Ngo *et al.*, 2010).

Die sechste und damit letzte Unterfamilie (Abbildung 4) bilden die beiden Proteine ORP10 und ORP11 (Vihervaara *et al.*, 2011).

ORP10 ist mit Mikrotubuli (MT) sowie dem Golgi-Komplex verbunden und spielt eine Rolle in der β -Lipoprotein-Sekretion von menschlichen Hepatozyten (Nissila *et al.*, 2012). ORP10 co-lokalisierte durch seine Überexpression mit MT und induziert eine kabelartige Morphologie durch die Verwendung von Depolymerisationsagenzien. Durch

das *silencing* von ORP10 in Hepatomzellen wurden der Cholesterol- und die Triacylglycerol (TAG)-Synthese sowie die Sekretion von VLDL (*very-low-density lipoprotein*) gesteigert (Ngo *et al.*, 2010). Somit könnte ORP10 in den zellulären Lipidmetabolismus involviert sein (Nissila *et al.*, 2012) und durch die Interaktion mit den MT könnte ein direkter Zusammenhang mit der Organellenpositionierung und der Sekretion bestehen (Ngo *et al.*, 2010).

ORP11 wurde in menschlichen Eierstöcken, Hoden, der Niere, der Leber, dem Magen, dem Gehirn sowie in menschlichem Fettgewebe gefunden. Reichlich ORP11 wurde zusätzlich in Epithelzellen der Nierentubuli, Hodentubuli, dem Blinddarm und der Haut lokalisiert. In HEK293-Zellen ist ORP11 am Golgi-Komplex und den LE ansässig und co-lokalisiert mit GFP-Rab9, TGN46 und GFP-Rab7. Die Überexpression von ORP11 in den Zellen zeigte lamellenartige Lipidkörper, welche mit vakuolären Strukturen oder dem Golgi-Komplex verbunden sind, was auf eine Störung des Lipidtransports hindeutet. ORP11 bildet mit dem verwandten ORP9 Dimere und ORP9 spielt eine Rolle in der Zielauswahl von ORP11 zum Golgi-Komplex (Zhou *et al.*, 2010).

OSBP/ORPs binden Cholesterol oder dessen Derivate und sind durch ihren Transport oder ihre Regulation wahrscheinlich in verschiedene Krankheiten involviert. Die Fehllokalisierung von Cholesterol oder den Derivaten sowie ihren Akkumulationen in neurologischen oder kardiovaskulären Krankheiten könnten durch eine veränderte Expression oder Aktivität der OSBP/ORPs möglich sein. Allerdings wurden bis heute noch keine menschlichen Krankheiten als ein Resultat von Mutationen in OSBP/ORPs identifiziert. Durch die funktionelle Redundanz innerhalb der Familie könnte die Expression von Phänotypen, assoziiert mit einer Mutation in einem einzigen OSBP/ORP-Gen, verhindert werden. Jedoch scheint es immer wahrscheinlicher, dass OSBP/ORPs in verschiedenen Krankheiten wie der Dyslipidämie, den Beckwith-Wiedemann-Syndromen oder der Niemann-Pick C involviert sein könnten (Ngo *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2008).

2.4 Membrankontaktbereiche (MCS)

Membrankontaktbereiche (MCS, *membrane contact sites*) sind Bereiche, in denen zwei Organellmembranen sehr nahe beieinander sind und der Abstand beider Organellen kleiner als 30 nm ist (Lahiri *et al.*, 2015). Ultrastrukturstudien wiesen an vielen MCS eine Distanz zwischen beiden Membranen in der Größenordnung eines Einzelproteins (10 nm) nach (Levine, 2004). Dieser Kontaktbereich ist hoch konserviert und wurde in vielen unterschiedlichen Organismen gefunden, jedoch ist über seine biologische Bedeutung wenig bekannt (Levine & Loewen, 2006). MCSs spielen eine wichtige Rolle in der Regulation intrazellulärer Lipidzusammensetzungen sowie deren Verteilung (Lahiri *et al.*, 2015) und/oder sind auch meist in den Calcium (Ca^{2+})-Austausch involviert (Helle *et al.*, 2013). Die Ca^{2+} -Signalisierung spielt in vielen Prozessen eine wichtige Rolle, so zum Beispiel in der Zellwanderung, der Transkription oder der

Kontraktion von Muskelzellen (Helle *et al.*, 2013). In den sechziger Jahren konnte in isolierten Mitochondrien durch die Zugabe von Ca^{2+} eine Ca^{2+} -Aufnahme *in vitro* nachgewiesen werden (Carafoli, 2012). Die Mitochondrien nehmen Ca^{2+} aufgrund der ER-Mitochondrien MCSs auf, jedoch ist die physiologische Rolle dieser Aufnahme noch unklar. Es werden drei verschiedene Rollen dieser Aufnahmen postuliert. Erstens könnten Ca^{2+} -abhängige Enzyme, welche in der Mitochondrienmatrix gefunden wurden, das aufgenommene Ca^{2+} für ihre besonderen Funktionen benötigen. Der zweite Vorschlag ist, dass Ca^{2+} im Zytosol toxisch ist und die Mitochondrien als Ca^{2+} -Puffer dienen, um den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg zu limitieren um somit den IP_3R (Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor), ein Ca^{2+} -Kanal, im ER zu stimulieren. Die dritte mögliche Funktion ist, dass mitochondrisches Ca^{2+} als ein wichtiger Auslöser für die mitochondrische Apoptose wirken könnte (Helle *et al.*, 2013). Zusätzlich haben die MCS wichtige Funktionen im Lipidmetabolismus inne (Shapiro *et al.*, 2011). So induziert eine Calciumwahrnehmung Kontakte zwischen dem ER und der PM, welche den Phosphoinositol (PI)-Transfer zur PM an der ER-PM MCS unterstützen könnte (Chang *et al.*, 2013; Giordano *et al.*, 2013).

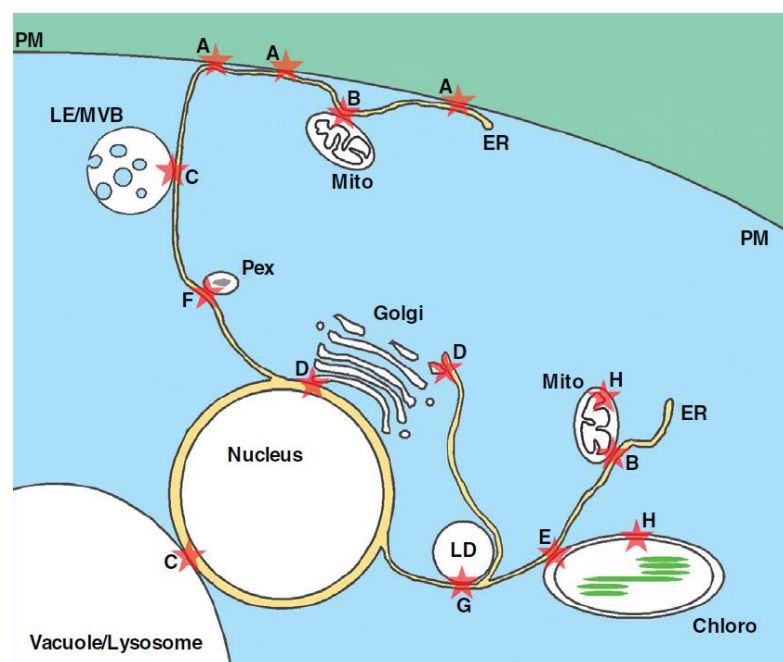


Abbildung 5: Positionen von Membrankontaktbereichen (MCS). (A) Endoplasmatisches Retikulum (ER)–Plasmamembran (PM); (B) ER–Mitochondrien (Mito); (C) ER–*late endosomes* (LE)/*multivesicular bodies* (MVB) und ER–Lysosomen. In Hefe sind Kontakte zwischen Kern und Vakuole. (D) ER–Golgi; (E) ER und Chloroplasten (Chloro). (F) ER–Peroxisomen (Pex); (G) ER–*lipid droplets* (LD); (H) Kontaktbereiche zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran und Chloroplasten (Toulmay & Prinz, 2011).

Die Mehrheit des nicht-vesikulären Lipidaustauschs zwischen Organellen geschieht wahrscheinlich an den MCS (Lahiri *et al.*, 2015) und wird *in vitro* zwischen Membranen von Lipidtransferproteinen (LTPs) durch die Steigerung der Membranlipidaustauschrate erleichtert (Lev, 2010). Die MCS wurden unter anderem zwischen dem ER und dem Golgi sowie der PM und vielen anderen Organellen wie den Mitochondrien,

Endosomen, Lysosomen, Peroxisomen oder Chloroplasten beobachtet und könnten somit besonders bedeutend für die ER Funktion sein (Abbildung 5) (Holthuis & Levine, 2005; Toulmay & Prinz, 2011).

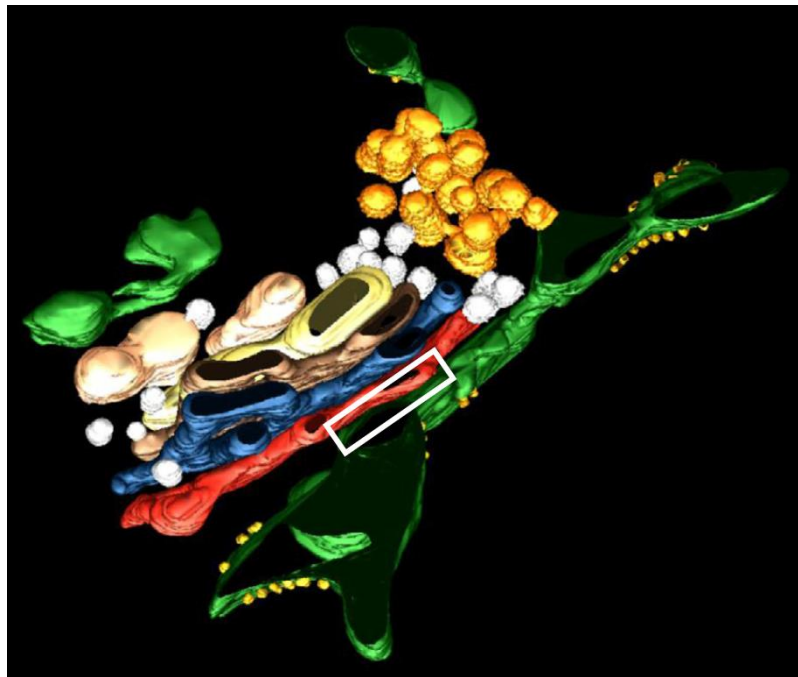


Abbildung 6: 3D-Rekonstruktion des ER-*trans*-Golgi-Kontaktbereiches. Die Kontaktbereiche des ERs (grün) und der *trans*-Golgi-Zisterne (rot) wurden mit einem weißen Rahmen markiert. Kleine gelbe Punkte zeigen Ribosomen am ER. In blau, braun, gelb und hellbraun sind die *medial*- und *cis*-Golgi-Zisternen abgebildet. Gelb-orange Bereiche repräsentieren die Ausgangsseite des ERs (COPII-umhüllt) und weiße Bereiche kennzeichnen COPI-Vesikel. Die dreidimensionale Rekonstruktion eines Golgistapels von HepG2-Zellen durch Schockgefrieren unter Druck wurden via Elektronentopographie generiert. Modifiziert nach (De Matteis & Rega, 2015).

Das OSBP (Oxysterolbinde)-Protein, welches in Säugetieren vorhanden ist, zählt zu den LTPs und wurde am ER-TG (*trans*-Golgi, TG) gefunden (Mesmin *et al.*, 2013b). Obwohl der Golgi konservierte Funktionen besitzt, unterscheidet er sich trotzdem in seiner Form und Organisation zwischen den niederen und den höheren Eukaryoten (Papanikou & Glick, 2014). Die erste 3D-Rekonstruktion von ER-TG Kontaktbereichen (Abbildung 6) erfolgte anhand der Säugetierzellen HepG2 (Nierenzellen einer normalen Ratte), welche unter Druck schockgefroren und mit einem Elektronentomographen analysiert wurden. Die ER-Zisternen näherten sich meist an zwei *trans*-Golgi-Zisternen an und werden von den Autoren als *trans*-ER bezeichnet (Ladinsky *et al.*, 1999). Dieses *trans*-ER hängt mit dem gesamten ER-Netzwerk zusammen und besitzt nur auf der freien Seite Ribosomen. Das *trans*-ER ist meist zu zwei *trans*-Golgi-Zisternen in diesen Regionen abgeflacht, wodurch der Bereich keine Vesikelknospungen aufweist (Ladinsky *et al.*, 1999; Ladinsky *et al.*, 2002). In Pflanzen besteht eine ER-*cis*-Golgi-Interaktion an den Ausgangsseiten des ERs (*exit sites*, ERES), welche möglicherweise auch zu den MCS gezählt werden könnte. ERES sind die Seiten, an denen neu-synthetisierte Proteine vom ER exportiert werden, welche durch die Elemente der

COPII-Maschinerie markiert werden und den ER-Proteinexport vermitteln (De Matteis & Rega, 2015).

Oxysterolbinde Proteine (OSBP) helfen beim Transport des Cholesterols vom ER zum Golgikomplex bzw. entgegengesetzt des Phosphatidylinositol-4-phosphats (PI4P) zwischen den Kontaktseiten dieser beiden Organellen. Der reine Cholesteroltransfer wird durch die hohe PI4P-Konzentration im Golgikomplex und einer niedrigen PI4P-Konzentration im ER angetrieben (Mesmin *et al.*, 2013b).

Eine andere MCS wurde zwischen dem ER und den Mitochondrien gefunden. Die in die Mitochondrienverschmelzung involvierte Dynamin-ähnliche GTPase Mitofusin 2 (Mfn2) verbindet das ER und die Mitochondrien in Säugetierzellen (de Brito & Scorrano, 2008). Die meisten Mfn2-Proteine lokalisieren in der äußeren Mitochondrienmembran (*outer mitochondria membrane*, OMM) und ein Anteil lokalisiert zusätzlich im ER. Durch Dimerbildung von Mfs2 im ER sowie Mfn2 und dem Mitofusin1 in der OMM werden das ER und die Mitochondrien verbunden (Toulmay & Prinz, 2011).

In Hefe wurde ein *ER-mitochondria Encounter Structure* (ERMES)-Komplex gefunden (Kornmann *et al.*, 2009). Dieser Proteinkomplex besteht aus vier Untereinheiten, wovon eine Untereinheit (Mmm1) in die ER Membran integriert ist, zwei Untereinheiten (Mdm10 und Mdm34) in der äußeren Mitochondrienmembran (*outer mitochondria membrane*, OMM) inseriert sind und einem zytosolischen Protein (Mdm12) (Kornmann *et al.*, 2009; Kornmann *et al.*, 2011; Toulmay & Prinz, 2011). Drei Proteine des ERMES-Komplexes (Mmm1; Mdm12 und Mdm34) enthalten die Lipidbindedomäne SMP, welche in einer Gruppe von konservierten eukaryotischen Synaptotagmin-ähnlichen, mitochondrial und PH-Domänen enthaltene Proteinen (*Synaptotagmin-like, Mitochondrial and PH-domain containing proteins*; SMP) häufig vorkommt und den Lipidaustausch zwischen dem ER und den Mitochondrien ermöglichen könnte (Lahiri *et al.*, 2015). So wurde in Zellen, bei denen der ERMES fehlt, ein reduzierter ER-Mitochondrien-Kontakt (Lahiri *et al.*, 2014) und in den Mitochondrien eine veränderte Phospholipidzusammensetzung festgestellt (Lahiri *et al.*, 2015). ERMES ist bisher in höheren Eukaryoten noch nicht nachgewiesen worden (Wideman *et al.*, 2013).

Zusätzlich bilden sich die MCS in Hefe unter anderem an der *nucleus vacuole junction* (NVJ), welche sich aus einem zellkernumgebendem ER und der Vakuole formt (Kvam & Goldfarb, 2004). Für die NVJ wird bisher von zwei Funktionen ausgegangen. Zum einen als Ort für die Mikroautophagie des Zellkerns (*microautophagy of the nucleus*; PMN), einem Prozess, bei dem Teile des Hefezellkerns für die Degradierung in das Lumen der Vakuole aufgenommen werden (Roberts *et al.*, 2003). Zum anderen ist an der NVJ Osh1p ansässig, welches als Lipidtransferprotein postuliert wird und ausschließlich während der stationären Phase lokalisiert (Kvam & Goldfarb, 2004; Levine & Munro, 2001). Osh1p selbst wird jedoch nicht für die Bildung der NVJ- und der PMN-Funktion in ausgehungerten Zellen (*starved cells*) benötigt (Kvam & Goldfarb, 2004). Bisher ist unklar, ob die NVJ aufgrund der Verbindung zwischen Zellkern und

Vakuole sowie ihrer Funktion in der PMN auch in höheren Eukaryoten konserviert ist (Elbaz & Schuldiner, 2011).

Es wurden Kontaktbereiche von Endosomen/Lysosomen mit dem ER in höheren Eukaryoten beschrieben. Offenbar lokalisiert ORP1L (*oysterol-binding protein-related protein 1L*) an den späten Endosomen (*late endosome*, LE) und fungiert als Cholesterolsensor. ORP1L kann unterschiedliche Konformationsstadien annehmen, welche den LE-Cholesterolgehalt widerspiegeln. Bei Bedingungen mit niedrigem Cholesterolgehalt unterzieht sich ORP1L einem Konformationswechsel, welcher eine Bildung von LE-ER-Kontakten induziert. Jedoch wird bei einem höheren Cholesterolgehalt der LE-ER-Kontakt behindert und die Verbindung mit Motorproteinen gefördert. Folglich wird der Cholesterolgehalt in die interzelluläre Positionierung der LE umgesetzt (Rocha *et al.*, 2009). Als Reaktion auf einen erhöhten Cholesterolgehalt an der limitierenden Membran von LE/LY (LY, Lysosomen) interagiert der ER Steroltransporter ORP5 (*OSBP-related proteins*, ORP) mit dem endosomalen Sterolsensor NPC1 (Niemann-Pick C1), um vorübergehend einen funktionellen Kontakt zu bilden, welcher eine effiziente Entfernung des endosomalen Cholesterols erlaubt. Vermutlich ist diese Interaktion zwischen ORP5 und NPC1 in Bereichen näherer Umgebung von LE/LY-ER MCS aktiviert (Du *et al.*, 2011).

Der Kontaktbereich zwischen dem ER und der PM weist anhand von EM-Analysen auf ungefähr 1100 Kontaktbereiche hin, die pro Hefezelle existieren könnten (Pichler *et al.*, 2001). Osh3p lokalisiert an der ER-PM MCS zusammen mit zwei VAP-Proteinen (Scs2p und Scs22p) und beide könnten möglicherweise zusammen die ER-ansässige Phosphatase Sac1 regulieren, welche PI4P in der PM zu PI dephosphoryliert (Stefan *et al.*, 2011).

Obwohl einige MCS bekannt sind, sind die Biogenese, die Regulation und die Rolle der MCS zwischen dem ER und manch anderen Organellen bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt (Elbaz & Schuldiner, 2011).

2.5 Aufbau von Osh4p sowie sein Funktionsmodell in *S. cerevisiae* und das OSBP-Funktionsmodell

Osh4p besteht aus drei α -Helices und 19 β -Faltblättern, welche eine β -Fass Struktur bilden und dadurch eine Sterolbindetasche formen (Im *et al.*, 2005). Der Innenbereich der Tasche ist hydrophob und kann zum Beispiel ein Sterol oder ein PI4P beherbergen (Abbildung 7). Der Zylinder ist an einer Seite durch ein Bündel von α -Helices blockiert und auf der anderen Seite durch einen „Deckel“ verschlossen. Dieser „Deckel“ wird von einem kurzen N-terminalen Segment gebildet, einer amphipathischen α -Helix, die über einen flexiblen Linker mit der Tasche verbunden ist (Beh *et al.*, 2012; Moser von Filseck *et al.*, 2015b; Schulz & Prinz, 2007). Das Sterol ist mit seiner 3 β -Hydroxylgruppe zu dem Boden des hydrophobischen Bindetunnels hin orientiert. Seine Seitenketten sind in Kontakt mit dem Inneren des „Deckels“, wodurch möglicherweise

eine stabile geschlossene Konformation entsteht (Im *et al.*, 2005). Durch die Bildung von Van-der-Waals-Bindungen wird das Sterol im Osh4p gehalten (Im *et al.*, 2005). Die Strukturanalyse von Osh4p zeigte, dass neben Cholesterol auch Ergosterol sowie mehrere Oxysterole (Im *et al.*, 2005) mit unterschiedlichen Affinitäten (Vihervaara *et al.*, 2011) binden können. Zusätzlich zu diesen Bindungen wurden für Osh4p noch Interaktionen mit Phosphoinositolen nachgewiesen. Kristallstrukturanalysen weisen darauf hin, dass die Sterolbindetasche die PI4P-Acyلكetten beherbergt, wobei geladene Reste einer benachbarten Tasche die Erkennung der PI4P-Kopfgruppe definieren (de Saint-Jean *et al.*, 2011).

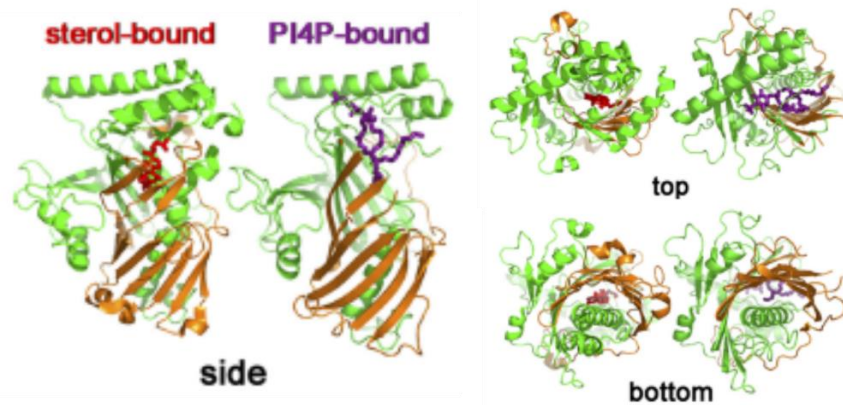


Abbildung 7: Verschiedene Ansichten der räumlichen Struktur des *S. cerevisiae* Osh4-Proteins mit Sterol- oder PI4P-Bindung. Die Struktur (grün und orange) von Osh4 besteht aus drei α -Helices und 19 β -Faltblättern, welche eine β -Zylinder Struktur bilden. Die konservierte ORD-Domäne ist orange markiert. Die zugeordnete Bindung von Sterol (rot) und PI4P (lila) von Osh4 zeigt die entsprechenden Positionen der unterschiedlichen Domänen in dem gefalteten Protein (Beh *et al.*, 2012; Im *et al.*, 2005).

Das aktuelle Arbeitsmodell von Osh4p in *S. cerevisiae* und seine Funktionsweise wurde anhand der neusten Erkenntnisse von der Arbeitsgruppe Drin erstellt (Moser von Filseck *et al.*, 2015b).

Das Ergosterol wird von Osh4p aus dem ER extrahiert, das es durch den entgegengesetzten Austausch mit PI4P am Golgi abgibt, und transportiert PI4P vom Golgi zum ER (Abbildung 8). Die ATP-verbrauchende Konvertierung von PI in PI4P durch die Phosphoinositid-4-Kinase Pik1p würde energetisch die Sterol/PI4P-Zyklen durch Osh4p antreiben, dadurch würde die aktive Freigabe von Sterol in den *trans*-Golgi hinein und die Erzeugung eines Sterolgradienten gefördert. Im ER wird PI4P durch die Phosphatase Sac1p zu PI dephosphoryliert. Da PI4P größtenteils in der PM und dem *trans*-Golgi lokalisiert und im ER nicht vorhanden ist, wird dieser Transport vermutlich durch einen PI4P-Gradienten angetrieben (Moser von Filseck *et al.*, 2015b).

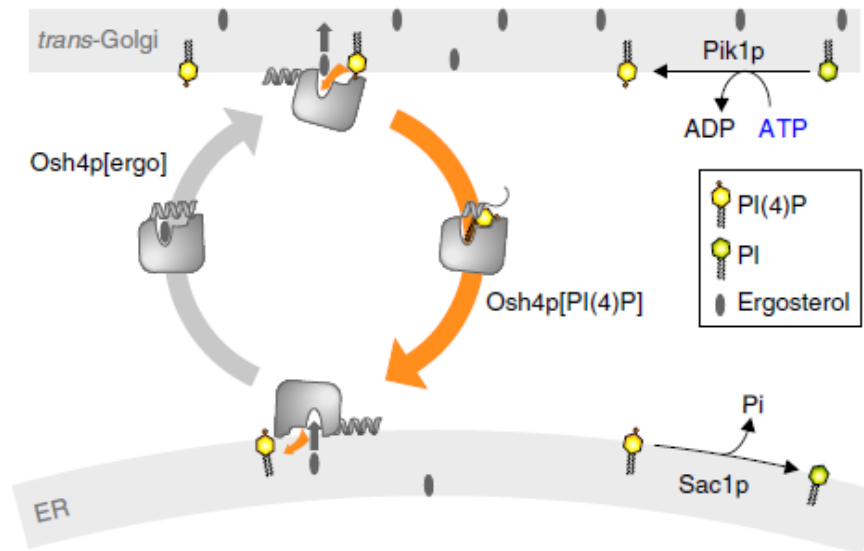


Abbildung 8: Modell von Sterol/PI4P-Transportzyklen vermittelt durch Osh4p an ER/Golgi Grenzfläche. Osh4 würde Ergosterol (grauer Pfeil) vom ER zum *trans*-Golgi transportieren und in entgegengesetzter Richtung PI(4)P (orangener Pfeil) vom Golgi zum ER durch einen Sterol/PI(4)P-Austausch. ATP-abhängige Phosphorylierung von PI zu PI(4)P durch Pik1p am *trans*-Golgi und die Hydrolyse von PI(4)P am ER anhand von Sac1p treibt die mehrfachen Sterol/PI(4)P-Austauschzyklen an und ermöglicht damit die Erzeugung und Aufrechterhaltung eines Sterolgradienten (Moser von Filseck *et al.*, 2015b).

Ein ähnliches Modell wurde ebenso durch neue Untersuchungen für Osh6p in Hefe, welches Phosphatidylserin (PS) transportiert, erstellt. Dieses Modell kann durch die nahe Verwandtschaft zu Osh6p sowie durch seinen Transport von PS auch für Osh7p transferiert werden. Die Funktionsweise von Osh6p erfolgt anhand eines PS-PI4P-Gradienten. PS wird vom ER extrahiert und an die PM via Osh6p transportiert. PS wird im Osh6 durch PI4P ausgetauscht, welches zum ER transportiert wird. Am ER wird PI4P durch Sac1p dephosphoryliert und an der PM durch Stt4p unter ATP-Verbrauch hydrolysiert (Moser von Filseck *et al.*, 2015a).

Diese beiden Modelle werden neuerdings als genereller Mechanismus angesehen, durch den die ORP/Osh-Proteine den PI4P-Metabolismus für einen direkten Aufbau des intrazellulären Lipidgradienten bilden (Moser von Filseck *et al.*, 2015a).

Für das menschliche ORP OSBP existiert ebenfalls ein Funktionsmodell (Abbildung 9). Die Phosphorylierung von PI zu PI4P wird auch in diesem Modell über eine Phosphoinositol-4-kinase ermöglicht und die Dephosphorylierung erfolgt durch Sac1. Der Cholesteroltransfer wird wie folgt postuliert: Zuerst überbrückt OSBP mit seiner PH-Domäne und dem FFAT-Motiv das ER mit dem *trans*-Golgi. Als nächstes ermöglicht die Membranbindung den Steroltransfer durch die ORD vom ER zur Golgi-Membran. Der Steroltransport ist mit der Rücklieferung von PI4P vom *trans*-Golgi zum ER gekoppelt. Schließlich wird PI4P, was einmal transferiert wurde, zu PI durch Sac1 hydrolysiert (Moser von Filseck *et al.*, 2014).

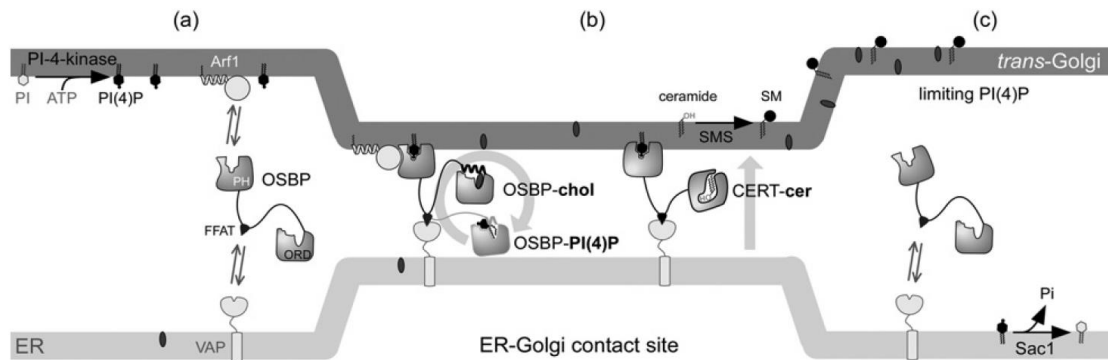


Abbildung 9: Funktion von OSBP an ER-Golgi Kontaktbereichen. (a) OSBP interagiert durch sein FFAT-Motiv mit dem ER-ansässigen VAP-Rezeptor und anhand seiner PH-Domäne mit Arf1 sowie PI4P. Arf1 ist in einem GTP-gebundenen Zustand. (b) Von daher bindet OSBP an die ER- und Golgi-Membran, sodass die Austauschzyklen von Cholesterin/PI4P funktionieren, wodurch ein Cholesteringradient erzeugt wird. Diese *Tethering*-Aktivität könnte die Rekrutierung von CERT durch PI4P und VAP erleichtern und das Synchronisieren des Cholesterin- und Ceramidflusses ermöglichen. Dementsprechend ist die Co-Anreicherung von Sterol und Sphingomyelin in den *trans*-Golgi garantiert. (c) Der PI4P-Verbrauch könnte letztendlich die Demontage der ER-Golgi-Kontaktbereiche auslösen und den Lipidtransfer stoppen. SMS: Sphingomyelin Synthase (Moser von Filseck *et al.*, 2014).

2.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von fünf homologen Steroltransportern (OshA-E) in *A. nidulans* und die Untersuchung ihrer Beteiligung am polaren Wachstum und der SRD-Organisation.

Die Generierung von *osh*-Deletionsstämmen sollte Aufschluss über ihre Funktion sowie die Auswirkungen auf die SRDs und die Zellendmarker liefern. Anhand ergosterolassoziierter Wirkstoffe sollte das Wachstumsverhalten der *osh*-Deletionsmutanten analysiert werden.

3 Ergebnisse

Sterole sind eine der essentiellen Membrankomponenten. Sie machen ungefähr 30 - 40 % der Plasmamembran (PM)- Lipide aus (Mesmin & Maxfield, 2009). Durch Minderung der Fluidität und Reduktion der Permeabilität für polare Moleküle beeinflussen sie die biophysikalischen Eigenschaften der PM (Ikonen, 2008).

Sterole werden im ER (Endoplasmatisches Retikulum) synthetisiert und schnell zur PM transportiert (Baumann *et al.*, 2005). Durch ihre Eigenschaften als hydrophobe Moleküle (Mesmin *et al.*, 2013a) müssen die Sterole „verpackt“ transportiert werden. Dieser Transport wird den *Lipid Transfer Proteinen* (LTPs) zugeschrieben (Mesmin *et al.*, 2013a), zu denen die ORPs (*Oxysterol-binding proteins (OSBP)-related proteins*) zählen (Tong *et al.*, 2013). Die ORPs besitzen wie die LTPs die Fähigkeit Sterol von einer Donormembran in ihr Inneres zu extrahieren und zu einer Akzeptormembran zu transferieren (Beh *et al.*, 2012). In *Saccharomyces cerevisiae* existieren sieben solcher ORP Proteine und wurden als OSH1-7 (*oxysterol-binding protein homologue 1-7*) bezeichnet. Die Hefeproteine Osh1-7 und ihre Funktion werden seit vielen Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Die Funktion der Osh-Proteine wurde bisher nur in Hefe, nicht aber in filamentösen Pilzen, untersucht. Filamentöse Pilze haben ein polares Wachstum an der Hyphenspitze. Neue Erkenntnisse könnten für die Forschung bei der Herstellung von Medikamenten gegen Pilze helfen oder zur Pilzbekämpfung in der Landwirtschaft genutzt werden. Im Zuge dieser Doktorarbeit sollte die Funktion der Steroltransporter in *A. nidulans* anhand von fünf oxysterolbindenden Proteinen (OshA-E) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Lokalisationsanalysen durchgeführt. Außerdem wurden die Auswirkungen von fünf hergestellten Deletionsstämmen *oshA-E* auf die SRDs und die Zellendmarkern untersucht. Ebenso wurde die Wirkung verschiedener ergosterolassoziierter Wirkstoffe auf die Deletionen *oshA-E* erforscht.

3.1 *Aspergillus nidulans* besitzt fünf verschiedene Osh-Proteine

3.1.1 Strukturen der *A. nidulans* Proteine OshA-E

In dem Modellorganismus *A. nidulans* wurden bisher noch keine oxysterolbindenden Proteine (Osh, *oxysterol-binding protein homologue*) beschrieben. Für die Suche nach Sequenzähnlichkeiten von homologen Oxysterol-binde Proteinen (Osh) in *A. nidulans* wurden die Aminosäuresequenzen der sieben bekannten oxysterolbindenden Proteine (Osh1-7) in *Saccharomyces cerevisiae* aus der Hefe Datenbank (<http://www.yeastgenome.org/>) zur Blast Analyse (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch

&LINK_LOC=blasthome) verwendet. Die ausgegebenen AN-Nummern der hypothetischen Proteine mit dem höchsten „Query Cover“ und dem E-Wert wurden mit der *A. nidulans* Datenbank verglichen.

In dieser Datenbank wurden fünf mögliche Gene gefunden, die für homologe oxysterolbindenden Proteine codieren. Die Proteine in *A. nidulans* wurden in alphabetischer Reihenfolge benannt. Dem Gen AN9063 wurde *oshA*, dem Gen AN3424 wurde *oshB*, den Genen AN2877 *oshC* und AN3807 *oshD* sowie AN3452 *oshE* zugeteilt. Die Gene *OshA*, *OshB*, *OshC* und *OshE* liegen auf Chromosom VI und *OshD* auf Chromosom II. Alle Proteine weisen die *Oxysterol-binding protein-related Domäne* (ORD) (Stefan *et al.*, 2011) mit unterschiedlichen Längen auf (Abbildung 10), welche von 350-380 AS variierten. Die Proteinstruktur wurde mittels der Datenbank InterProScann5 durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Mit einer Aminosäurengesamtanzahl von 1243 ist *OshA* das Größte unter den fünf Proteinen, gefolgt von *OshB* mit 935 AS. Diese beiden Proteine weisen zusätzliche Domänen auf, welche bei *OshC-E* nicht vorhanden sind. So weist *OshA* im N-terminalen Bereich drei *Ankyrin Repeats* und eine *Pleckstrin Homology* (PH)-Domäne auf, wohingegen im C-terminalen Bereich nur die ORD vorhanden ist. Die *Ankyrin Repeats* vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, wohingegen die PH-Domänen oft für die Bindung von Phosphoinositolen (PIs) zuständig ist (Raychaudhuri & Prinz, 2010). *OshB* besitzt wie *OshA* eine PH-Domäne, jedoch keine *Ankyrin Repeats*, und zusätzlich noch eine *Golgi dynamics* (GOLD) Domäne. Die GOLD-Domäne vermittelt, wie die *Ankyrin Repeats*, Protein-Protein-Interaktionen (Anantharaman & Aravind, 2002; Raychaudhuri & Prinz, 2010).

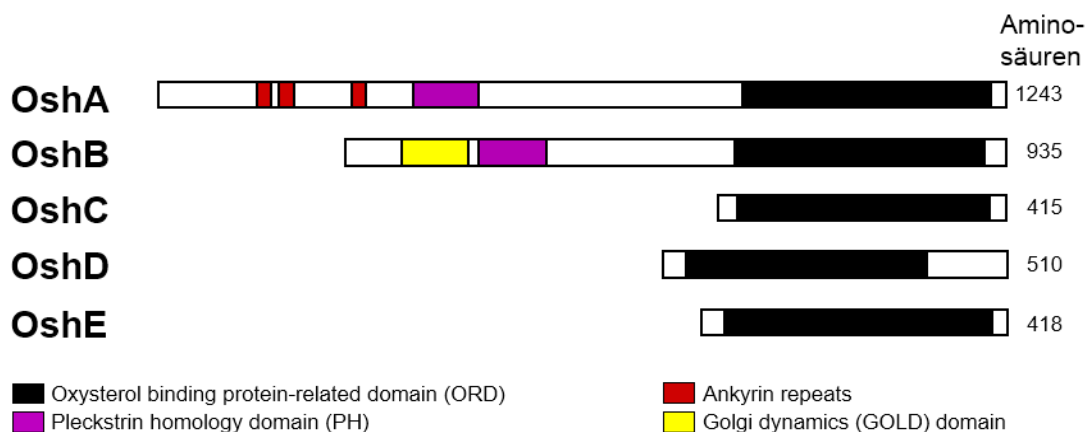


Abbildung 10: Proteinstrukturen von homologen Oxysterol-binde Proteinen (Osh) OshA-E in *A. nidulans*. Die Proteine weisen verschiedene Domänen und unterschiedlichen Längen der Aminosäuren (415-1243 AS) auf. Rot: *Ankyrin Repeats*, lila: *Pleckstrin homology* (PH) Domäne, schwarz: *Oxysterol-binding protein-related Domäne* (ORD), gelb: *Golgi dynamics* (GOLD) Domäne; Die Erstellung der Proteinstruktur wurde mittels der Datenbank InterProScann5 durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Orthologen zeigte die Konservierung der *Ankyrin Repeats* und einer PH (*Pleckstrin homology*)-Domäne in der N-terminalen Hälfte. Die Osh Orthologen der Gruppe 2 wiesen am N-Terminus die konservierte *Golgi dynamics* (GOLD)-Domäne und die konservierte PH-Domäne auf. Die restlichen Osh-Proteine (OshC, OshD und OshE) wiesen außer der ORD keine zusätzlichen Domänen auf und wurden in drei unterschiedliche Gruppen (Gruppe 3-5) eingeteilt.

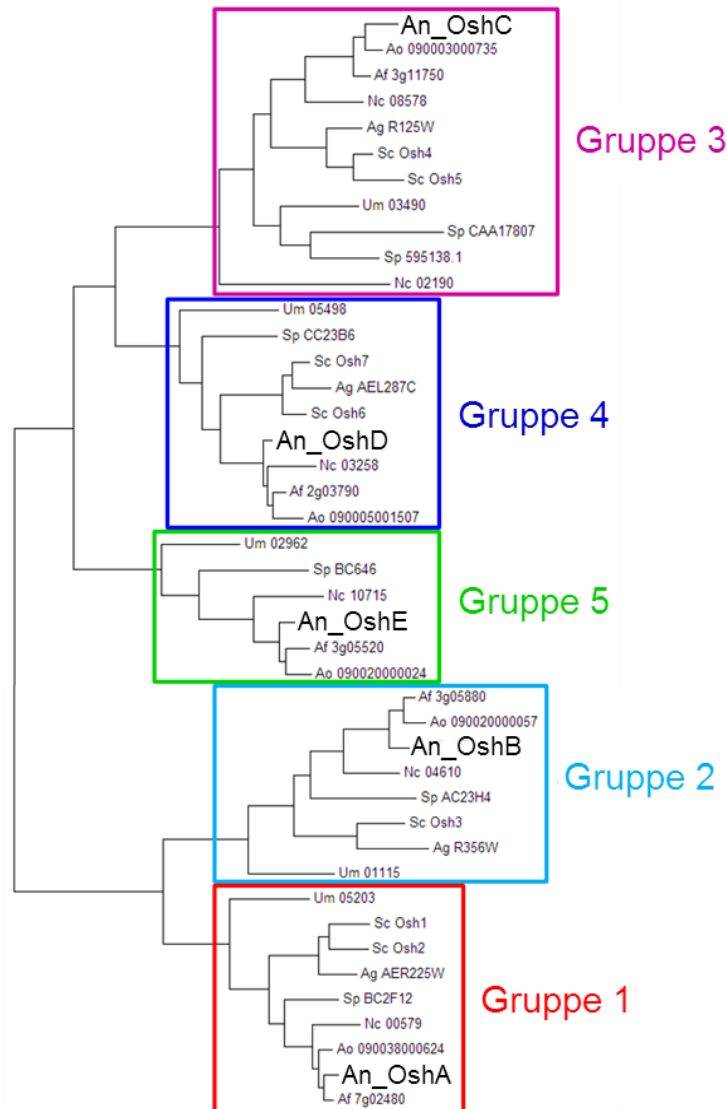


Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum homologer oxysterolbindender Proteine (Osh) in unterschiedlichen Pilzen. Die Klassifizierung der Osh-Proteine erfolgt in 5 Gruppen. Homologe Proteine wurden mittels NCBI BLASTp bestimmt. Die Erstellung des Stammbaumes erfolgte mit dem Programm Mega5.

Die *A. nidulans* OshA-E-Sequenzidentität und der e-Wert wurden mit denen von *S. cerevisiae* verglichen, da das *S. cerevisiae*-Genom sieben OSH Gene (*osh1-7*) beinhaltet und in vier Gruppen (Gruppe 1-4) (Tabelle 1) unterteilt wurde. So zeigte die Gruppe 1 mit den Osh1- und Osh2-Proteinen von *S. cerevisiae* in 251 bzw. 242 Aminosäuren eine Übereinstimmung von 41 % bzw. 59 % zu dem *A. nidulans* OshA-Protein. Der e-Wert von beiden Osh-Proteinen von *S. cerevisiae* zu dem OshA-Protein

in *A. nidulans* lag bei $3e^{-145}$ bzw. $1e^{-148}$. Das Protein Osh3 von *S. cerevisiae* in Gruppe 2 zeigte eine 49% Ähnlichkeit in 185 Aminosäuren mit einem e-Wert von $2e^{-100}$ zu dem *A. nidulans* OshB Protein. In der Gruppe 3 mit den *S. cerevisiae* Proteinen Osh4 und Osh5 wurde bei beiden Proteinen eine 48 %ige Übereinstimmung in 194 bzw. 193 Aminosäuren mit einem e-Wert von $7e^{-118}$ bzw. $5e^{-115}$ zu OshC in *A. nidulans* gefunden. Die *S. cerevisiae*-Proteine Osh6 und Osh7 - mit der Einteilung in Gruppe 4 - zeigte in 111 bzw. 115 Aminosäuren eine Identität von 51 % bzw. 50 % mit einem e-Wert von $1e^{-140}$ bzw. $2e^{-58}$ zu OshD in *A. nidulans*. Das OshE-Protein von *A. nidulans* wurde in dem Genom von *S. cerevisiae* und *Ashbya gossypii* nicht gefunden. Diese beiden Organismen besaßen lediglich 4 Gruppen (Tabelle 1), in denen ihre Gene eingeteilt wurden. Die anderen filamentösen Pilze und *S. pombe* besitzen 5-6 Gene (Tabelle 1) und wurden der Gruppe 5 zugeordnet (Abbildung 12). In Tabelle 1 erfolgte die Auflistung der verschiedenen Organismen mit der Zusammenfassung der Anzahl der *osh*-Gene und der Anzahl der Gruppen, zu denen die Gene gehören.

Tabelle 1: Anzahl der Osh-Gene und der Gruppen von *A. nidulans* im Vergleich mit verschiedenen Pilzen

Organismen	Anzahl der Gene	Gruppen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7	4
<i>Ashbya gossypii</i>	4	4
<i>Aspergillus nidulans</i>	5	5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	5
<i>Aspergillus oryzae</i>	5	5
<i>Ustilago maydis</i>	5	5
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	6	5

3.2 Unterschiedliche Lokalisierungsmuster von OshA-E

Als erster Hinweis für die Funktion der verschiedenen Osh-Proteine in *A. nidulans* sollte deren subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. Die fünf Oxysterol-Transporter OshA-E (*oxysterol-binding protein homologues* A-E) wurden durch Fusionierung mit dem fluoreszierenden GFP-Protein visualisiert. Als Ausgangsvektor wurde der Vektor pMCB17apx (Efimov *et al.*, 2006) verwendet. Für die Herstellung N-terminaler GFP-Fusionskonstrukte wurden inklusive Start-Codons von *oshA* und *oshB*, den beiden größeren Genen, jeweils 1 kb Fragment und von *oshC-oshE* jeweils 0,6 kb von genomischer DNA amplifiziert. Die Genfragmente von *oshA-E* wurden jeweils mit den entsprechenden Primern aus Tabelle 10 amplifiziert. An den Forward-Primern am 5'-Ende befanden sich jeweils eine *Ascl*-Schnittstelle und an den Reverse-Primern am 3'-Ende jeweils die *Pacl*-Schnittstelle, damit die amplifizierten Fragmente in die

entsprechende Klonierungsstelle des Ausgangsvektors pMCB17apx kloniert werden konnten. Die daraus resultierenden Plasmide pNB1 bis pNB6 wurden in Tabelle 11 aufgelistet. Diese Plasmide sind alle unter der Kontrolle des induzierbaren Alkohol-Dehydrogenase (*alcA*)-Promotors, welcher mit Glyzerin dereprimiert, mit Threonin induziert und mit Glukose reprimiert werden kann.

Zusätzlich zu der N-terminalen GFP-Fusionierung von *oshE* wurde für dieses Gen eine C-terminale GFP-Fusionierung durchgeführt. Dafür wurde das gesamte Fragment von *oshE* mit den Primern OshE-full-FW und OshE-full-Rev (inklusive Start-Codons, aber ohne Stop-Codon) amplifiziert, ebenso das GFP (inklusive Start- und Stop-Codon) mit den Primern GFP-FW und GFP-Rev. Der Reverse-Primer OshE-full-Rev mit einer *KpnI*-Schnittstelle am 5'-Ende und der GFP-FW-Primer mit einer *PacI*-Schnittstelle am 3'-Ende waren mit einer Linker-Sequenz ausgestattet, welche die *AscI*-Schnittstelle enthielt. Beide Fragmente wurden über eine Fusions-PCR mit den Primern OshE-FW und GFP-Rev fusioniert. Anschließend wurde dieses Fragment in den geschnittenen pMCB17apx-Vektor kloniert und es entstand das Plasmid pNB 7 (*alcA(p)-oshE-gfp*) (Tabelle 11).

Zur Herstellung von Plasmiden, bei denen die Gene *oshA*, *oshB* und *oshE* unter dem natürlichen Promotor exprimiert wurden, wurde der *alcA*-Promotor der Plasmide pNB1, pNB2 und pNB6 mit jeweils einem 1kb Promotor-Fragment des entsprechenden Gens ersetzt. Die Promotor-Region wurde für *oshA* mit dem Primer-Set OshA, für *oshB* mit dem Primer-Set OshB, sowie für *oshE* mit den Primern des Primer-Sets OshE aus Tabelle 10 amplifiziert. Die Forward-Primer besaßen am 5'-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle, wohingegen die Reverse-Primer die *KpnI*-Schnittstelle am 3'-Ende hatten. Zur Klonierung wurden PCR-Fragmente und die Plasmide pNB1, pNB2 und pNB6 mit *EcoRI* und *KpnI* verdaut und ligiert. Nach der Ligation entstanden die Plasmide pNB8-pNB10 (Tabelle 11).

Alle Plasmide wurden in den *A. nidulans* Stamm TN02A3 transformiert, welcher unter anderem eine Deletion im *nkuA*-Gen aufweist und dadurch eine homologe Integration der transformierten Plasmide mit dem Gen von Interesse ermöglicht wird (Nayak *et al.*, 2006). Nach der homologen Integration der Plasmide (pNB1-6) wurden die 0,6- und 1 kb-Fragmente hinter den natürlichen Promotoren eingebaut und waren so nicht mehr funktionell. Die vollständigen Gensequenzen der *oshA-E open reading frames* (ORF) im Genom wurden mit dem GFP fusioniert und standen unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors (Abbildung 13 A). Bei der homologen Integration des Plasmids pNB7 (*alcA(p)-oshE-gfp*) wurde die vollständige Gensequenz auf dem Plasmid hinter dem natürlichen Promotor eingebaut, so dass der eingebrachte ORF mit dem GFP unter dem Einfluss des natürlichen Promotors exprimiert wurde (Abbildung 13 B). Bei den Plasmiden pNB8-10 wurden die ursprünglichen ORFs von *oshA*, *oshB* und *oshE* unter die Kontrolle der natürlichen Promotoren gebracht und das GFP wurde mit den ursprünglichen ORFs fusioniert. Für die Lokalisierung der Osh-Fusionsproteine entstanden die Stämme SNB2-7, welche die Gene unter dem *alcA*-Promotor

exprimierten (Tabelle 5). Die Stämme SNB17, 18 und 20 exprimierten die *osh*-Gene A, B und E unter ihrem natürlichen Promotor.

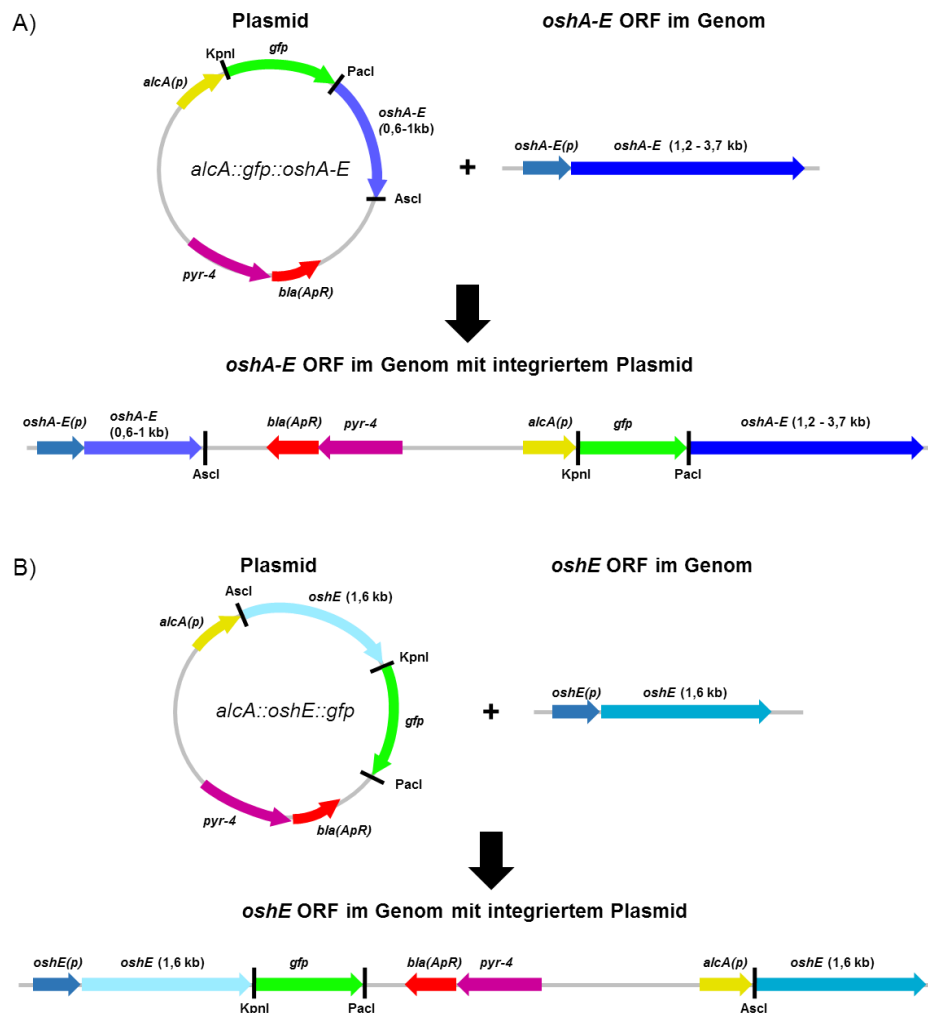


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Strategie zur Fusion der Osh-Proteine mit GFP. (A) Plasmidkarte mit Genen für *oshA-E* (lila; blau), N-terminalem *alcA*-Promotor (gelb), dem Gen für das Fluoreszenzprotein GFP (grün) und dem Selektionsmarker *pyr4* (pink). *Open reading frame* (ORF) der *oshA-E*-Gene im Genom und anschließender homologer Integration des Plasmids im Genom. (B) Plasmidkarte mit Genen für *oshE* (hellblau; türkis), N-terminalem *alcA*-Promotor (gelb), *gfp* (grün) sowie *pyr4* (pink). *OshE* ORF im Genom mit Darstellung der homologen Integration des Plasmids.

Die Lokalisierungen der Osh-Proteine wurden mikroskopisch untersucht, wofür die Sporen der GFP-Stämme auf Deckgläschen in Minimalmedium (MM) mit Glycerin sowie entsprechendem Auxotrophiemarkern inokuliert und über Nacht bei 28 °C inkubiert wurden. Bei der Zugabe von Glycerin ins Medium wird die Expression der Gene, die auf dem Plasmid hinter dem *alcA*-Promotor liegen, auf einem etwas höheren Niveau als unter dem natürlichen Promotor exprimiert.

Das Fluoreszenzsignal von GFP-OshA unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor wurde in mehreren Akkumulationen durch die gesamte Hyphe lokalisiert, mit Aussparung des apikalen Bereiches (Abbildung 14 A). Anhand des aufgenommenen Films von der

Hyphe aus Abbildung 14 A wurde ein Kymograph erstellt, der Bewegungen von Fluoreszenzsignalen aufzeigt (Abbildung 14 B). Kymographen allgemein zeigen von oben nach unten die Zeit während der Aufnahme des Films und von links nach rechts die Distanz der Signale. Bei einer eindeutigen Bewegung ist ein Zick-Zack-Muster des Signals erkennbar. Der Kymograph von den GFP-OshA Signalen zeigte fast gerade Linien, was auf keine messbare Bewegung hindeutet (Abbildung 14 B).

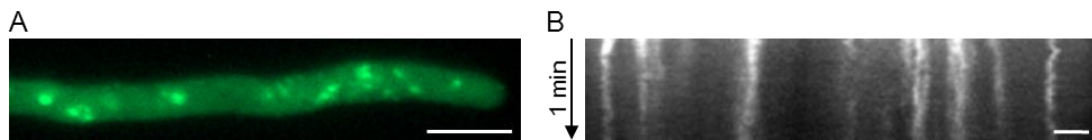


Abbildung 14: (A) Signale von GFP-OshA sind in mehreren Punkten durch die Hyphe verteilt (A). Maßstabbalken: 5 μm ; (B) GFP-OshA Signale zeigen keine Bewegung. Die GFP-OshA Signale wurden eine Minute lang aufgenommen und im Kymograph dargestellt. Maßstabbalken: 2 μm ; Die Inokulation der Sporen in glyzerinhaltigem Medium wurden mittels Zahnstocher auf Deckgläschen durchgeführt und für 16 h bei 28 °C inkubiert. Durch die Induktion des *alcA*-Promotors in Glycerinmedium wird die Expression von *gfp-oshA* induziert.

Zur Überprüfung der Proteinfunktionalität von OshA wurde der Stamm GFP-OshA wiederum unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor in drei verschiedenen Medien mikroskopiert, in denen der Promotor induziert beziehungsweise dereprimiert werden kann. In Glukosemedium wurden keine Fluoreszenzsignale von GFP-OshA detektiert, was durch die Unterdrückung des Promotors und somit auch des Gens erklärt wird (Abbildung 15, links). In glyzerinhaltigem Medium wurde der *alcA*-Promotor induziert, somit waren Signale von GFP-OshA sichtbar. Diese Signale erstreckten sich über die gesamte Hyphe, jedoch konnten auch hier keine Signale von GFP-OshA an der Hyphenspitze lokalisiert werden (Abbildung 15; Mitte). Threonin-haltiges Medium bewirkt eine Überexpression der Gene unter dem *alcA*-Promotor. In Abbildung 15 rechts konnten GFP-OshA-Signale durch die Hyphe bis kurz vor den apikalen Bereich der Hyphe lokalisiert werden. Dies deutet auf die Funktionalität der Gene von *gfp-oshA* unter dem *alcA*-Promotor und somit auf die Proteinfunktionalität hin.

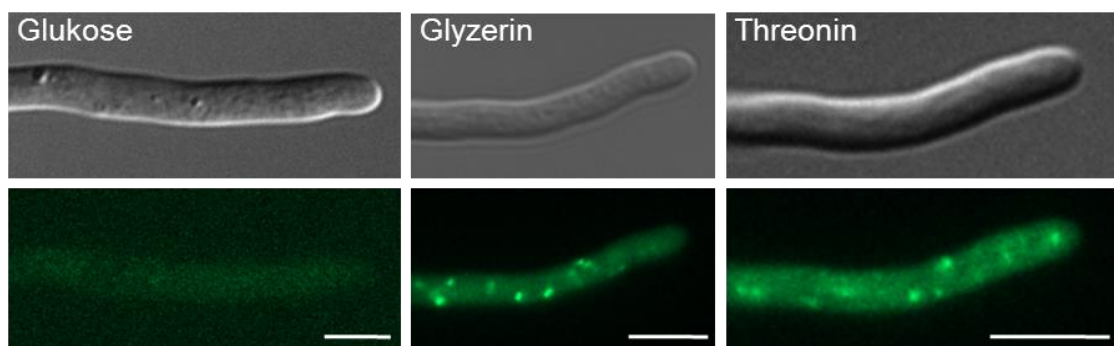


Abbildung 15: Lokalisation von GFP-OshA in Glukose-, Glycerin- und Threoninmedium. In Glukose ist durch die Repression des *alcA*-Promotors keine Expression von GFP-OshA sichtbar (links). In Glycerin werden der *alcA*-Promotor und die dahinterliegenden *gfp-oshA*-Genen dereprimiert (Mitte) und in Threonin überexprimiert (rechts). In Glycerin und Threonin sind die GFP-OshA-Signale in der gesamten Hyphe sichtbar, mit Ausnahme des apikalen

Bereichs. Maßstabbalken: 5 μm ; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal und im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*). Die Sporen wurden in den unterschiedlichen Medien auf Deckgläschen mit Zahnstochern inokuliert und für 16 h bei 28 °C inkubiert.

Die Lokalisierung des OshA-Proteins unter seinem natürlichen Promotor wurde zusätzlich untersucht, um die natürliche Lokalisierung der OshA Proteine herauszufinden. Die Signale der GFP-OshA-Proteine unter dem natürlichen Promotor wurde ebenso wie unter dem *alcA*-Promotor in der gesamten Hyphe lokalisiert (Abbildung 16 A). Zusätzlich wurde ein Kymograph angefertigt und auch hier waren keine erkennbaren Bewegungen von OshA sichtbar.

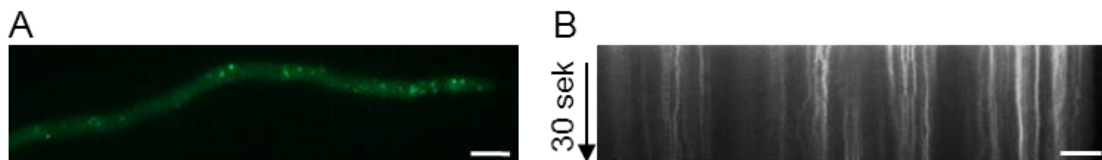


Abbildung 16: Unter der Expression seines eigenen Promotors sind die Signale von GFP-OshA in mehreren Punkten durch die Hyphe verteilt (A). Maßstabbalken: 5 μm ; (B) Im Kymograph kann keine Bewegung der GFP-OshA-Signale während der 30-sekündigen Filmaufnahme beobachtet werden. Maßstabbalken: 5 μm ; Die Sporen wurden auf Deckgläschen mittels Zahnstocher in MM angeimpft und für 16 h bei 28 °C inkubiert.

Für das Hefeprotein Osh1, welches im phylogenetischen Stammbaum in die gleiche Gruppe wie OshA eingeteilt wurde, konnte eine Co-Lokalisierung mit der *nucleus-vacuole junction* festgestellt werden (Kvam & Goldfarb, 2004; Levine & Munro, 2001). Osh1 interagiert spezifisch mit dem Kernmembranprotein Nvj1p und ist vermutlich als Substrat in die PMN (*piecemeal microautophagy of the nucleus*) involviert (Kvam & Goldfarb, 2004). Um eine möglich Co-Lokalisierung von GFP-OshA zusammen mit den Zellkernen und den Vakuolen zu untersuchen, wurden die auf Deckgläschen angezogenen Hyphen mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) und CellTracker™Blue CMAC inkubiert und mikroskopiert.

Die Signale von GFP-OshA, den Zellkernen und den Vakuolen waren in der gesamten Hyphe verteilt (Abbildung 17). Die GFP-OshA Signale wurden zum Teil in der Nähe der Zellkerne und den Vakuolen beobachtet (Abbildung 17), jedoch ohne Co-Lokalisierung (Abbildung 17 B). Somit hat OshA keine direkte Involvierung in die NVJ in *A. nidulans*.

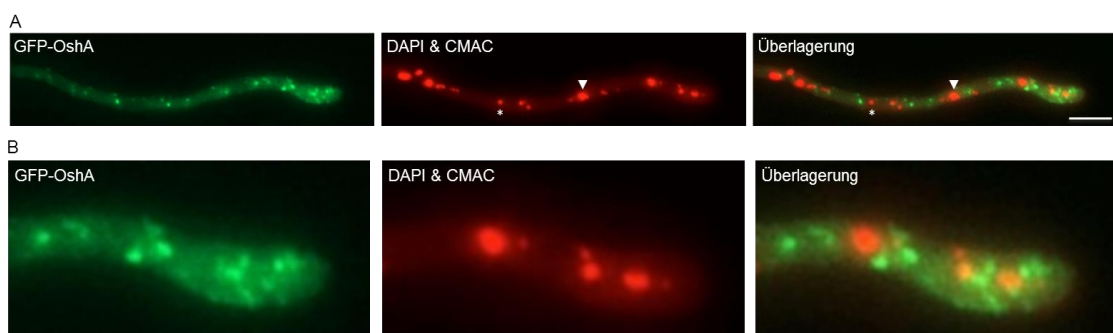


Abbildung 17: GFP-OshA Signale in der Hyphe haben keine Co-Lokalisierung mit dem Zellkern oder der Vakuole (A). Sternchen: Vakuole; Dreieck: Zellkern; Maßstabbalken: 5 µm; (B) Ausschnittsvergrößerung der Hyphenspitze. Keine Co-Lokalisierung mit dem Zellkern oder den Vakuolen. Maßstabbalken: 5 µm; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im DAPI-Kanal und im GFP-Kanal sowie Aufnahmen der Überlagerung beider Kanäle. Die Sporen wurden auf Deckgläschen mit einem Zahnstocher inokuliert und für 16 h bei 28 °C in Glycerinmedium inkubiert. Anschließend mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) und CellTracker™ Blue CMAC für fünf Minuten gefärbt und gleich mikroskopiert. *Gfp-oshA* wird durch den *alcA*-Promotor in Glycerinmedium exprimiert und die Expression somit dereprimiert.

Um mögliche Funktionen zusammen mit anderen Zellorganellen zu untersuchen, wurden anhand des Lokalisierungsmusters von OshA und den Erkenntnissen des Hefeproteins Osh1, welches eine Co-Lokalisierung mit dem Golgi-Apparat aufzeigte (Kvam & Goldfarb, 2004), eine Lokalisierung von OshA mit dem Golgi analysiert. Der Golgi in *A. nidulans* zeigt eine Verteilung durch die gesamte Hyphe (Pantazopoulou & Penalva, 2009; Pinar *et al.*, 2013). Zur Untersuchung dieser Co-Lokalisierung wurde der GFP-OshA-Stamm mit dem Stamm SSH35 (*alcA(p)::mrp1::tlgB*) gekreuzt. TlgB wurde in *A. nidulans* sowohl als Endosomen (Zekert & Fischer, 2009), als auch als *late*-Golgi (Pinar *et al.*, 2013) Marker beschrieben. In *S. cerevisiae* lokalisierte das homologe Proteine Tlg2 am *trans*-Golgi und an Endosomen (Gurunathan *et al.*, 2002; Holthuis *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde TlgB als Marker für die *late*-Golgi Zisternen verwendet.

Die GFP-OshA und mRFP1-TlgB Signale waren in der gesamten Hyphe zu sehen, mit der Ausnahme der Signale von GFP-OshA im apikalen Bereich (Abbildung 18). Eine Co-Lokalisierung von GFP-OshA mit mRFP-TlgB konnte im subapikalen Bereich der Hyphe beobachtet werden (Abbildung 18). Dies deutet auf eine Rolle von GFP-OshA im Zusammenhang mit dem *late*-Golgi im subapikalen Bereich hin.

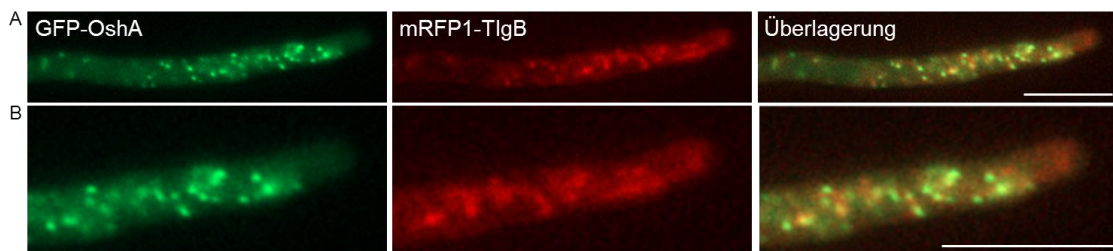


Abbildung 18: GFP-OshA Signale in der Hyphe haben eine Co-Lokalisierung mit dem Golgi im subapikalen Bereich (A). (B) Vergrößerungen der Hyphe aus (A). Co-Lokalisierung von GFP-OshA mit mRFP1-TlgB anhand der gelben Färbung sichtbar (Überlagerung). Maßstabbalken: 5 µm; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im mRFP-Kanal und im GFP-Kanal sowie Bilder der Überlagerung beider Kanäle. Die Gene von *gfp-oshA* und *mrp-tlgB* werden unter dem *alcA*-Promotor in Glycerinmedium dereprimiert. Die Sporen wurden bei 28 °C für 16 h in Glycerinmedium mittels Zahnstocher inkubiert.

Die Lokalisation von GFP-OshB unter dem *alcA*-Promotor zeigte mehrere Punkte in der Nähe der Hyphenspitze, jedoch nicht im apikalen Bereich (Abbildung 19 A). Anhand der Aufnahme wurde eine Lokalisierung der Signale eher in der Nähe der PM

als in der Hyphenmitte beobachtet. Um eine Bewegung der Signale von GFP-OshB zu analysieren, wurde die Filmaufnahme von Abbildung 19 A anhand eines Kymographen ausgewertet. Der Kymograph zeigte während der zweiminütigen Filmdauer Linien der GFP-OshB Signale (Abbildung 19 B), was auf keine aktive Bewegung von GFP-OshB hindeutet.

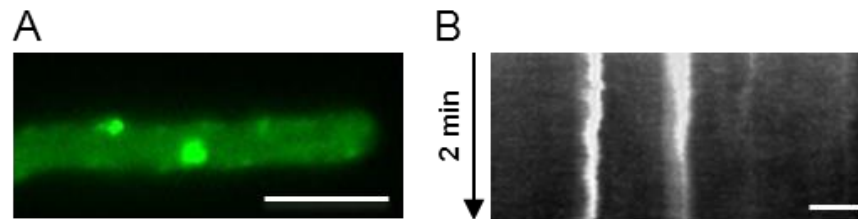


Abbildung 19: Signale von GFP-OshB sind in mehreren Punkten im subapikalen Bereich der Hyphe lokalisiert (A). Maßstabbalken: 5 μ m; (B) Im Kymograph kann keine Bewegung der GFP-OshB Signale der zweiminütigen Filmaufnahme beobachtet werden. Maßstabbalken: 5 μ m; Die Sporen wurden mittels Zahnstocher auf Deckgläschen in Glycerinmedium angeimpft und 16 h bei 28 °C inkubiert. Die *gfp-oshB*-Gene wurden durch den *alcA*-Promotor im Glycerinmedium dereprimiert.

GFP-OshB wurde unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor exprimiert. Zur Überprüfung der Proteinfunktionalität von GFP-OshB wurde der Stamm in den drei Medien analysiert, in denen der Promotor und seine dahinter liegenden Gene reprimiert, dereprimiert oder überexprimiert werden kann. Die Fluoreszenzsignale von GFP-OshB wurden in Glukosemedium, wie erwartet, nicht beobachtet (Abbildung 20, links). Mehrere Signale wurden hingegen im subapikalen Bereich und in der Nähe der PM der Hyphe im Glycerinmedium lokalisiert, jedoch wurde keine Lokalisierung durch die gesamte Hyphe und im apikalen Hyphenbereich beobachtet (Abbildung 20, Mitte). Eine Überexpression von GFP-OshB in Threoninmedium zeigte deutlich mehr Fluoreszenzsignale, welche in der gesamten und im apikalen Bereich der Hyphe ermittelt wurden (Abbildung 20, rechts). Die Signale zeigten sich sowohl in der Nähe der PM als auch mittig in der Hyphe.

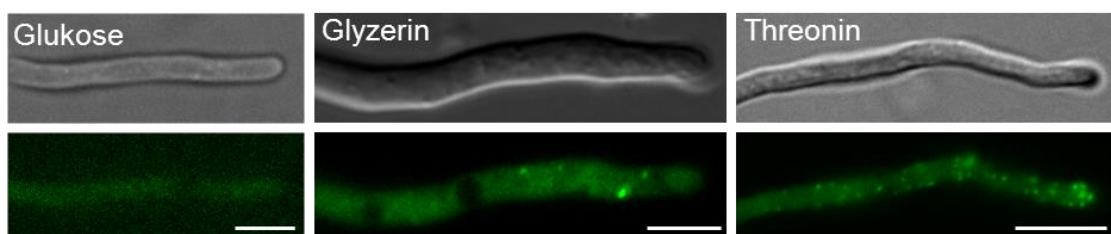


Abbildung 20: Lokalisation von GFP-OshB in Glukose-, Glycerin- und Threoninmedium. In Glukose ist durch die Repression des *alcA*-Promotors keine Expression von GFP-OshB sichtbar (links). In Glycerin wird der *alcA*-Promotor mit seinen *downstream* gelegenen *gfp-oshB*-Genen dereprimiert (Mitte) und in Threonin überexprimiert (rechts). In Glycerinmedium sind einzelne GFP-OshB Signale in der Hyphe sichtbar. In Threoninmedium sind mehr GFP-OshB Signale in der gesamten Hyphe und dem apikalen Bereich lokalisiert. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal und im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*). Maßstabbalken:

5 μm ; Die Sporen wurden für 16 h bei 28 °C, nach dem Animpfen auf Deckgläschen in den verschiedenen Medien, inkubiert.

Die Expression von GFP-OshB unter seinem natürlichen Promotor zeigte eine Lokalisierung von mehreren Punkten im subapikalen Bereich in der Nähe der Hyphe, jedoch nicht im apikalen Bereich bzw. in der gesamten Hyphe (Abbildung 21, links). Die Expression unter dem natürlichen Promotor war zudem schwächer als unter dem *alcA*-Promotor. Die Kymographauswertung während der 30-sekündigen Filmaufnahme zeigte keine aktive Bewegung von GFP-OshB.

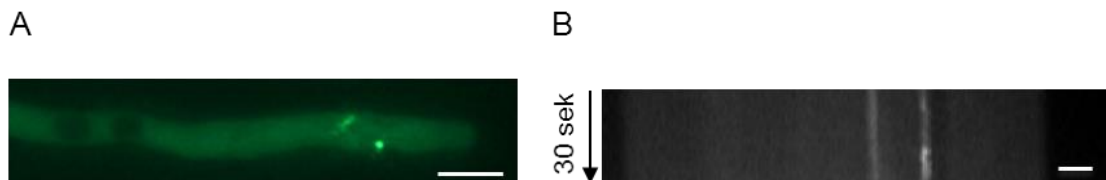


Abbildung 21: Signale von GFP-OshB sind im subapikalen Bereich der Hyphe nach Expression mittels des eigenen Promotors lokalisiert (A). Maßstabbalken: 5 μm (B) Im Kymograph kann keine Bewegung der GFP-OshB Signale während der 30-sekündigen Filmaufnahme beobachtet werden. Maßstabbalken: 5 μm ; Die Sporen wurden mittels Zahnstocher auf Deckgläschen in glyzerinhaltigem MM angeimpft und für 16 h bei 28 °C inkubiert.

Die GFP-OshB-Signale zeigten wiederholt eine Lokalisation in der Nähe der PM. Das Osh3-Protein in *S. cerevisiae*, welches in der phylogenetischen Stammbaumanalyse wie OshB zur Gruppe 2 eingeteilt wurde, zeigte eine Lokalisation an der ER-PM MCS (*membrane contact site*) (Schulz *et al.*, 2009; Stefan *et al.*, 2011). Zur Analysierung dieser Lokalisation von OshB wurde die zu mikroskopierenden Hyphen mit Calcofluor White (CFW) angefärbt. CFW bindet an Chitin in der Pilzmembran (Maeda & Ishida, 1967), wodurch diese unter UV-Licht sichtbar wird.

In Abbildung 22 links wiesen die Signale von GFP-OshB erneut eine Lokalisierung in der Nähe der PM auf. Dies konnte durch die Färbung der Zellmembran mit CFW bestätigt werden (Abbildung 22, rechts).

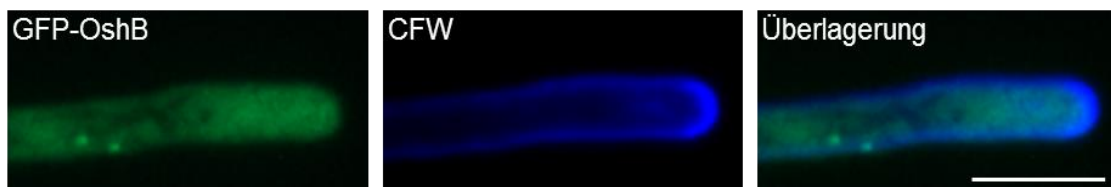


Abbildung 22: GFP-OshB Signale im subapikalen Bereich und in der Nähe der PM lokalisiert (links). Färbung der Zellmembran mit CFW (Mitte). Überlagerung des linken und mittleren Bildes weist eine Lokalisierung von GFP-OshB an der PM auf. Maßstabbalken: 5 μm ; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal und im DAPI-Kanal sowie eine Überlagerung der Bilder aus beiden Kanälen. Die Sporen wurden 16 h bei 28 °C inkubiert und mittels Zahnstocher in Glycerinmedium angeimpft. Glycerin dereprimiert den *alcA*-Promotor und somit auch die Gene *gfp-oshB*. Die Hyphen wurden mit Calcofluor White (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) für 5 min angefärbt.

Die Lokalisierung von GFP-OshC unter dem *alcA*-Promotor zeigte in Glycerinmedium diffuse Signale im Zytoplasma (Abbildung 23, Mitte). Zur Überprüfung der Gen- bzw. der Proteinfunktionalität wurden die Hyphen zusätzlich noch mit Glukose- und Threoninmedium mikroskopiert. Bei der Verwendung des Glukosemediums und somit einer Repression der Gene unter dem *alcA*-Promotor wurde kein GFP-OshC Signal im Zytoplasma, wie in Glycerin-haltigem Medium, beobachtet (Abbildung 23, links). Eine Überexpression der Gene in Threoninmedium zeigte ein etwas stärkeres Signal von GFP-OshC im Zytoplasma der Hyphe (Abbildung 23, rechts) als in Glycerinmedium. Dies deutet auf eine Gen- bzw. die Proteinfunktionalität von GFP-OshC unter dem *alcA*-Promotor hin.

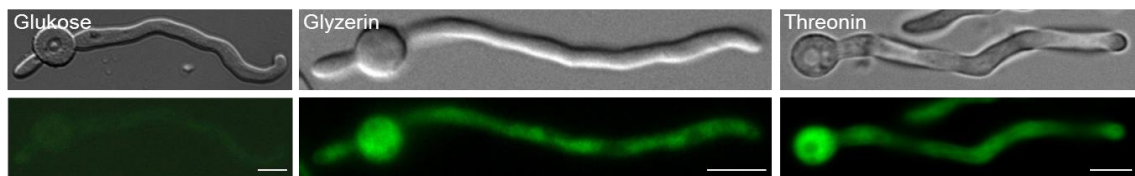


Abbildung 23: Lokalisierung von GFP-OshC in Glukose-, Glycerin- und Threoninmedien. In Glukosemedium kann durch die Repression des *alcA*-Promotors keine GFP-OshC Fluoreszenz festgestellt werden (links). In den Medien Glycerin (Derepression des *alcA*-Promotors; Mitte) und Threonin (Überexpression des *alcA*-Promotors; rechts) werden diffuse Signale im Zytoplasma beobachtet. Maßstabbalken: 5 μm ; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal und im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*). Die Sporen wurden mittels Zahnstocher auf Deckgläschen in den unterschiedlichen Medien angeimpft und bei 28 $^{\circ}\text{C}$ für 16 h inkubiert.

In einigen Hyphen konnte zusätzlich eine Lokalisierung eines schwachen GFP-OshC Signals an der Hyphenspitze im apikalen Bereich beobachtet werden (Abbildung 24 A). Der Kymograph zeigte von der einminütigen Filmaufnahme von Abbildung 24 A eine Linie von GFP-OshC, was auf keine aktive Bewegung hinwies.

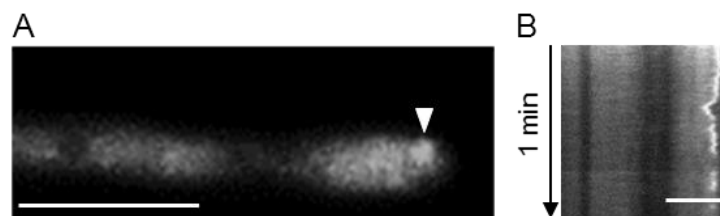


Abbildung 24: Hyphe zeigt schwache Fluoreszenz von GFP-OshC an der Hyphenspitze (A). Maßstabbalken: 5 μm ; (B) Kymograph zeigt Immobilität des GFP-OshC Signals während einer Dauer von einer Minute. Maßstabbalken: 2 μm ; Expression von *gfp-oshC* erfolgte durch Dereprimierung des *alcA*-Promotors. Die Sporen wurden mittels Zahnstocher in glyzerinhaltigem MM angeimpft und 16 h bei 28 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Zur Überprüfung der Funktionalität von GFP-OshD wurden die Hyphen sowohl im Glukose- als auch in Glycerin- und Threoninmedium mikroskopiert. In Glukosemedium war kein GFP-Signal sichtbar. (Abbildung 25, links). In Glycerinmedium konnten diffuse Signale von GFP-OshD im Zytoplasma lokalisiert werden (Abbildung 25, Mitte) und in

Threoninmedium wurde ein stärkeres Signal im Zytoplasma beobachtet (Abbildung 25, rechts). Dies wies ebenso auf die Proteinfunktionalität von GFP-OshD hin.

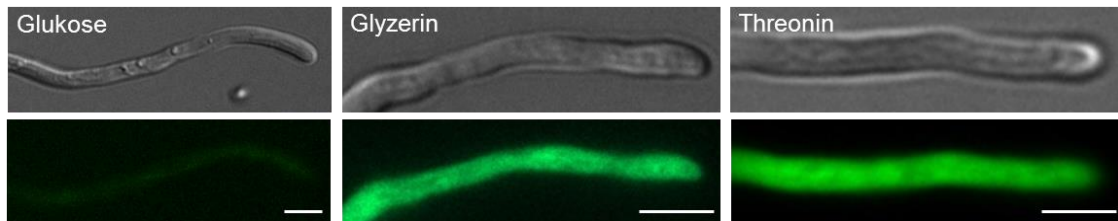


Abbildung 25: Lokalisierung von GFP-OshD in Glukose-, Glycerin- und Threoninmedien. Keine GFP-OshD Signale in Glukosemedium (Repression des *alcA*-Promotors; links). Diffuse Signale von GFP-OshD im Zytoplasma in den Medien Glycerin (Derepression des *alcA*-Promotors; Mitte) und Threonin (Überexpression des *alcA*-Promotors; rechts). Maßstabbalken: 5 μm ; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*) und im GFP-Kanal. In den unterschiedlichen Medien wurden die Sporen auf Deckgläschen mittels Zahnstocher angeimpft und bei 28 °C für 16 h inkubiert.

GFP-OshE unter dem *alcA*-Promotor wies in Glycerinmedium mehrere Punkte im subapikalen Bereich der Hyphe auf (Abbildung 26 A), welche in der Nähe der PM lokalisiert waren. Der von der Filmaufnahme gefertigte Kymograph zeigte während der einminütigen Aufnahme Linien der GFP-OshE Signale (Abbildung 26 B), was auf keine aktive Bewegung hinwies.

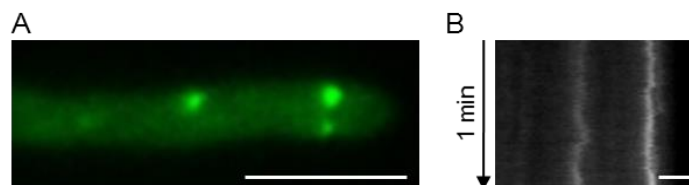


Abbildung 26: Mehrere Punkte des Fluoreszenz-Signals von GFP-OshE im subapikalen Bereich der Hyphe (A). Maßstabbalken: 5 μm ; (B) Kymograph zeigt keine aktive Bewegung der GFP-OshE Signale während der einminütigen Filmaufnahme. Maßstabbalken: 2 μm ; Die Sporen wurden auf Deckgläschen in glyzerinhaltigem Medium mittels Zahnstocher angeimpft und für 16 h bei 28 °C inkubiert. Die Expression von *gfp-oshE* erfolgte durch den *alcA*-Promotor in Glycerinmedium.

Die Funktionalität von GFP-OshE unter dem *alcA*-Promotor wurde in Glukose-, Glycerin- und Threoninmedium untersucht. In Glukose konnte aufgrund der reprimierenden Wirkung auf den Promotor kein Signal beobachtet werden (Abbildung 27, links). Bei der Derepression des Promotors in Glycerinmedium konnte GFP-OshE durch die gesamte Hyphe ermittelt werden (Abbildung 27, Mitte), wobei sich die Lokalisierung dabei auf den subapikalen Bereich der Hyphe beschränkt. Einige GFP-OshE Signale lokalisierten um runde Strukturen (Abbildung 27, Mitte, Pfeile), was auf eine Lokalisierung an das ER um den Zellkern hinweisen könnte. Andere GFP-Signale waren eher am Rand der Hyphenmembran zu entdecken. Die Überexpression von GFP-OshE, welche durch das Threoninmedium erreicht wurde, wies mehrere Signale in der Hyphe auf (Abbildung 27, rechts). Diese waren in der Nähe der PM lokalisiert.

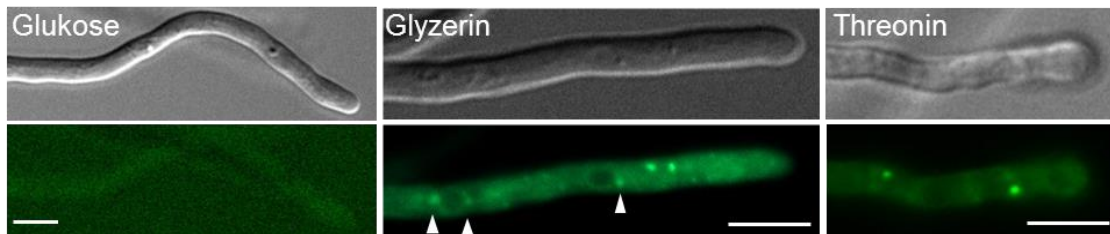


Abbildung 27: Lokalisierung von GFP-OshE in Glukose-, Glycerin- und Threoninmedien. Kein GFP-OshD Signal in Glukosemedium (Repression des *alcA*-Promotors; links). Im Medium Glycerin (Derepression des *alcA*-Promotors) werden mehrere Signale von GFP-OshE in der Hyphe lokalisiert (Mitte). Einige GFP-OshE Signale sind um runde Strukturen (Pfeile) lokalisiert. In Threonin (Überexpression des *alcA*-Promotors) werden mehrere GFP-OshE Signale in der Hyphe beobachtet (rechts). Maßstabbalken: 5 μm ; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal und im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*). Die Sporen wurden mittels Zahnstocher in den unterschiedlichen Medien auf Deckgläschen angeimpft und bei 28 $^{\circ}\text{C}$ für 16 h inkubiert.

Die Expression von GFP-OshE unter seinem natürlichen Promotor zeigten eine Lokalisierung in der Nähe der PM und in der gesamten Hyphe, mit Ausnahme im apikalen Bereich (Abbildung 28 A). Die 30-sekündige Filmaufnahme zeigte im Kymographen Linien der GFP-OshE Signale (Abbildung 28 B), was auf keine sichtbare bzw. aktive Bewegung hinwies.

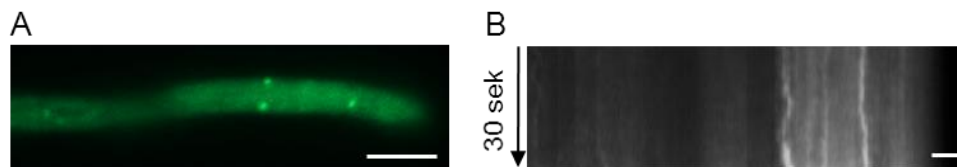


Abbildung 28: GFP-OshE Signale sind im subapikalen Bereich der Hyphe nach der Expression mittels des eigenen Promotors lokalisiert (A). Maßstabbalken: 5 μm ; (B) Die Signale von OshE zeigen im Kymograph keine sichtbare Bewegung innerhalb von 30 sec. Maßstabbalken: 5 μm ; Die Sporen wurden mittels Zahnstocher in MM auf Deckgläschen angeimpft und für 16 h bei 28 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Aufgrund der Lokalisierung mancher Signale in der Nähe der PM wurden die Hyphen des GFP-OshE Stammes mit CFW angefärbt und mikroskopiert. Die Signale von GFP-OshE wiesen erneut eine Lokalisierung im subapikalen Bereich auf und einige Signale waren in der Nähe der PM zu beobachten (Abbildung 29, links). Die Färbung der Zellmembran (Abbildung 29, Mitte) zeigte einige Punkte in der Nähe der Zellmembran (Abbildung 29, rechts).



Abbildung 29: GFP-OshE Signale teilweise in der Nähe der Zellmembran lokalisiert. Mehrere Signale von GFP-OshE lokalisieren im subapikalen Bereich. Maßstabbalken: 5 μm ; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal und DAPI-Kanal sowie die Überlagerungen der Aufnahmen. Die Sporen wurden 16 h bei 28 °C in Glycerinmedium inkubiert. Glycerinmedium bewirkt ein Dereprimieren des *alcA*-Promotors sowie der dahinter fusionierten Gene *gfp* und *oshE*. Die Hyphen wurden für fünf Minuten mit CFW (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gefärbt.

Zusätzlich zu der N-terminalen GFP-Fusionierung mit OshE wurde eine C-terminale GFP-Fusionierung gefertigt. Die Expression der Gene erfolgte unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor. In der gesamten Hyphe wurden Signale von OshE-GFP lokalisiert (Abbildung 30 A). Einige Signale wurden in der Nähe der PM gesichtet und andere Signale lokalisierten an runden Strukturen, was auf das ER um den Zellkern hinweisen könnte. Während der 30-sekündigen Filmaufnahme zeigten sich im Kymographen gerade Linien (Abbildung 30), was auf keine aktive Bewegung hinweist.

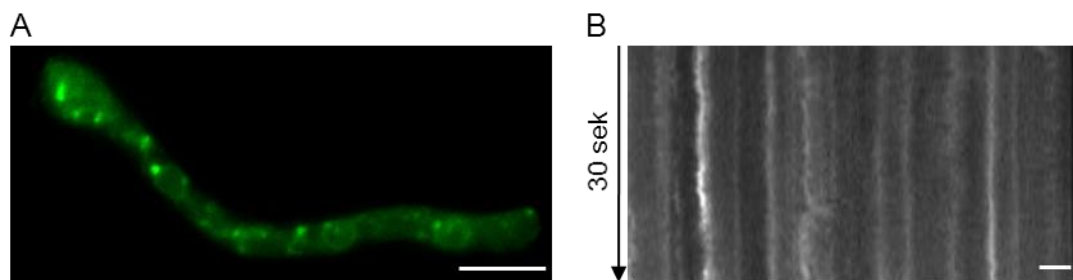


Abbildung 30: Lokalisation von mehreren Punkten des Fluoreszenzsignals von OshE-GFP in der gesamten Hyphe (A). Manche Signale lokalisieren an runden Strukturen. Maßstabbalken: 5 μm ; (B) Der Kymograph zeigt keine aktive Bewegung der OshE-GFP-Signale während der 30-sekündigen Filmaufnahme. Maßstabbalken: 2 μm Die Sporen wurden 16 h bei 28 °C in Glycerinmedium inkubiert und mittels Zahnstocher auf Deckgläschen angeimpft. Der induzierbare *alcA*-Promotor sowie die dahinter fusionierten Gene *oshE* und *gfp* werden in Glycerinmedium dereprimiert.

Um die Hypothese der Lokalisierung von OshE-GFP an das ER, welches den Zellkern umgibt, zu analysieren, wurde das Färbemittel ER-Tracker Red™ verwendet (Abbildung 31). Dieses Färbemittel wird für die dauerhafte Zellfärbung eingesetzt und ist hoch selektiv für das ER. Es besteht aus Glibenclamid BODIPY®TR (<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/E34250>). Glibenclamide werden in der Behandlung von Typ-2 Diabetes eingesetzt (Hambrock *et al.*, 2002) und gehören zu der Gruppe der Sulfonylharnstoffe, welche an den Sulphonylharnstoffrezeptor des ATP-sensitiven K^+ -Kanals binden (Hambrock *et al.*, 2002). Die über Nacht gewachsenen Hyphen wurden mit ER-Tracker für 5 min bei 37 °C inkubiert, und anschließend mit dH_2O gewaschen und mikroskopiert.

Die Fluoreszenzsignale von OshE-GFP (Pfeile) zeigten eine Co-Lokalisation mit dem ER (Abbildung 31, Sternchen). Die Lokalisierung von OshE-GFP konnte am Rand von der ER-Struktur beobachtet werden und nicht innerhalb des ERs. Co-Lokalisierungspunkte von OshE-GFP wurden mit Sternchen markiert.

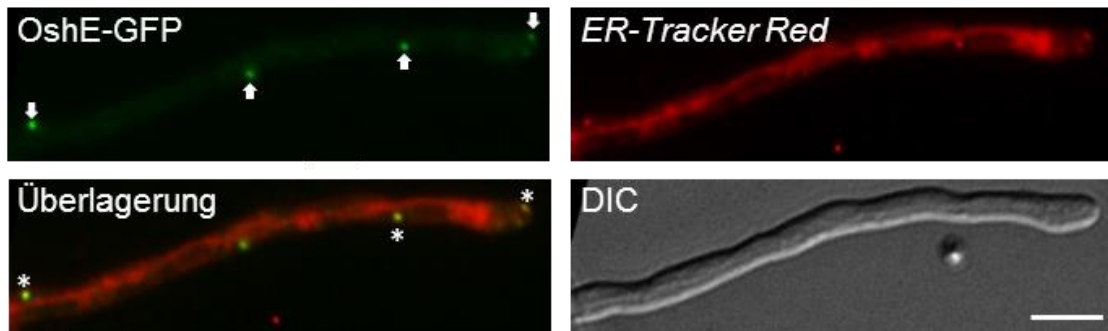


Abbildung 31: Nachweise für eine Co-Lokalisierung von OshE-GFP mit dem ER anhand des *ER-Tracker Red* (Invitrogen). Das Fluoreszenzsignal von OshE-GFP (oben links; Pfeile) ist durch die Hyphe lokalisiert. *ER-Tracker Red* zeigt das angefärbte ER. Co-Lokalisierung von mehreren OshE-GFP-Signalen mit dem ER (Überlagerung; Sternchen). Maßstabbalken: 5 µm; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal, mRFP-Kanal und im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*) sowie die Überlagerungen der Aufnahmen der verschiedenen Kanäle. Mit einem Zahnstocher wurden die Sporen auf einem Deckgläschen mit glyzerinhaltigem MM angeimpft und für 16 h bei 28 °C inkubiert. Die Expression von *oshE-gfp* unter dem *alcA*-Promotor in Glycerinmedium bewirkt ein Dereprimieren des *alcA*-Promotors und seinen nachgeschalteten Genen. Die Hyphen wurden für 20 min bei 37 °C mit ER-Tracker (1 mM) inkubiert.

Die Färbung des ERs mit dem *ER-Tracker Red* war in den Hyphen nicht sehr vorteilhaft, da der Temperaturwechsel die Hyphen stresste und die Färbung die Vitalität beeinflusste. Somit wurden zur Darstellung und Untersuchung einer Co-Lokalisation des ERs mit den beiden Osh-Proteinen B und E ein Plasmid mit der Sequenz des *sec63*-Gens hergestellt. Das Sec63-Protein ist ein Integralmembranprotein und weist eine Translocon-Komponente auf, welche an die ER-Membrandomäne lokalisiert (Markina-Inarrairaegui *et al.*, 2013). Zuerst wurde die *sec63*-Gensequenz mit den Primern Sec63-LB-FW (inklusive Start-Codon) und Sec63-LB-Rev (ohne Stopp-Codon) amplifiziert, wobei der Reverse Primer eine Linker-Sequenz enthielt, amplifiziert (Primer Tabelle 10). Zur C-terminalen Fusionierung des *sec63*-Gens mit dem Fluoreszenzgen *mcherry* und dem Markergen *pyrG* wurde das Plasmid pRM83 (Raphael Mank, IAB, unveröffentlicht) über einen Verdau linearisiert und mit den Primern GFP-GA-Linker FW und *pyrG*-cas-R amplifiziert. Zusätzlich wurde ein Stück der 3'-UTR des *sec63*-Gens zur Verwendung als RB über die Primer Sec63-RB-FW und Sec63-RB-Rev amplifiziert. Der Primer Sec63-RB-FW wies eine Linker-Sequenz auf, welche zu dem Linker des Primers *pyrG*-cas-R komplementär war. Über eine Fusions-PCR wurden die *sec63* LB, die mCherry-*pyrG*-Kassette und die 3'-UTR des *sec63*-Gens zusammen fusioniert. Dies wurde mit den Primern Sec63-nLB-FW2 und Sec63-nRB-Rev2 gemacht. Das fertige Fusions-PCR-Produkt wurde in den verdauten Vektor pJet1.2 (<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K1231>) ligiert. Es entstand das Plasmid pHH2 (H. Haag, Bachelor Arbeit), welches in den Stamm TN02A3 transformiert und der Stamm SHH2 generiert wurde (H. Haag, Bachelor Arbeit). Sporen von SHH2 wurden für das Mikroskopieren angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert.

Die Lokalisation von Sec63 und somit die Struktur des ERs wurde von der Arbeitsgruppe Peñalva (Markina-Inarrairaegui *et al.*, 2013) beschrieben. Im Wildtyp TN02A3 wurde das Netzwerk des ERs mit seinen peripheren plasmamembran-verbundenen Strängen (Pfeile) und dem *nuclear-envelope*-verbundenen Strängen (Sternchen) lokalisiert (Abbildung 32). Im apikalen Bereich der Hyphe konnte kein ER lokalisiert werden (Dreieck).

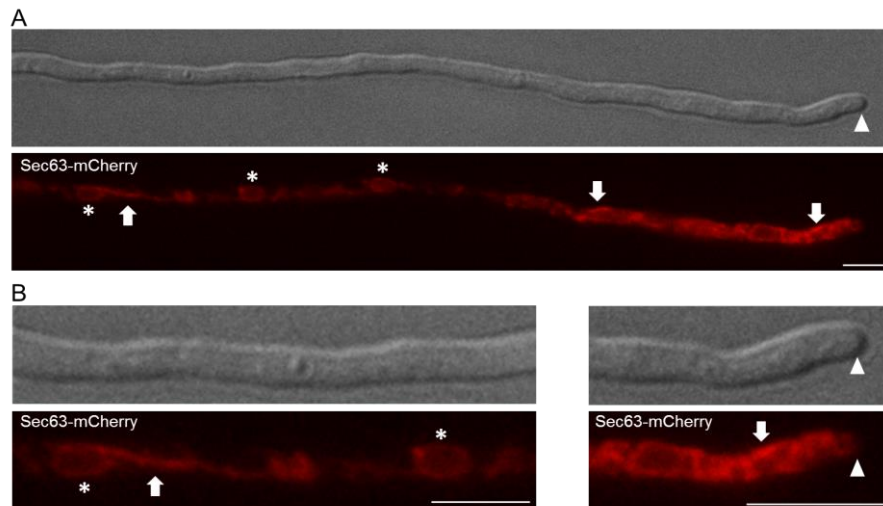


Abbildung 32: Nachweise von peripheren und *nuclear-envelope*-verbundenen ER-Strängen via Sec63-mCherry im Wildtyp TN02A3. (A) Das ER durchzieht die gesamte Hyphe mit Ausnahme des apikalen Bereichs. (B) Ausschnittsvergrößerungen von Aufnahme (A). Pfeile markieren periphere Plasmamembran-verbundene Stränge des ERs. Sternchen zeigen die *nuclear-envelope*-verbundenen ER-Stränge. Das Dreieck weist auf die Hyphenspitze ohne ER Lokalisierung hin. Maßstabbalken: 5 µm; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*) und im mRFP-Kanal. Die Sporen wurden auf einem Deckgläschen in Glycerinmedium mit einem Zahnstocher angeimpft und bei 28 °C 16 h inkubiert. Das *sec63*- und *mrfp*-Gen wird unter dem *alcA*-Promotor exprimiert, was in Glycerinmedium eine Dereprimierung der dahinter fusionierten Gene zur Folge hat.

Die Stämme SNB3 (GFP-OshB) und SNB6 wurden jeweils mit dem Stamm SHH2 gekreuzt. Die Stämme wurden mikroskopisch auf die Lokalisation von GFP-OshB bzw. GFP-OshE zusammen mit Sec63-mCherry hin untersucht.

Die GFP-OshB Signale waren im subapikalen Bereich der Hyphe sichtbar (Abbildung 33 oben links, Pfeile). Das ER zeigte anhand des fusionierten Proteins Sec63-mCherry periphere plasmamembran-verbundene Stränge (oben rechts). In der Abbildung 33 (Überlagerung) konnte gezeigt werden, dass die Signale von GFP-OshB die ER Stränge berühren und eine Lokalisation am Rande der ER-tubulären Strukturen vorhanden war (Pfeile). Anhand dieser Lokalisierungsmuster könnte OshB eine Rolle an der Plasmamembran-ER Kontaktseite spielen.

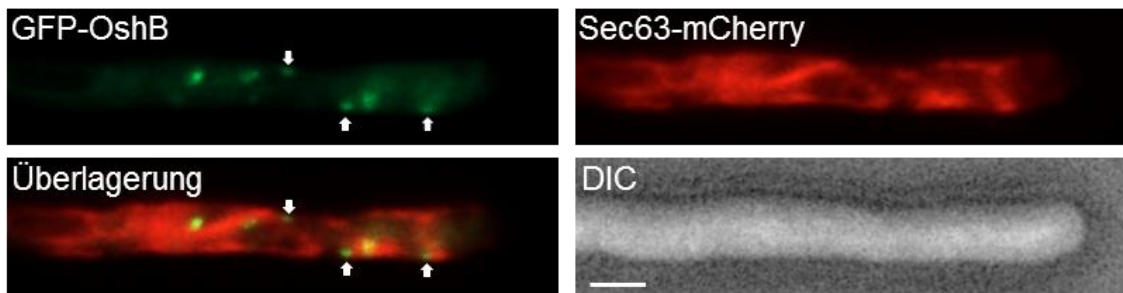


Abbildung 33: Lokalisation von GFP-OshB am Rande der ER-Struktur (Überlagerung; Pfeile). Zur Untersuchung einer Co-Lokalisierung von OshE mit dem ER wurde mCherry-Sec63 als ER-Marker verwendet. Mehrere Punkte des Fluoreszenzsignals von GFP-OshB (Pfeile im oberen Bild links) sind im subapikalen Bereich der Hyphe lokalisiert. Das Sec63-mCherry-Signal zeigt das periphere ER (oben rechts). Maßstabbalken: 5 µm; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal, im mRFP-Kanal, im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*) und die Aufnahmen beider Kanäle als Überlagerung. Die Sporen wurden nach dem Animpfen mit einem Zahnstocher auf einem Deckgläschen in Glycerinmedium für 16 h bei 28 °C inkubiert. Durch den induzierbaren *alcA*-Promotor werden die dahinter fusionierten Gene *gfp-oshB* und *sec63-mcherry* in glyzerinhaltigem Medium dereprimiert.

In der Hyphe waren die Fluoreszenzsignale von GFP-OshE verteilt (Abbildung 34, oben rechts; Pfeile). Auch hier zeigte die Lokalisierung von Sec63-mCherry die Stränge des peripheren ERs (Abbildung 34, oben rechts). Bei der Überlagerung der beiden Abbildungen konnte eine Lokalisierung von GFP-OshE an den peripheren ER-Strängen festgestellt werden. Somit könnte OshE, wie auch OshB, eine Rolle an der Plasmamembran-ER Kontaktseite spielen.

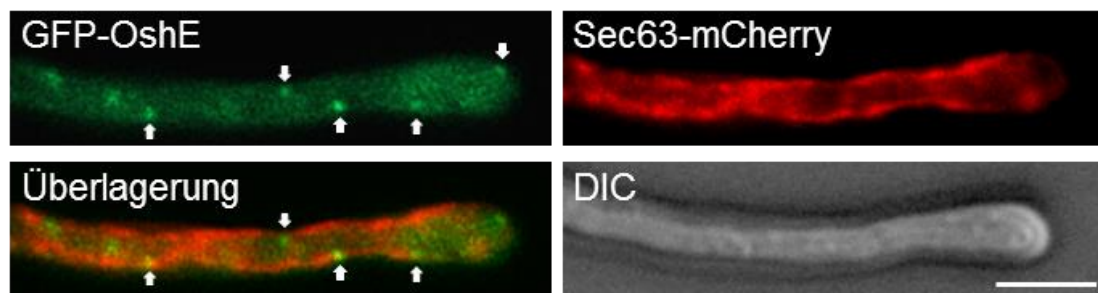


Abbildung 34: Lokalisation von GFP-OshE an peripheren ER-Strängen (Überlagerung, Pfeile). Für die Untersuchung einer Co-Lokalisierung von OshE mit dem ER wurde mCherry-Sec63 als ER-Marker verwendet. Im subapikalen Bereich der Hyphe sind mehrere Punkte des Fluoreszenzsignals von GFP-OshE lokalisiert. Das Sec63-mCherry-Signal zeigt das periphere ER. Maßstabbalken: 5 µm; Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im GFP-Kanal, im mRFP-Kanal, im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*) und die Aufnahmen beider Kanäle als Überlagerung. Die Sporen wurden mit einem Zahnstocher auf einem Deckgläschen in glyzerinhaltigem MM angeimpft und 16 h bei 28 °C inkubiert. Die *gfp-oshE*- sowie *sec63-mcherry*-Gene werden durch den *alcA*-Promotor in Glycerinmedium dereprimiert.

Die GFP-Osh-Stämme wurden unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor exprimiert, wodurch mit Glukose eine Repression des Promotors und seinen nachfolgenden Genen erfolgt. Mit Glycerin hingegen werden der Promotor sowie die nachfolgenden

Gene dereprimiert und mit Threonin überexprimiert. Um einen Hinweis auf die Funktionalität der fusionierten Gene zu bekommen, wurden die GFP-fusionierten Stämme mit einer Sporendichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen auf Glukose-, Glyzerin- und Threoninmedien angeimpft und drei Tage bei 37 °C inkubiert.

Der GFP-OshA Stamm zeigte auf dem Glukosemedium das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. (Abbildung 35). Die Stämme GFP-OshB, GFP-OshC und GFP-OshD wiesen eine Wachstumsverzögerung und eine braun-grüne Sporenfärbung auf. Die beiden Stämme GFP-OshE und OshE-GFP zeigten einen ähnlichen Koloniedurchmesser wie der Wildtyp (Abbildung 36), wohingegen ihre Sporenfärbungen bräunlich-grün waren (Abbildung 35). Auf dem Medium Glyzerin konnte bei allen GFP-fusionierten Stämmen ein ähnliches Wachstum verzeichnet werden (Abbildung 36) und die Sporenfärbung war wie beim Wildtyp grün (Abbildung 35). Die Wachstumsverzögerung der GFP-OshB, GFP-OshC und GFP-OshD Stämme wurden auf dem Glyzerinmedium komplementiert. Die Stämme GFP-OshB, GFP-OshC und GFP-OshD zeigten auf Threonin annähernd das gleiche Wachstum (Abbildung 36) und grüne Sporen wie der Wildtyp (Abbildung 35). Der GFP-OshA Stamm zeigte ein größeres Myzelwachstum, welches aber nicht so dicht wie beim Wildtyp war und wies keine grüne Sporen auf. Die beiden Stämme GFP-OshE und OshE-GFP wiesen bräunliche Sporen auf. Alle Stämme auf Threonin wiesen kein so dichtes Myzel auf wie bei Glukose und Glyzerin.

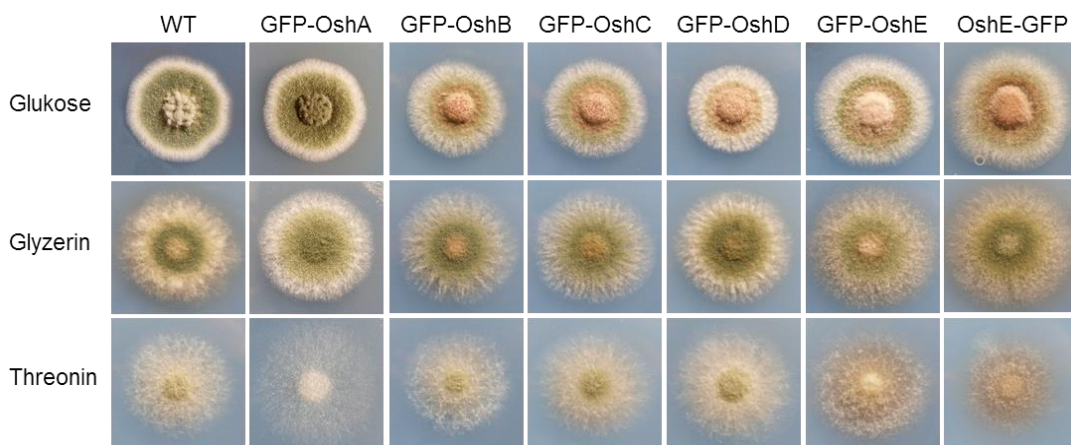


Abbildung 35: GFP-Osh- bzw. OshE-GFP-Stämme auf Glukose-, Glyzerin- und Threoninmedien. Es wurden jeweils 10 µl Sporensuspension mit $2,5 \cdot 10^4$ Sporen pro Platte bei 37 °C und drei Tagen inkubiert. Auf Glukose konnte bei den Stämmen GFP-OshB, GFP-OshC und GFP-OshD eine Wachstumsverzögerung beobachtet werden, welche auf Glyzerinmedium komplementiert wurde. Auf dem Threoninmedium war das Wachstum der Stämme bis auf GFP-OshA ähnlich wie beim Wildtyp.



Abbildung 36: Kolonie Durchmesser in cm der GFP-OshA-E und OshE-GFP-Stämme auf Glukose- (lila), Glyzerin- (grün) und Threoninmedien (rosa). Es wurden jeweils 10 µl Sporensuspension mit $2,5 \cdot 10^4$ Sporen pro Platte bei 37 °C drei Tagen mit anschließender Durchmesserbestimmung inkubiert.

3.3 Verschiedene Phänotypen, Wachstumsverhalten und Konidiosporenanzahlen der *osh*-Deletionsstämme

Um die Funktionen von *oshA-E* in *A. nidulans* näher zu untersuchen, wurde für jedes Gen ein Deletionsstamm hergestellt. Dafür wurde zuerst je eine ca. 1 kb große Sequenz der *up-* und *downstream* Regionen des entsprechenden *open reading frames* (ORF) des Gens über ein PCR amplifiziert: Für die Gene *oshA*, *oshC* und *oshD* wurden folgende Primer mit *SfiI*-Linker verwendet. Für die *left border* (LB) und *right border* (RB) des *oshA*-Gens wurden die Primer *oshA-FW-LB*, *oshA-Rev-LB*, *oshA-FW-RB*, *oshA-Rev-RB* genutzt. Für die Amplifikation der LB und RB des *oshC*-Gens wurden die Primer *oshC-LB-del-FW*, *oshC-LB-del-Rev*, *oshC-RB-del-FW*, *oshC-RB-del-Rev* und für *oshD* die Primer *oshD-LB-del-FW*, *oshD-LB-del-Rev*, *oshD-RB-del-FW*, *oshD-RB-del-Rev* verwendet. Alle Primer, welche für die Deletionen verwendet wurden, enthielten die *SfiI*-Schnittstelle. Zusätzlich zu der LB und RB wurde das Gen des *pyroA*-Auxotrophiemarkers (Osmani *et al.*, 1999) amplifiziert. Das *pyroA*-Gen codiert ein Gen, welches in den Biosyntheseweg von Pyridoxin involviert ist (Osmani *et al.*, 1999). Die Primer *Sfi-linker-FW* und *Sfi-linker-Rev* für die *pyroA*-Kassette enthielten ebenfalls *SfiI*-Linker. Die LB, RB und die Marker-Kassette wurden über eine Fusion-PCR fusioniert, sodass *pyroA* von der LB und RB flankiert wurde. Dafür wurden die Primer-Sets *oshA-FW-LB* und *oshA-Rev-RB*, *oshC-LB-del-FW* und *oshC-RB-del-Rev*, *oshD-LB-del-FW* und *oshD-RB-del-Rev* verwendet. Die *oshA*-Deletionskassette wurde in den Vektor pJet1.2 kloniert und es entstand das Plasmid pHH3 (konstruiert von H. Haag, Bachelorarbeit).

Die Deletionskassetten *oshB* und *oshE* wurden über das *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC; Kansas, USA) (Plattennummer 20091230B) bestellt. Diese beiden Kassetten enthielten den *pyrG*-Auxotrophiemarker. Das *pyrG*-Gen codiert für die Orotidine-5'-phosphat Decarboxylase, welche für die Pyrimidinsynthese benötigt wird (Oakley *et al.*,

1987; Sun *et al.*, 2013). Die Primer Nr. 39 und Nr. 40 wurden zur Amplifikation der Deletionskassetten *oshB* und *oshE* genutzt, welche ebenfalls über die FGSC bezogen wurde. Auch hier wurde der Auxotrophiemarker von der LB und RB des zu deletierenden Genes flankiert. Die vier PCR-Produkte der Deletionskassetten für die Deletionen der *oshB*-, *oshC*-, *oshD*- und *oshE*-Gene und das Plasmid pHH3 wurden in den *A. nidulans* Stamm TN02A3 transformiert. Durch die Flanken der *up*- und *downstream* gelegenen Sequenzen wurde eine homologe Rekombination ermöglicht und das entsprechende *osh*-Gen wurde durch *pyroA* bzw. *pyrG* ersetzt.

Der Wildtyp-Stamm besitzt sowohl eine *pyroA*- als auch eine *pyrG*-Auxotrophie, welche durch die Transformation mit dem entsprechenden Deletionskonstrukten hinfällig wurde. So verloren positive Transformanten mit einem *pyroA*-Deletionskonstrukt die *pyro*-Auxotrophie und waren in der Lage auf Medium ohne Pyridoxin zu wachsen. Die positiven Transformanten mit einem *pyrG*-Deletionskonstrukt konnten nun auf Medium ohne Uridin und Uracil wachsen, da sie ebenfalls die *pyrG*-Auxotrophie verloren hatten. Diese positiven Transformanten wurden auf Rasterplatten übertragen und nach 3 Tagen Wachstum anhand ihres Phänotyps ausgesucht. Deletionsstämme, welche nicht wie der Wildtyp aussahen, wurden auf Einzelplatten transferiert.

Von diesen Transformanten wurde gDNA hergestellt und anhand von Southern Blots auf homologe Integration des Deletionskonstrukts hin überprüft (Abbildung 37). Für die verschiedenen Southern Blots wurde die jeweilige gDNA des zu überprüfenden Stammes mit Restriktionsenzymen über Nacht verdaut. Für die Stämme mit dem *oshA*-Deletionskonstrukt wurde das Enzym *PvuII* verwendet. Die Stämme für das *oshB*-Deletionskonstrukt wurden mit *EcoM* verdaut, wohingegen die Stämme für das *oshC*-Deletionskonstrukt mit *KpnI*, das *oshD*-Deletionskonstrukt mit *SacI* und das *oshE*-Deletionskonstrukt mit *EcoM* verdaut wurden. Am nächsten Tag wurden die Restriktionsverdau auf ein Agarosegel aufgetragen, um sie anschließend auf eine Nylonmembran (positiv geladen) zu übertragen. Zum Nachweis der homologen Integration wurden für die jeweils zu überprüfenden Gene DIG-markierte Sonden gegen die LB für die entsprechende Gene gefertigt. Für die Verwendung der LB-Sonde entstand für den Deletionsstamm *oshA* eine 0,7 kb und für den Wildtyp eine 1,5 kb große Bande (Abbildung 37). Mutanten (Spur 2 und 3) die eine Bande bei 1,5 kb und 0,7 kb aufwiesen, zeigten sowohl die Wildtypbande als auch die Deletion. Dies ist durch nicht homologe Integration zu erklären. Für den Deletionsstamm *oshB* unter der Anwendung der LB-Sonde zeigte sich eine 4,1 kb große Bande und beim Wildtyp eine 5 kb Bande. In Spur 1 wurde die Wildtyp- und Deletionsbande nachgewiesen, jedoch zeigten Spur 2 und Spur 3 reine Deletionsmutanten. Die Bandengröße für den Deletionsstamm *oshC* war 2,2 kb und 3 kb für den Wildtyp nach Einsatz der LB-Sonde. Unter Verwendung der LB-Sonde offenbarte der Deletionsstamm *oshD* eine 6,2 kb und der Wildtyp ein 4,6 kb Bande. Der Deletionsstamm *oshE* mit der LB-Sonde wies eine 3,5 kb und der Wildtyp eine 2,7 kb große Bande auf. Nach der Überprüfung auf die homologe Integration wurden die positiven Transformanten als SNB8 (Δ *oshB*), SNB9 (Δ *oshC*), SNB10 (Δ *oshD*), SNB11 (Δ *oshE*) und SNB19 (Δ *oshA*) (Tabelle 5) bezeichnet.

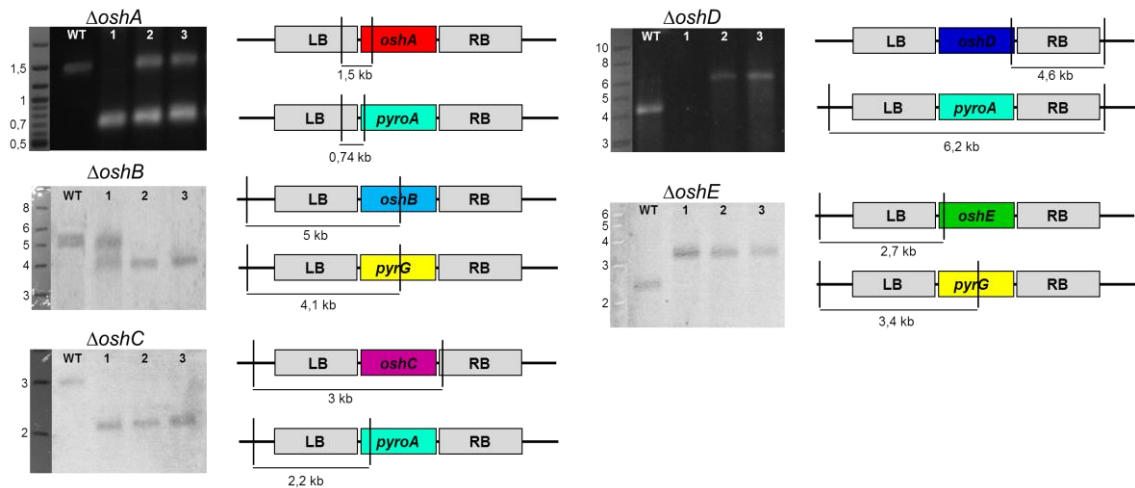


Abbildung 37: Southern Blots der einzelnen *osh*-Deletionsstäme mit dem jeweiligen Schema der Restriktionsverdau zur Überprüfung der homologen Integration. Für die Southern Blots wurde genomische DNA der Transformant, wie nachfolgen beschrieben, verdaut und über ein Gel aufgetrennt sowie auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Zum Nachweis der richtigen Integration wurde eine mit DIG-markierte *gfp*-Sonde verwendet. $\Delta oshA$ wurde mit dem Enzym *PvuII* nachgewiesen und zeigt für die homologe Integration eine 0,73 kb Bande, während der Wildtyp eine 1,5 kb Bande aufweist. Für die homologe Integration des *oshB*-Deletionskonstrukts wird eine Bande bei 5 kb für den Wildtyp und eine 4,1 kb Bande für die *oshB*-Deletion nachgewiesen, welche mit *EcoNI* verdaut wurde. Mit *KpnI* wurde die *oshC*-Deletion mit einer Bande von 2,2 kb in der Mutante und 3 kb beim Wildtyp gezeigt. $\Delta oshD$ wurde mit *SacI* überprüft und zeigt für die homologe Integration eine 6,2 kb Bande, während eine 4,6 kb Bande den Wildtyp repräsentiert. Die *oshE*-Deletion wurde mit *EcoNI* untersucht und zeigte eine Bande von 3,4 kb, wohingegen der Wildtyp eine 2,7 kb Bande aufwies.

Zur Analyse der *osh*-Deletionsstäme auf ihre Phänotypen wurden je 10 μ l Sporensuspension mit $2,5 \cdot 10^4$ Sporen für die *osh*-Deletionsstäme und den Wildtyp auf eine MM Platte mit entsprechenden Auxotrophiemarkern getropft. Nach 3-tägiger Inkubation wurden die Platten mit den Stämmen fotografiert (Abbildung 38). Wie aus Abbildung 38 hervorgeht, verursachten die Deletionen der *osh*-Gene verglichen mit dem Wildtyp Veränderungen im Phänotyp. So wies der *oshE*-Deletionsstamm ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp auf, zeigte jedoch eine grün-braune Färbung der Sporen bzw. Kolonie. Dies könnte ein Hinweis auf eine reduzierte Sporenproduktion sein. Die $\Delta oshA$ -, $\Delta oshB$ -, $\Delta oshC$ - und $\Delta oshD$ - Deletionsmutanten wuchsen zum Teil wesentlich langsamer als der Wildtyp. Die $\Delta oshC$ - und $\Delta oshD$ -Deletionsstäme wiesen jeweils eine kompakte bräunliche Kolonie- bzw. Sporenfärbung auf, was ebenfalls auf eine verminderte Sporenproduktion hinweisen könnte.



Abbildung 38: Phänotypen der *A. nidulans* *oshA-E* Deletionsstämme und des Wildtyps. Die Deletionen der *osh*-Gene verursachten eine Veränderung der Phänotypen bzw. des Wachstums im Vergleich zum Wildtyp. Es wurden jeweils $2,5 \cdot 10^4$ Sporen pro Platte einer $10 \mu\text{l}$ Sporensuspension auf MM Platten punktinokuliert und bei 37°C für drei Tagen inkubiert.

Die Bestimmung der Koloniedurchmesser in Abhängigkeit der Zeit (Abbildung 39) bestätigte das aus Abbildung 38 hervorgegangene Ergebnis. Die Deletionsmutante ΔoshA hatte ein um 8 % und ΔoshE um 5 % verringertes Wachstum nach 6 Tagen Inkubation. Die Stämme ΔoshC und ΔoshD zeigten nach 6 Tagen Inkubation im Vergleich zum Wildtyp 53 % bzw. 50 % kleinere Kolonien. Das Wachstum der ΔoshB -Deletionsmutante war nach 6 Tagen um 17 % reduziert.

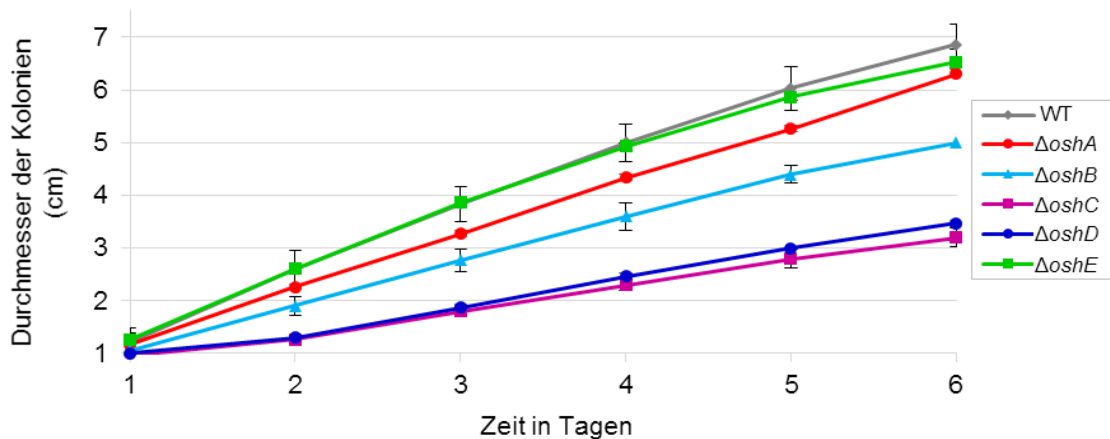


Abbildung 39: Gemessene Durchmesser der Kolonien der *osh*-Deletionsstämme und des Wildtyps während der sechstägigen Inkubation. Es wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ Sporensuspension mit $2,5 \cdot 10^4$ Sporen pro MM Platte bei 37°C sechs Tagen inkubiert. Die Durchmesserbestimmung erfolgte täglich. Die beiden Deletionsmutanten *oshA* und *oshE* wiesen ein ähnliches Wachstumsverhalten auf als der WT. *OshB*, *oshC* und *oshD* zeigten ein reduziertes Wachstum. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

Um dem Hinweis einer möglichen Reduktion der Konidiosporen, die aus Abbildung 38 hervor gegangen war, nachzugehen, wurde die Sporenanzahl der *osh*-Deletionsmutanten sowie die des Wildtyps ermittelt. Dafür wurden für jeden Stamm eine Sporensuspension mit einer Sporendichte von $2,5 \cdot 10^5$ Sporen in 5 ml Topagar (0,8%) inokuliert (Purschwitz *et al.*, 2008). Die Sporen wurden zusammen mit dem Topagar auf MM-Platten mit entsprechenden Auxotrophiemarkern überführt, mit Flüssigmedium überschichtet und im Dunkeln für 20 h inkubiert. Dieser Inkubationsschritt leitete die Entwicklungskompetenz ein. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Platten wurden für drei Tage bei 37°C und Licht inkubiert. Für

jede Platte wurden je drei Agarblöckchen mit Hilfe einer 1 ml Pipettenspitze von verschiedenen Stellen der Agarplatte ausgestanzt und jeweils in ein Eppi mit einer ein ml Lösung aus H₂O und Tween 20 (1 %) überführt. Nach kurzem Vortexen wurden die Eppis für 10 min bei 50 °C auf einem Heizblock schüttelnd inkubiert. Dies bewirkt zusammen mit dem Tween ein Ablösen der Sporen von den Konidiophoren. Vor dem Sporenzählen in der Helber-Zählkammer wurde nochmals kurz gevortext und die Sporenanzahl pro cm² bestimmt.

Alle *osh*-Deletionsstämme wiesen im Vergleich zum Wildtypstamm eine signifikant reduzierte Sporenanzahl auf (Abbildung 40). Bei $\Delta oshA$ konnte eine Sporenreduktion von 29 %, bei $\Delta oshB$ von 41 %, bei $\Delta oshC$ von 63 %, bei $\Delta oshD$ von 74 % und bei $\Delta oshE$ von 72 % ermittelt werden. Bei der Deletionsmutante *oshE* wurde eine Reduktion der Konidiosporen Anzahl festgestellt, jedoch war kein Wachstumsunterschied der Kolonie zum Wildtyp festzustellen, was auf eine Beteiligung in der Sporenbildung hindeuten könnte.

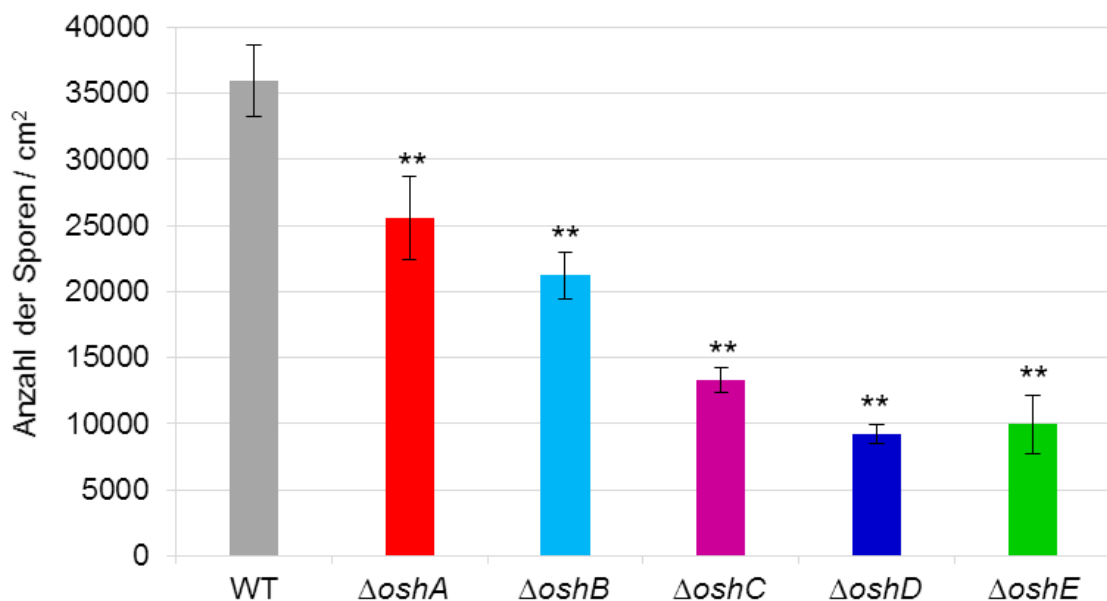


Abbildung 40: Reduktion der Konidiosporenanzahl pro cm² der *osh*-Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp. Es wurden jeweils $2,5 \cdot 10^5$ Sporen in fünf ml Topagar (0,8%) bei 37 °C drei Tagen inkubiert. Agarblöckchen wurden mit einer blauen Spitze aus der Platte ausgestochen und zehn Minuten schüttelnd in einem ml Tween-H₂O Gemisch inkubiert. Anschließend wurden die Sporen über eine Helber-Zählkammer ausgezählt. Alle *osh*-Deletionsstämme wiesen eine signifikant reduzierte Konidiosporenanzahl auf. Doppelsternchen weisen auf die statistische Signifikanz ($p < 0,01$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

Die Hyphenmorphologie der *osh*-Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtypstamm wurde mikroskopisch untersucht. Dafür wurden mit einem Zahnstocher die Sporen durch Picken in die Kolonie aufgenommen und auf eine neue MM-Platte mit entsprechenden Auxotrophiemarkern übertragen. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C. Unter dem Hellfeld wurden die Platten mikroskopiert.

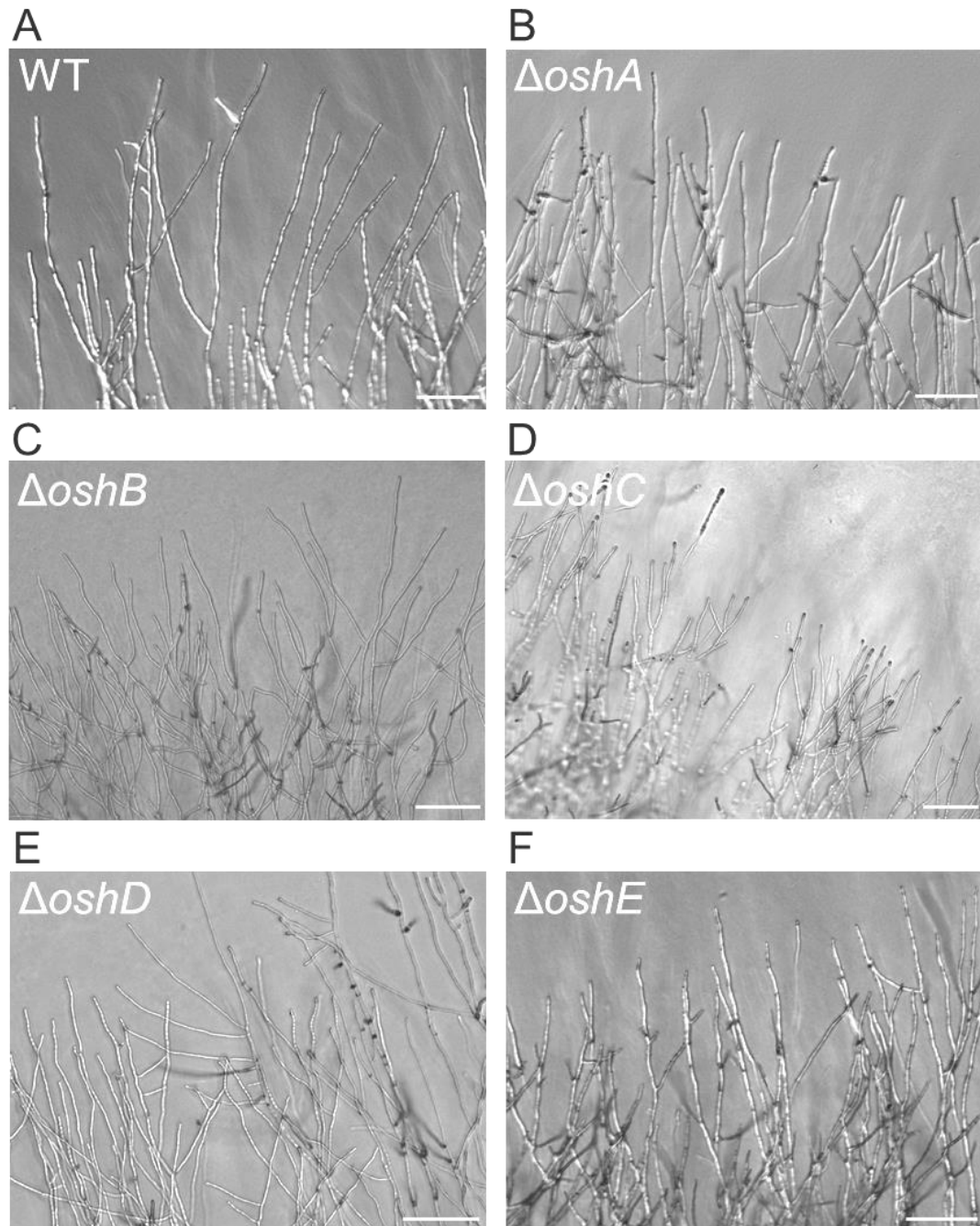


Abbildung 41: Übersichtsbilder der Hyphenmorphologie vom (A) Wildtypstamm und (B-F) von den *osh*-Deletionsstämmen. (A) Wildtyp, (B) $\Delta oshA$, (C) $\Delta oshB$ und (F) $\Delta oshE$ zeigten ein normales Hyphenwachstum mit einzelnen Verzweigungen. (D) $\Delta oshC$ und (E) $\Delta oshD$ wiesen mehr Verzweigungen auf. Maßstab: 100 μm ; Es wurden Sporen auf MM-Platten mit entsprechenden Auxotrophiemarkern mittels Zahnstocher angeimpft und für zwei Tage bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Die Hyphen der Deletionsstämme *oshA* (Abbildung 41 B), *oshB* (Abbildung 41 C) und *oshE* (Abbildung 41 F) zeigten verglichen mit dem Wildtypstamm keine Veränderungen in der Morphologie auf (Abbildung 41 A). Bei diesen Stämmen konnte ein normales Verzweigungsmuster beobachtet werden. Die Hyphenmorphologie der Deletionsstämme *oshC* (Abbildung 41 D, Abbildung 42 A, B) und Deletionsstämme

oshD (Abbildung 41 E, Abbildung 42 C, D) wiesen wesentlich mehr Verzweigungen auf als die des Wildtyps. Die Hyphen-Verzweigungspunkte der *oshC*- und *oshD*-Deletionsmutanten lagen näher beieinander als beim Wildtyp (Abbildung 42 B, D). Die Deletionsmutante *oshD* deutete an manchen Stellen zusätzlich geschwollene Hyphenspitzen bzw. ausgelaufene Hyphenspitzen auf, was auf Zellyse an der Hyphenspitze hinweist (Abbildung 42 E; Pfeile).

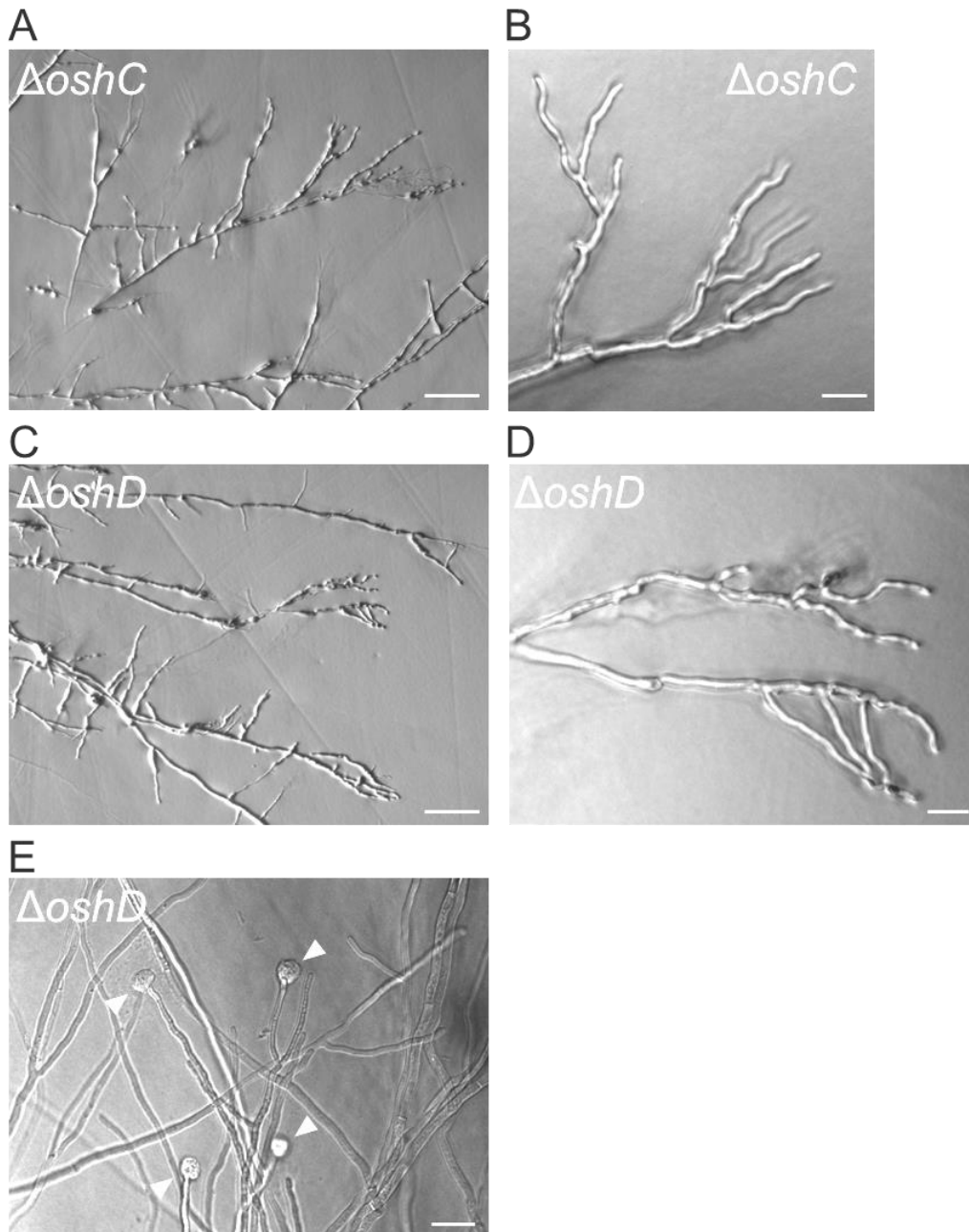


Abbildung 42: Ausschnitte der Hyphenmorphologie von (A-B) *oshC*- und (C-E) *oshD*-Deletionsstämmen. (A) Übersicht und (B) Ausschnitt der $\Delta oshC$ -Hyphen mit mehreren Verzweigungen. (C) Übersicht sowie (D) Ausschnitt der $\Delta oshD$ -Hyphen mit mehreren Verzweigungen. (E) $\Delta oshD$ -Hyphen mit geschwollenen Hyphenspitzen (Pfeile). Maßstabballen Übersichts bilder: 100 μm ; Maßstabballen Vergrößerungen: 20 μm ; Es wurden Sporen auf Platten mittels Zahnstocher angeimpft und für zwei Tage bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Die Deletionsstämme *oshC* und *oshD* wiesen im Vergleich zum Wildtyp einen veränderten Phänotyp auf. Um sicher zu stellen, dass diese Phänotypen von den eingebrachten Deletionen stammten, wurden die Deletionsstämme komplementiert. Dafür wurden PCR-Produkte gefertigt, welche die jeweilige Promotorsequenz, den *oshC* bzw. *oshD* ORF und die jeweilige Terminatorsequenz enthielten. Zur Amplifikation der kodierenden *oshC* Region wurden die Primer OshC Prom FW und OshC 3UTR Rev verwendet. Mit dem Primer-Set OshD Prom FW und OshD 3UTR Rev wurde die zu kodierende Region von *oshD* amplifiziert. Beide Forward Primer besaßen die Restriktionsschnittstelle *AcrII* und die *Ascl* Schnittstelle bei den Reverse Primern. Die verdauten PCR-Produkte wurden jeweils in den verdauten Efimov Vektor pMCB17apx kloniert, sodass die Plasmide pNB11 (*oshC(p)-oshC-oshC(t), pyr4*) und pNB12 (*oshD(p)-oshD-oshD(t), pyr4*) entstanden. Beide Plasmide wurden jeweils in die entsprechenden Deletionsstämme *oshC* bzw. *oshD* transformiert und es entstanden die Stämme SNB21 (*oshC* Kompl.) sowie SNB22 (*oshD* Kompl.). Die gewachsenen Transformanten wurden zur Überprüfung einer Integration der jeweiligen Plasmide anhand einer PCR analysiert. Dazu wurde gDNA der jeweiligen Transformanten, des Wildtyps TN02A3 und der *oshC*- und *oshD*-Deletionsstämme, isoliert. Der ORF (*open reading frame*) von *oshC* wurde mit den Primern OshC-FW und OshC-Rev amplifiziert. Die Transformanten mit dem Plasmid pNB11 (*oshC(p)-oshC-oshC(t)*), bei denen die Deletion komplementiert wurde, wiesen eine Bande bei 758 bp auf (Abbildung 43 A). Der Wildtyp TN02A3 zeigte ebenfalls eine Bande bei 758 bp und diente als Positivkontrolle. In der Deletionsmutante *oshC* konnte keine Bande des ORFs durch die Deletion dieses Genbereichs nachgewiesen werden. Der ORF von *oshD* in den Transformanten und dem Wildtyp TN02A3 zeigten Banden bei 805 bp (Abbildung 43 B). Der Wildtyp diente als Positivkontrolle. Durch die Deletion des ORF der Deletionsmutante *oshD* konnte keine Bande nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der homologen Integration der Plasmide pNB11 und pNB12 in den jeweiligen Transformanten (*oshC* bzw. *oshD* Komplementationsstämmen) sollte nochmals eine PCR mit Primern vor und nach der jeweiligen Integration der Plasmide durchgeführt und anschließend anhand eines Southern Blots auf eine homologe Integration untersucht werden.

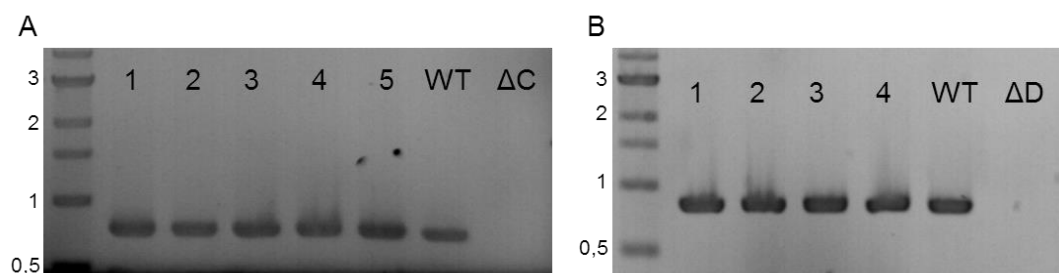


Abbildung 43: Überprüfung zur Integration der ORFs in den Transformanten, dem Wildtyp TN02A3 und den Deletionsstämmen *oshC* und *oshD*. Die PCR wurde von gDNA der möglichen *oshC* bzw. *oshD* Komplementationsstämmen, dem Wildtyp TN02A3 und den Deletionsstämmen *oshC* bzw. *oshD* angefertigt. Als Marker wurde der 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs) verwendet. (A) Der Primer OshC-FW bindet an den Beginn des *oshC* ORFs

und der OshC-Rev bindet im ORF. Das amplifizierte PCR-Produkt ist 758 bp groß. (B) Die Integration des *oshD* ORFs in den Transformaten wurde mit den Primern OshD-FW und OshD-Rev überprüft. Das zu amplifizierende PCR-Produkt ist 805 bp groß.

Zur Überprüfung der Stämme von den Komplementationen *oshC* (*oshC*-Kompl.) und *oshD* (*oshD*-Kompl.) im Vergleich zum Wildtyp und den Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* wurden wiederum Sporen mit einem Zahnstocher gepickt, auf MM Platten übertragen und für drei Tage bei 37 °C inkubiert.

Die *oshC* Komplementation zeigte einen gleichen Phänotyp wie der Wildtyp (Abbildung 44 A, oben) sowohl in der Sporenfärbung als auch im Koloniedurchmesser (Abbildung 44 B). Die Komplementation von *oshD* wies ebenfalls den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp auf (Abbildung 44 A, unten). Die Sporenfärbung war grün wie beim Wildtyp, allerdings war der Koloniedurchmesser etwas größer (Abbildung 44 B), was durch das Animpfen mittels Zahnstocher und somit unterschiedlicher Sporenanzahl erklärt werden kann. Die *oshC*- und *oshD*-Komplementationen unterschieden sich zu den beiden Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* sowohl im Koloniedurchmesser als auch in der Sporenfärbung (Abbildung 44 A & B).

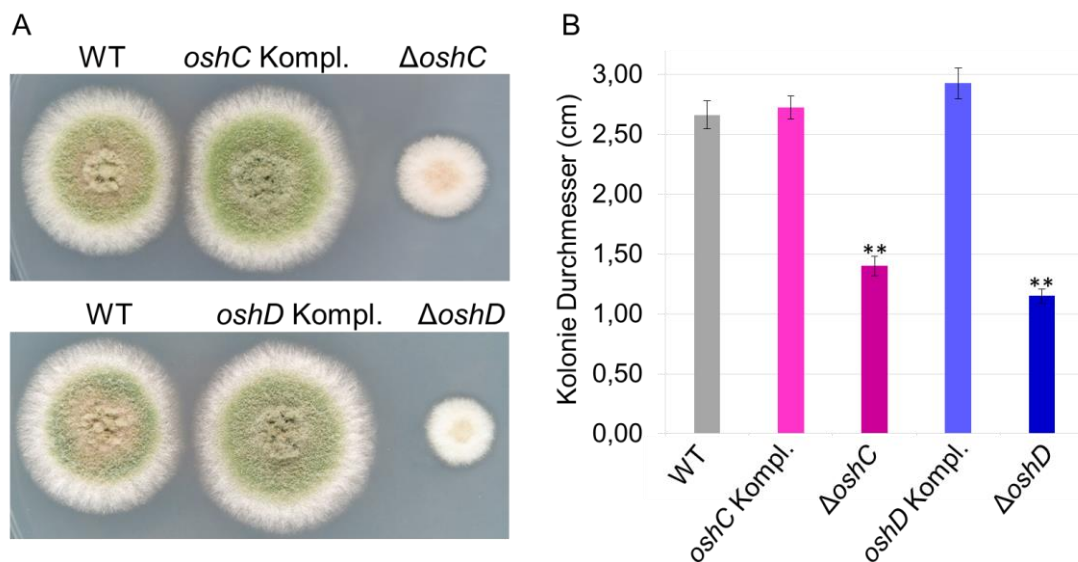


Abbildung 44: Phänotypen (A) und Koloniedurchmesser in cm (B) vom Wildtyp, den Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* sowie deren Komplementationsstämmen. (A) Die komplementierten Stämme *oshC* und *oshD* sahen aus wie der Wildtyp, wohingegen die Δ *oshC*- und Δ *oshD*- Mutanten eine Wachstumsverzögerung und eine kompaktere Wuchsform sowie bräunliche Sporen zeigten. (B) Der Koloniedurchmesser des Wildtyps, der Komplementationen *oshC* und *oshD* sowie den Deletionsmutanten *oshC-D*. Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz (** $p < 0,01$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n = 4). Die Sporen wurden mit einem Zahnstocher gepickt, auf MM Platten mit entsprechenden Auxotrophiemarkern überführt und für drei Tage bei 37 °C inkubiert.

3.4 Verschiedene Phänotypen in Flüssigmedium, unterschiedliche Biomassen und reduzierte Ergosterolkonzentration der *osh*-Deletionsstämme

Die Deletionsstämme wiesen zum Teil verschiedene Koloniegrößen auf. Durch die Deletionen der *osh*-Gene könnte die Ergosterollieferung vermindert sein, was vermuten lässt, dass eine Veränderung in der Ergosterolkonzentration vorhanden sein könnte. Deshalb wurden die Biomassen und die Konzentration des Ergosterols des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstämme analysiert.

Die Bestimmung Biomassen und Ergosterolkonzentration erfolgte durch Inokulation der *osh*-Deletionsstämme und des Wildtyps TN02A3 in Flüssigmedium. Dafür wurde je eine Sporensuspension mit einer Sporendichte von $2,5 \cdot 10^5$ Sporen pro 50 ml hergestellt, diese wurde in MM mit entsprechenden Auxotrophiemarkern inokuliert. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Myzelien wurden durch Abfiltrieren mit sterilem H₂O geerntet. Für die Biomassenbestimmung wurden die Myzelien über Nacht getrocknet sowie anschließend gewogen und für die Bestimmung der Ergosterolkonzentration wurden die Myzelien trocken gepresst. Die Überführung des Myzels für die Bestimmung der Ergosterolkonzentration erfolgte jeweils in ein steriles Flacon, von welchem vorher das Gewicht bestimmt wurde. Das Gewicht des Myzels im Falcon wurde ebenfalls bestimmt, sodass die Differenz der beiden Gewichte das semi-Trockengewicht des jeweiligen Myzels ergab. Die Myzelien wurden für die Bestimmung der Ergosterolkonzentration via HPLC wie folgt weiter verwendet: Zu dem jeweiligen Myzel wurden drei ml einer 25% alkoholischen Kaliumhydroxidlösung gegeben und für ein h bei 85 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden ein ml steriles H₂O und drei ml Pentan dazu gegeben und für mehrere Minuten stark gevortext. Die entstandene obere Pentanphase mit dem isolierten Ergosterol wurde jeweils in ein Glasfläschchen überführt und das Pentan unter einem Abzug verdampft. Das Ergosterol wurde in einem ml Methanol aufgenommen und steril filtriert. Die Absorption des Ergosterols erfolgte mit einer Flexar LC HPLC und der dazugehörigen Chromera Software.

3.4.1 Δ *oshA-E* mit unterschiedlichen Phänotypen in Flüssigmedium

Das Myzel der Pilzkulturen im Flüssigmedium der Deletionsstämme *oshA-E* und des Wildtyps zeigten unterschiedliche Phänotypen. Beim Wildtyp, den Deletionsstämmen *oshA*, *oshB* und *oshE* wurde das typische Wachstum des Myzels als kleine Bällchen beobachtet (Abbildung 45 A), welches auch unter dem Binokular sichtbar wurde (Abbildung 45 B). Die Myzelien der beiden Mutanten *oshC* und *oshD* zeigten jedoch in den Flüssigkulturen ein untypisches Wachstumsverhalten, indem sie als Hyphen weiter wuchsen. Sie formten keine Bällchen wie der Wildtyp aus (Abbildung 45 A), was durch die Aufnahmen mit dem Binokular (Abbildung 45 B) und dem Mikroskop (Abbildung 45 C) bestätigt wurde.

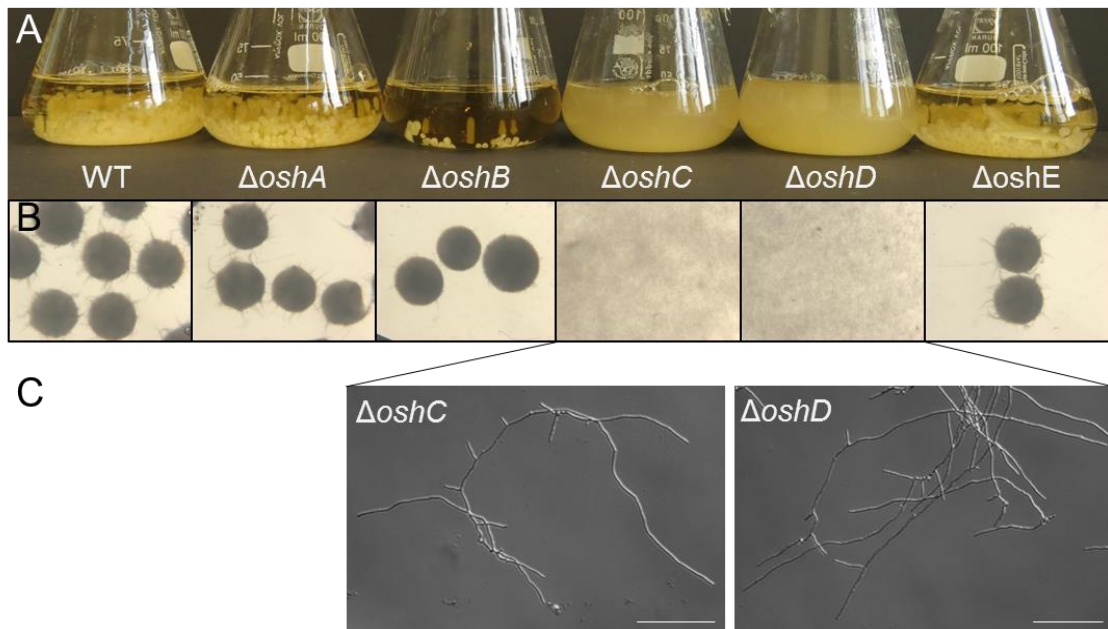


Abbildung 45: Phänotypen der *osh*-Deletionsstämmen und des Wildtyps in Flüssigmedium. (A) Flüssigkulturen des Wildtyps und der Deletionsstämmen *oshA*, *oshB* und *oshE* mit dem typischen Bällchenwachstum. Die Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* mit Hyphenwachstum. (B) Aufnahmen des Wildtyps und der Deletionsstämmen *oshA* und *oshE* unter dem Binokular. Wildtyp, *oshA*-, *oshB*- und *oshE*-Deletionsmutanten mit Bällchenwachstum. Untypisches Hyphenwachstum in Flüssigmedium beider Deletionsstämmen *oshC* und *oshD*. Für die Aufnahmen wurde etwas von den Flüssigkulturen in eine sterile Petrischale überführt. (C) Mikroskopische Aufnahmen der gewachsenen Hyphen von den Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* aus den Flüssigkulturen. Es wurden jeweils ca. 10 μ l der Flüssigkulturen auf ein Deckgläschen gegeben und im Hellfeld mikroskopiert. Maßstabsbalken: 100 μ m; Für jeden Stamm wurden $2,5 \cdot 10^5$ Sporen pro 50ml Medium bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert.

3.4.2 Verschiedene Biomassen und Reduktion der Ergosterolkonzentration von $\Delta oshA-E$

Die Bestimmung der Biomasse der *osh*-Deletionsstämmen sowie des Wildtypstammes erfolgte durch die Inkubation einer Sporensuspension mit einer Sporendichte von $2,5 \cdot 10^5$ in 50 ml Medium. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach dem Abfiltrieren der Stämme wurden die Myzelien mit Papierhandtüchern trocken gepresst und anschließend einen Tag bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Die Gewichtsmessung der getrockneten Myzelien erfolgte mittels einer Feinwaage.

Die Biomasse des Wildtyps wurde mit 393,4 mg bestimmt (Tabelle 2; Abbildung 46). Die *oshA*-Deletionsmutante wog 82,2 mg mehr als der Wildtyp, wohingegen die *oshE*-Mutante 71,3 mg weniger wog. Mit 364,4 mg wog $\Delta oshB$ 29 mg weniger wie der Wildtyp. Die beiden Deletionsmutanten *oshC* und *oshD* wiesen 139,2 mg bzw. 119,8 mg weniger Gewicht auf als der Wildtyp. Ein Unterschied konnte im Gewicht der Biomasse festgestellt werden, jedoch war dieser nicht signifikant.

Tabelle 2: Biomassen in mg der *osh*-Deletionsstäme und des Wildtyps

Stämme	Gewicht in mg	Stämme	Gewicht in mg
Wildtyp	393,4	$\Delta oshC$	254,2
$\Delta oshA$	475,6	$\Delta oshD$	273,6
$\Delta oshB$	364,4	$\Delta oshE$	322,1

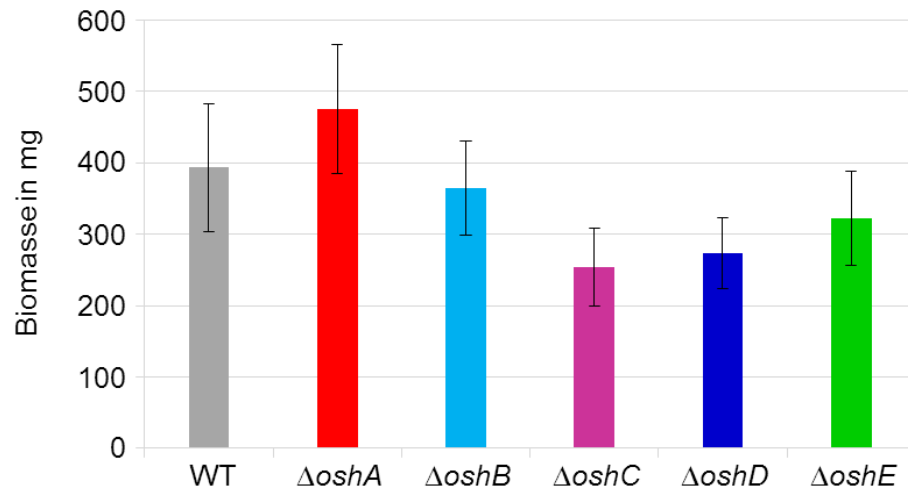


Abbildung 46: Biomassenbestimmung des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstäme in mg. Es wurden $2,5 \cdot 10^5$ Sporen in 50 ml Flüssigmedium inokuliert, über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Myzelien wurden abfiltriert und nach Trocknung der Myzelien wurde die Biomasse durch Wiegen bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n = 3).

In diesem Abschnitt der Arbeit sollten die *osh*-Deletionsstäme auf eine mögliche Reduktion der Ergosterolkonzentration untersucht werden. Für die Messung der Ergosterolkonzentration wurden die *osh*-Deletionsstäme und der Wildtyp $2,5 \cdot 10^5$ Sporen in 50 ml Flüssigmedium inokuliert, für 18 h bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Nach dem Abfiltrieren des Mediums wurden die Myzelien in Papiertüchern trocken gepresst, gewogen und in eine alkoholische Kaliumhydroxidlösung gegeben. Im Anschluss an eine einstündige Inkubation im Wasserbad wurden die Fettsäuren mit Pentan insoluiert und in ein Glasgefäß überführt. Das Pentan verdampfte unter einem Abzug, die Fettsäuren wurden in Methanol aufgenommen. Über einen Polytetrafluoroethylen- (PTFE) Filter (0,45 µm Porengröße) wurden die Fettsäuren-Methanol Lösungen filtriert.

Mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*), welche jeweils eine C18 Säule und einen UV-Licht-Detektor beinhaltet, wurde die Ergosterolkonzentration der *osh*-Deletionsstäme und des Wildtyps bestimmt. Zur Bestimmung der Konzentrationen in den Mutanten bzw. im Wildtyp wurde zuerst 150 µl eines Standards mit einer bestimmten Ergosterol-

Konzentration geladen. Die Messung erfolgte anhand einer Wellenlänge von 282 nm und wurde als ein Peak aufgezeichnet, welcher in mAU/min (*milli absorption units per minute*) angegeben wurde. Die Messung der Isolate mit jeweils 150 µl erfolgte im Anschluss. Die Bestimmung der Ergosterolkonzentration der Isolate erfolgte über ihre Peakfläche und die Peakfläche des Standards mit seiner bestimmten Ergosterolkonzentration. Zusätzlich wurde die Ergosterolkonzentration der Mutanten und des Wildtyps pro Gramm Pilz-Trockengewicht (semi-Trockengewicht) ermittelt.

Der Deletionsstamm *oshB* zeigte nur einen geringen Unterschied in der Ergosterolkonzentration im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 47). So lag die Reduktion der Konzentration ungefähr bei 16 %. Im Vergleich zum Wildtyp wiesen die Deletionsstämme *oshA*, *oshC*, *oshD* und *oshE* einen signifikanten Unterschied im Ergosterol-Gehalt auf. Die Deletionsmutanten *oshA*, *oshC* und *oshE* wiesen eine Reduktion der Ergosterolkonzentration in einem Gramm Myzel von circa 32 % auf, wohingegen Δ *oshD* eine Reduktion um 61 % aufwies. Bis auf Δ *oshB* waren die Ergosterolkonzentrationen der anderen Deletionsstämme signifikant reduziert (Abbildung 47, Sternchen).

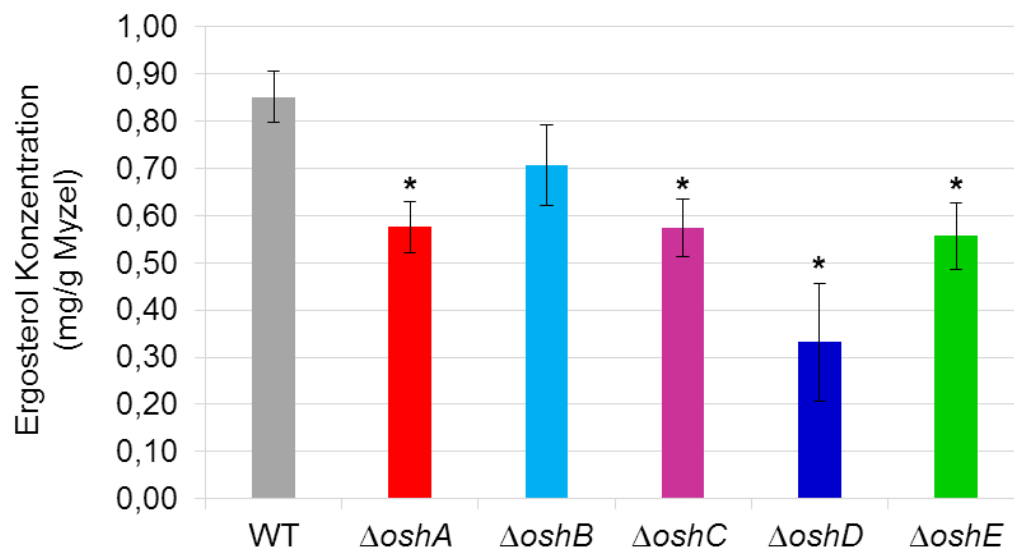


Abbildung 47: Ergosterolkonzentrationen der *osh*-Deletionsstämme und des Wildtyps in mg/g Myzel mit signifikanten Konzentrationsunterschieden. Es wurden $2,5 \cdot 10^5$ Sporen in 50 ml Flüssigmedium inokuliert und über Nacht bei 37 °C sowie 180 rpm inkubiert. Die Myzelien wurden abfiltriert und das Ergosterol isoliert. Anschließend wurden 150 µl Ergosterolstandard sowie 150 µl der Isolate vom Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen mittels einer HPLC gemessen und die Konzentrationen auf ein mg/g Myzel berechnet. Die Deletionsstämme weisen alle eine Reduktion der Ergosterolkonzentrationen auf. Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz ($p < 0,05$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 2$).

3.5 Unterschiedlich starke Expressionen der Gene *oshA-E* in Δ *oshA*- Δ *oshE*

Zur Bestimmung der Expressionen der Gene *oshA-E* wurden von jedem Deletionsstamm und dem Wildtypstamm RNA isoliert. Die Sporen der zu untersuchenden Stämme wurden über Nacht in kleinen Petrischalen mit Minimalmedium und entsprechenden Auxotrophiemarkern angeimpft, bei 37 °C stehend inkubiert, um am nächsten Tag die Kahmhaut in einem Eppendorfgefäß mit Glasperlen zu ernten. Sie wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Myzel, welches mit einem RLT-Puffer versehen wurde, wurde in einer Zellschwingmühle aufgeschlossen. Nach der in verschiedenen Schritten erfolgten RNA-Extrahierung wurde die DNA in der RNA-Lösung mit einem DNA-Verdau abgebaut. Die reine RNA wurde für eine quantitative Real-Time-PCR weiter verwendet. Zur Ermittlung der Expression der verschiedenen Gene wurden das Biotek SeniFast SYBR und das Fluorescein One Step Kit verwendet und in einem iCycler iQ-Detektionssystem analysiert. Als Haushaltsgen wurde das Histon H2B verwendet und mit den Primern H2B-FW-qRT-PCR und H2B-Rev-qRT-PCR amplifiziert. Für das *oshA*-Gen wurde das Primer-Set *oshA* FW_qRT-PCR und *oshA* Rev_qRT-PCR verwendet. Die Amplifikation des *oshB*-Gens erfolgte mit den Primern *oshB* FW-qRT und *oshB* Rev-qRT. Das Gen *oshC* wurde mit den Primern *oshC* FW-qRT und *oshC* Rev-qRT amplifiziert. Für das Gen *oshD* wurden das Primer-Set *oshD* FW-qRT und *oshD* Rev-qRT verwendet. Die Amplifikation für das Gen *oshE* wurde mit den Primern *oshE* FW-qRT und *oshE* Rev-qRT durchgeführt. Die relative Expression wurde anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ermittelt.

Die relative Expression der *osh*-Gene wurde im Wildtyp und in den Deletionsmutanten *oshA-E* analysiert (Abbildung 48 & Abbildung 49). Die Expression der Gene *oshA*, *oshC*, *oshD* und *oshE* zeigten im Wildtyp ein vergleichbares Expressionslevel (Abbildung 48), wohingegen *oshB* niedriger exprimiert wurde (Abbildung 49). Das *oshA*-Gen wurde in der *oshB*-Deletionsmutante am stärksten exprimiert, während die Expression dieses Gens in den anderen *osh*-Deletionsstämmen eine ähnlich starke Expression aufwies (Abbildung 48). In allen *osh*-Deletionsmutanten und im Wildtyp wurde das *oshB*-Gen im Vergleich zu den anderen Genen schwächer exprimiert (Abbildung 48 schwarzer Rahmen; Abbildung 49). Das *oshB*-Gen wurde in der *oshD*-Deletionsmutante wiederum am stärksten exprimiert. Eine signifikante Reduktion der Expression des *oshB*-Gens wurde in der *oshA*- und *oshC*-Deletionsmutante beobachtet (Abbildung 49). Das *oshC*-Gen wurde signifikant in der *oshA*-, *oshD*- und *oshE*-Deletionsmutante exprimiert. Die Expression in der *oshA*- und *oshE*-Deletionsmutante war jedoch schwächer als in der *oshD*-Deletionsmutante (Abbildung 48). Eine starke Expression des *oshD*-Gens konnte in der *oshB*-Deletionsmutante analysiert werden, wobei die Expression in den anderen *osh*-Deletionsmutanten und im Wildtyp wesentlich schwächer war. Das *oshD*-Gen war in allen *osh*-Deletionsmutanten signifikant exprimiert (Abbildung 48). Eine ebenfalls signifikante Expression des *oshE*-Gens wurde in der *oshB*-Deletionsmutante beobachtet. In den anderen *osh*-

Deletionsmutanten und dem Wildtyp wurde das *oshE*-Gen relativ ähnlich stark exprimiert (Abbildung 48).

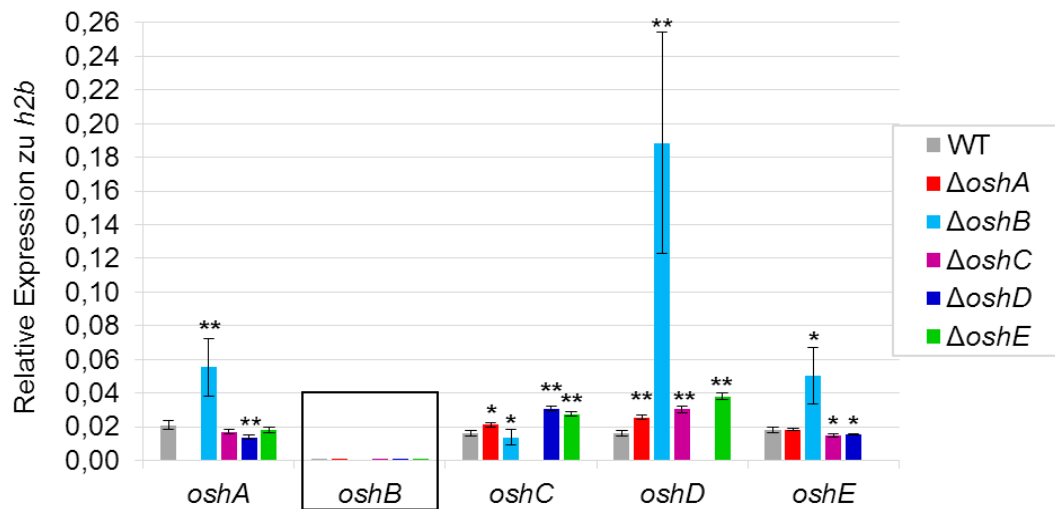


Abbildung 48: Relative Expression der Gene *oshA-E* im Wildtyp und den Deletionsstämmen *oshA-E* anhand der quantitativen RT-PCR. Die Messungen der Expressionen von *oshA-E* im Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen erfolgte jeweils anhand drei biologischer Replikate des Wildtyps und den *osh*-Mutanten sowie jeweils drei technischer Replikate. Der schwarze Rahmen weist auf den Auszug von *oshB* in Abbildung 49 hin. Die Sporen der Stämme wurden in flüssigem MM mit entsprechenden Auxotrophiemarkern angeimpft und die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 180 rpm. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Jeweils 100 ng RNA wurden für die qRT-PCR eingesetzt. Als Template wurden jeweils 140-150 bp große Stücke in den Exons der *osh*-Gene gewählt. Die relative Expression erfolgte zu dem Haushaltsgen Histon H2B. Die Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

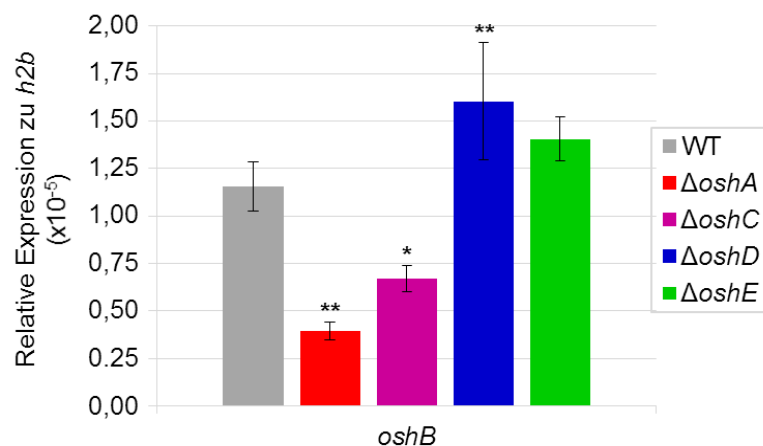


Abbildung 49: Relative Expression des Gens *oshB* im Wildtyp und den Deletionsstämmen *oshA-E* anhand der quantitativen RT-PCR. In flüssigem MM mit entsprechenden Auxotrophiemarkern wurden die Stämme angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Jeweils 100 ng RNA wurden für die qRT-PCR eingesetzt. Als Template wurden jeweils 140-150 bp große Stücke in den Exons der *osh*-Gene gewählt. Die relative Expression erfolgte zu dem Haushaltsgen Histon H2B. Die Expressionsmessungen von *oshA-E*

im Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen wurde jeweils mit drei biologischen und drei technischen Replikaten des Wildtyps und den *osh*-Mutanten durchgeführt. Die Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

Anhand der unterschiedlichen Expressionen der *osh*-Gene wurde das Expressionsverhältnis zwischen dem jeweiligen *osh*-Gen im Wildtyp und den *osh*-Deletionsmutanten ermittelt (Abbildung 50). Durch diesen Vergleich konnte festgestellt werden, dass das *oshD*-Gen in der *oshB*-Deletionsmutante 12-mal stärker induziert war wie im Wildtyp und die Induktion der beiden Gene *oshA* und *oshE* dreimal stärker war. Zusätzlich wurde das *oshD*-Gen in der *oshC* und *oshE*-Deletionsmutante doppelt so stark induziert als beim Wildtyp. Das *oshC*-Gen war in der *oshD*-Deletionsmutante von allen *osh*-Genen am stärksten induziert und das fast doppelt so stark wie beim Wildtyp. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einige der *osh*-Gene, welche in den *osh*-Deletionsmutanten induziert waren, die Funktion der ausgeschalteten *osh*-Gene komplementieren.

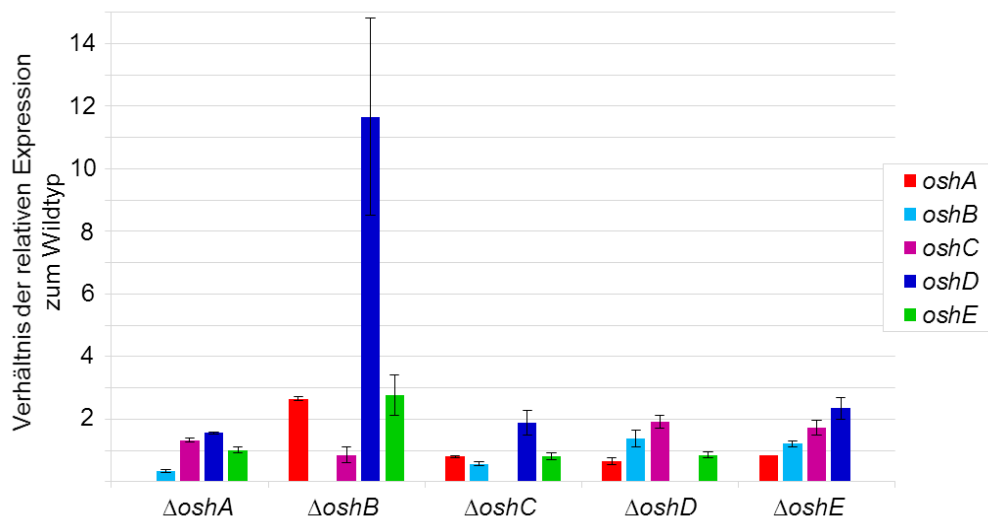


Abbildung 50: Verhältnis der relativen Genexpression der *osh*-Deletionsstämmen und des Wildtyps. Die Verhältnisberechnung erfolgte anhand jedes *osh*-Gens im Wildtyp zu dem jeweiligen *osh*-Gen des entsprechenden *osh*-Deletionsstamm. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

3.6 OshE ist an der Konidiophorentwicklung beteiligt

Die Konidiosporenproduktion sollte zwischen dem Wildtyp, der *oshE*-Deletionsmutante sowie der GFP-OshE-Mutante auf Glukose- und Glycerinmedium untersucht werden. Mit diesem Versuch sollte zum einen beobachtet werden, ob die Sporenproduktion auf dem Glukose- und Glycerinmedium im Vergleich zum Wildtyp stark unterschiedlich verläuft und zum anderen, ob der *alcA*-Promotor auf dem Glukosemedium unterdrückt bzw. auf dem Glycerinmedium exprimiert wird und somit auch die Expression des

oshE-Gens stattfinden konnte. Zur Ermittlung der Sporenanzahl der Stämme wurden $2,5 \cdot 10^5$ Sporen in 5 ml Topagar (0,8%) auf MM Platten mit Glukose oder Glyzerin inokuliert, mit Flüssigmedium überschichtet und im Dunkeln für 20 h inkubiert. Nach Abnahme des Flüssigmediums wurden die Platten für drei Tage bei Licht und 37 °C erneut inkubiert. Es wurden pro Platte je drei Agarblöckchen ausgestochen, welche jeweils in eine H₂O-Tween20-Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt wurden. Nach 10 min Inkubation auf einem Schüttelheizblock wurden die Sporen mit einer Helber-Zählkammer ausgezählt und anschließend die Sporenanzahl pro cm² bestimmt.

Der Wildtyp zeigte auf den Platten mit Glukose eine niedrigere Sporenanzahl auf als der Stamm mit GFP-OshE auf glukosehaltigem Medium, wohingegen die Deletionsmutante *oshE* eine signifikant niedrigere Sporenanzahl aufwies (Abbildung 51). Die Sporenanzahl auf dem Medium mit Glyzerin war sowohl bei der Δ *oshE* als auch bei dem GFP-OshE-Stamm signifikant reduziert bzw. erhöht. Gleichzeitig konnte an dieser Auszählung gezeigt werden, dass das GFP-OshE Protein unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor auf dem Glyzerinmedium funktionell ist, wobei der Promotor und somit auch die Expression des *oshE*-Gens auf dem Glukosemedium unterdrückt werden.

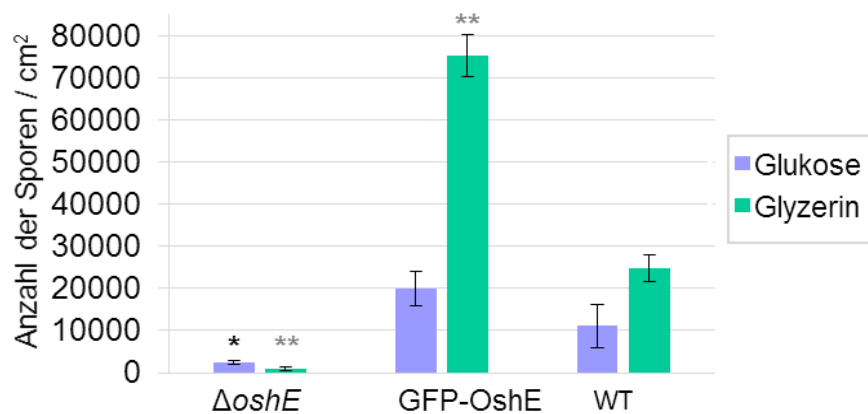


Abbildung 51: Anzahl der Sporen pro cm² im Wildtyp, Δ *oshE* und GFP-OshE-Stamm. Es wurden jeweils $2,5 \cdot 10^5$ Sporen in fünf ml Topagar (0,8%) bei 37 °C drei Tagen inkubiert. Je drei Agarblöckchen wurden mit einer blauen Spitze aus der Platte ausgestochen und zehn Minuten schüttelnd in einem ml Tween-H₂O Gemisch inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mittels einer Helber-Zählkammer ausgezählt. Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) zwischen dem Wildtyp und Δ *oshE* bzw. GFP-OshE auf Glukosemedium (schwarzes Sternchen) oder auf Glyzerinmedium (graue Sternchen) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

Der *oshE*-Deletionsstamm wies beim Bestimmen der Sporenanzahl im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Reduktion der Sporenanzahl auf. Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass OshE in die Konidiophorenbildung involviert sein könnte. Ob OshE daran beteiligt ist wurde anhand der Expression des *oshE*-Gens in Abhängigkeit der Konidiophorenentwicklungszeit mit einer quantitative Real-time PCR analysiert. Dafür wurde Wildtyp RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. Die Konidiosporen des

Wildtyps wurden in Erlenmeyerkolben mit MM und entsprechenden Auxotrophiemarkern angeimpft, bei 37 °C und 180 rpm über Nacht schüttelnd inkubiert. Die Ausbildung der Konidiophoren wurde durch die Inkubation in Flüssigkultur unterdrückt, da nur vegetativ wachsende Hyphen gebildet wurden. Die Isolierung der RNA zum Zeitpunkt 0 wurde aus diesen über Nacht gewachsenen Hyphen extrahiert, da die asexuelle Entwicklung noch nicht begonnen hatte. Die restlichen Myzelien wurden auf Agarplatten überführt, welche mit Zellophan beschichtet waren. Durch den Wechsel auf Agarplatten und den Kontakt mit der Luft wurde die asexuelle Entwicklung induziert. Die RNA wurde dann zusätzlich zu dem Zeitpunkt 0 nach 6, 8, 12 und 24 Stunden aus den auf Agarplatten gewachsenen Myzelien isoliert, damit die unterschiedlichen Entwicklungsstadien erfasst werden konnten. In den verschiedenen Entwicklungsstadien wird nach etwa 5-6 Stunden Wachstum der Stiel mit dem Vesikel gebildet. Metulae und Phialiden bilden sich nach 10-12 Stunden und danach die Konidiosporen (15-18 h) (Yu, 2010). Die Konidiophorenbildung ist nach etwa 24 Stunden abgeschlossen. Die isolierte RNA wurde für eine quantitative Real-time PCR verwendet. Es wurden jeweils drei biologische sowie technische Replikate eingesetzt. Als Haushaltgen wurde das Histon H2B verwendet, welches über das Primer-Set H2B-FW-qRT-PCR und H2B-Rev-qRT-PCR amplifiziert wurde. Das *oshE*-Gen wurde mit den Primern *oshE* FW-qRT und *oshE* Rev-qRT amplifiziert.

Die Expression des *oshE*-Gens war nach 8 Stunden Inkubation fast doppelt so hoch wie zum Zeitpunkt 0 h, während die Expression bei 12 h fast auf die Anfangsexpression von 0 h zurückging (Abbildung 52). Eine nahezu dreifach höhere Expression konnte nach 24 h analysiert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von OshE an der Entwicklung der Konidiophoren hin.

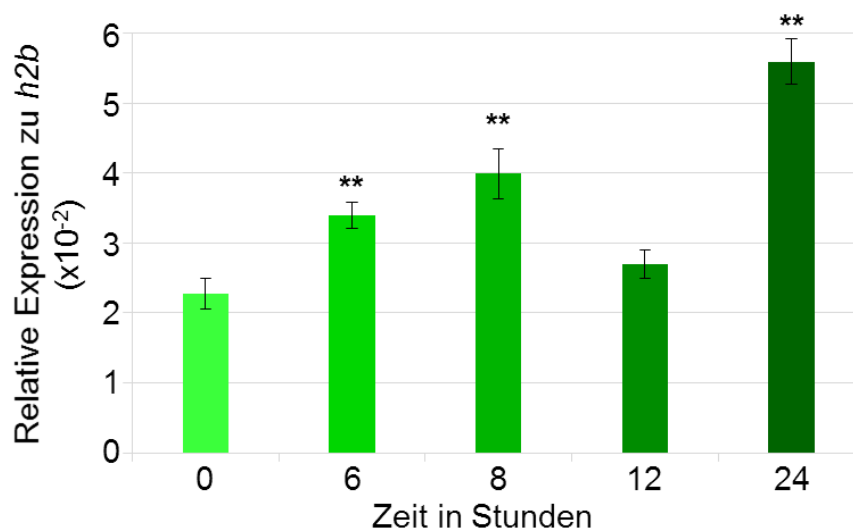


Abbildung 52: Relative Expression von *oshE* mit teilweise signifikanten Expressionsunterschieden zu den Zeitpunkten 0, 6, 8, 12 und 24 h im Wildtyp. Die Expression wurde mit der quantitativer Real-time PCR analysiert. Die Expressionsmessungen von *oshE* wurden jeweils mit drei biologischen und drei technischen Replikaten des Wildtyps durchgeführt. In flüssigem MM mit entsprechenden Auxotrophiemarkern wurde der Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit

Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach 0 Stunden isoliert. Die anderen Myzelien wurden auf Agarplatten mit Zellophan überführt und nach 6, 8, 12 und 24 Stunden geerntet sowie die RNA isoliert. Für die qRT-PCR wurden 100 ng RNA eingesetzt. Als Template wurde ein 145 bp großes Stück im Exon des *oshE*-Gens gewählt. Die relative Expression erfolgte zu dem Haushaltsgen Histon H2B. Doppelsternchen weisen auf die statistische Signifikanz ($p < 0,01$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

Eine Promotoranalyse innerhalb der 1 kb Promotorregion zeigte, dass sowohl *oshE* als auch *oshA*, *oshB* und *oshD* eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor BrlA besitzen (Abbildung 53). BrlA kontrolliert die Konidiophorenmorphogenese und wird während der asexuellen Entwicklung in den ersten 5-6 Stunden bei der Vesikelbildung aktiviert (Yu, 2010). Dieser Transkriptionsfaktor induziert die Expression anderer Gene, welche für die Konidiophorenbildung benötigt werden, so zum Beispiel *abaA*. Das *abaA*-Gen ist ein Entwicklungsregulator, welcher nach ungefähr 15-18 h nach der Entwicklungsinduktion exprimiert wird und seine Funktion in der Phialidendifferenzierung hat (Yu, 2010). In den Promotorregionen der *oshA* und *oshE* Gene konnten keine Bindungsstellen für AbaA detektiert werden, was den Rückgang der *oshE* Expression zum Zeitpunkt 12 h erklärt (Abbildung 52).

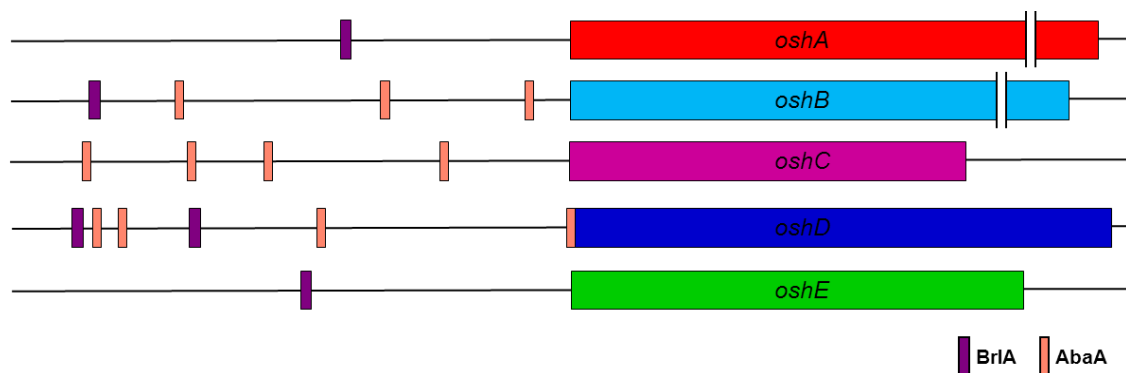


Abbildung 53: Bindungsstellen von BrlA und AbaA in den Promotorregionen der *osh*-Gensequenzen. In der 1kb-Promotorregionen von *oshA-E* wurden die Bindungsstellen für BrlA (5'-(C/A)(G/A)AGGG(G/A)-3') und AbaA (5'-CATTCTY-3') analysiert. Doppelbalken deuten auf Unterbrechung der *oshA*- und *oshB*-Gensequenz zur besseren Darstellung hin.

3.7 Verändertes Wachstumsverhalten der *osh*-Deletionsstämme bei ergosterolassozierten Wirkstoffen

Ein Hauptbestandteil der in Pilzen einzigartigen SRD (sterolreiche Domänen) in der Membran ist das Ergosterol, welches unter anderem regulierend auf die Membranfluidität und auf die Funktion von einigen membrangebundenen Enzymen wirkt (Shapiro *et al.*, 2011). Die SRDs in *Aspergillus nidulans* sind für die Aufrechterhaltung des polaren Wachstums und die Lokalisierung von Zellendmarkern wichtig (Takeshita *et al.*, 2008). Zur Behandlung von schwerwiegenden invasiven Pilzinfektionen gibt es verschiedene Wirkstoffe, welche entweder auf den

Biosyntheseweg oder auf fertig eingebautes Ergosterol in der Membran wirken (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2012; Arnold *et al.*, 2010; Neumann *et al.*, 2013; Valitova *et al.*, 2014). Das Wachstumsverhalten der *osh*-Deletionsstämme und des Wildtyps bei Verwendung dieser unterschiedlichen Wirkstoffe sollte mit den nachstehenden Experimenten untersucht werden.

3.7.1 Δ *oshB* reagiert sensitiv auf Voriconazolbehandlung

Das Triazol Antimykotikum Voriconazol (VCZ) wirkt in Pilzen auf den Ergosterolbiosyntheseweg und inhibiert das Enzym 14- α -Demethylase des Cytochrom P450-Systems, welches als ein Enzym in die Konvertierung von Lanosterol zu Ergosterol involviert ist (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008; Alcazar-Fuoli & Mellado, 2012; Mast *et al.*, 2013; Vermeulen *et al.*, 2013). Den Effekt von VCZ auf den Wildtyp und die *osh*-Deletionsstämme wurde auf MM Agarplatten untersucht. Die MM Platten wurden mit den entsprechenden Auxotrophiemarkern und mit VCZ-Konzentrationen von 0,1 – 1 μ M versehen. Die Platten wurden mit $2,5 \cdot 10^4$ Sporen punktinokuliert und für sechs Tage bei 37 °C inkubiert. Eine Ausmessung des Durchmessers erfolgte täglich.

Der Wildtyp und die Deletionsstämme *oshA*, *oshC*, *oshD* und *oshE* wiesen keine Beeinträchtigung des Wachstums bei einer 0,1 μ M VCZ-Konzentration auf (Abbildung 54, oben). Der *oshB*-Deletionsstamm reagierte wesentlich empfindlicher auf diese VCZ-Konzentration und zeigte im Vergleich zu einer unbehandelten Platte eine Reduktion des Wachstums von 58 % auf (Abbildung 55). Die 0,5 μ M VCZ-Konzentration erschwerte das Wachstum des Wildtyps und der Deletionsstämme *oshA*, *oshB* und *oshE*. Der *oshB*-Deletionsstamm konnte bei dieser Konzentration nicht mehr wachsen, wohingegen die Deletionsstämme *oshA* und *oshE* sowie der Wildtyp eine stark Beeinträchtigung des Wachstums aufwiesen (Abbildung 54, Mitte). Bei den beiden Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* war das Wachstum minimal erschwert, wohingegen die VCZ-Konzentration von 1 μ M das Wachstum dieser beiden Deletionsstämmen beeinträchtigte (Abbildung 54, unten). Die Mutante Δ *oshA* hatte bei der 0,5 μ M VCZ-Konzentration eine Wachstumsbeeinträchtigung, wohingegen eine kleine Kolonie bei 1 μ M noch sichtbar war. Der Wildtyp sowie der Deletionsstamm *oshE* konnten bei dieser VCZ-Konzentration nicht mehr wachsen. Die Deletionsstämme *oshC* und *oshD* zeigten Resistenzen bei niedrigen VCZ Konzentrationen.

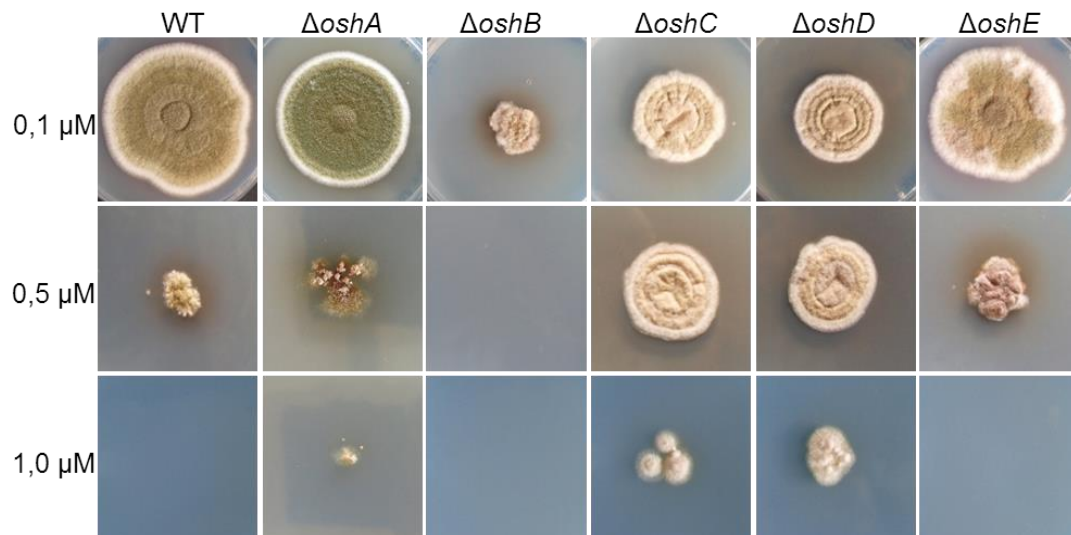


Abbildung 54: Unterschiedliche Phänotypen der Kolonien von den Deletionsstämmen *oshA-E* und des Wildtyps nach der Voriconazolbehandlung (0,1 – 1 μM). Es wurden $2,5 \cdot 10^4$ Sporen einer 10 μl Sporensuspension auf MM Platten mit unterschiedlichen VCZ-Konzentrationen (0,1 -1 μM) für sechs Tage bei 37 °C inkubiert. Von oben nach unten sind die verschiedenen VCZ-Konzentrationen und von links nach rechts die verschiedenen Stämme abgebildet.

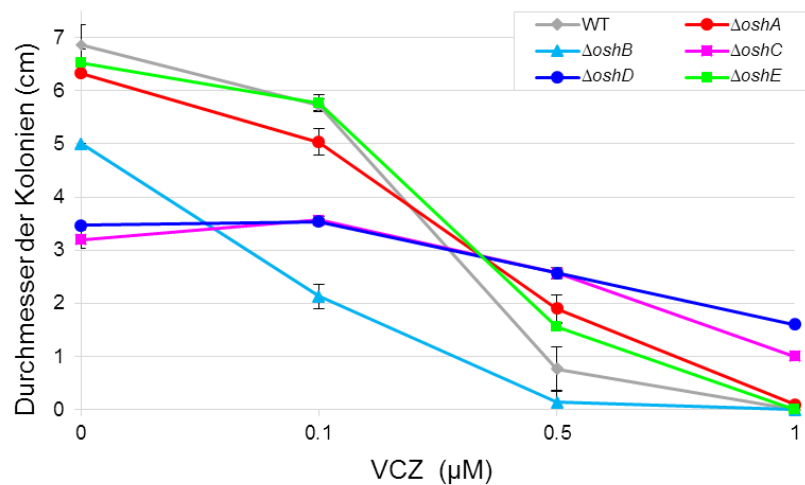


Abbildung 55: Koloniedurchmesser (cm) der Deletionsstämmen *oshA-E* und des Wildtyps während der Behandlung mit 0,1 – 1 μM Voriconazol. Der Durchmesser der Kolonien von angeimpften Sporensuspensionen ($2,5 \cdot 10^4$ Sporen/10 μl Sporensuspension) auf Agarplatten wurden mit unterschiedlichen VCZ-Konzentrationen (0,1 -1 μM) über sechs Tage gemessen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

Die Morphologie der Hyphen des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstämmen mit 0,1 μM VCZ wurde unter dem Mikroskop analysiert. Dafür wurden in einer sterilen Petrischale abgeflamte Deckgläschen mit MM und 0,1 μM VCZ beschichtet, mit Sporen inokuliert und bei 28 °C über Nacht inkubiert.

Der Wildtyp und die Deletionsstämme *oshA*, *oshB* und *oshE* wiesen geschwollene und depolarisierte Hyphen auf (Abbildung 56). Die beiden Deletionsstämme *oshC* und *oshD* zeigten hingegen ein eher typisches Hyphenwachstum. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wachstumsdefekte durch Voriconazol in den beiden Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* unterdrückt werden.

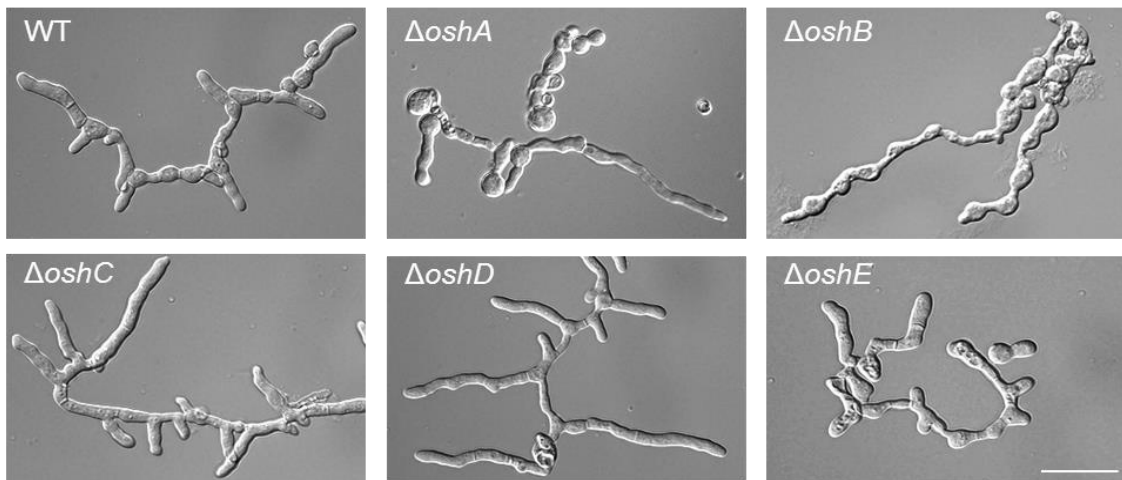


Abbildung 56: Hyphenmorphologie der *osh*-Deletionsstämme und des Wildtyps mit 0,1 µM VCZ zeigen unterschiedliche Phänotypen. Die Deckgläschen wurden mit MM, entsprechenden Auxotrophiemarkern sowie 0,1 µM VCZ versehen und die Sporen mit Zahnstochern darauf angeimpft über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die Aufnahmen der Hyphen erfolgte im DIC (*Differential Interference Contrast*)-Kanal. Maßstabballen: 20 µm

3.7.2 Verschiedene Sensitivitäten der *osh*-Deletionsstämme gegenüber ergosterolassozierten Wirkstoffen

Die in diesem Abschnitt verwendeten drei Wirkstoffe besitzen die Fähigkeit das Ergosterol in oder an der Membran zu binden. Amphotericin B (AmB) zählt zu den Polyenantimykotika und wird, wie VCZ, bei ernsthaften Pilzinfektionen verwendet. Das klassische Model der Wirkungsweise ist, dass AmB in der Pilz Plasmamembran an Ergosterol bindet und einen Transmembrankanal bildet. Durch diese Kanalbildung kommt es zu einem Verlust von K⁺-Ionen, was letztendlich zum Zelltod führt (Anderson *et al.*, 2014). Ein anderer getesteter Wirkstoff war Filipin, welches zu den Polyen-Makrolid-Antibiotika gehört, und durch die Bindung an Ergosterol die Plasmamembranpermeabilität verändert (Van Leeuwen *et al.*, 2009; Wachtler *et al.*, 2003). Der dritte getestete Wirkstoff war Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD). Dieser Wirkstoff bindet an die Ergosterolmoleküle und extrahiert das Ergosterol aus der Membran in kleine unilamellare MβCD-Vesikel (Teixeira *et al.*, 2012; Valitova *et al.*, 2014). Der Einfluss dieser drei Wirkstoffe auf den Wildtyp und die *osh*-Deletionsstämme wurde zuerst auf MM Platten mit Konzentrationen von 0,1 – 1 µM getestet. Anhand des unveränderten Wachstums wurden die *osh*-Deletionsstämme in Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen geprüft. Dafür wurde eine 96-well-Platte mit jeweils 200 µl entsprechendem MM und verschiedenen

Wirkstoffkonzentrationen befüllt. Für AmB und Filipin wurden Konzentrationen von 0,5 - 200 μM und für M β CD Konzentrationen von 0,5 – 10 mM verwendet. Als Farbindikator für die metabolische Aktivität wurde zusätzlich noch 100 μM Resazurin pro *well* hinzugegeben (Mania *et al.*, 2010). Resazurin ist ein blauer, nicht-fluoreszierender Farbstoff, welcher durch die Anwesenheit von respiratorischen Organismen zu dem pink fluoreszierenden Resorufin konvertiert wird (O'Brien *et al.*, 2000; Tizzard *et al.*, 2006). Zusätzlich wurden in die entsprechenden *wells* jeweils $2,5 \cdot 10^4$ Konidiosporen für die zu testenden Stämme zugegeben. Die Platten inkubierten für 30-32 Stunden bei 37 °C, bei entsprechendem Wachstum der Pilze kam es zu dem Farbumschlag. Diese Methode wurde verwendet um die Sensitivität des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstämme auf die verschiedenen ergosterolassoziierenden Wirkstoffe zu testen.

Beim Wildtyp und den Deletionsstämmen *oshB* und *oshE* zeigte der Wirkstoff AmB nach der Behandlung eine ähnliche Sensitivität mit einer minimale Hemmkonzentration (MHK) von 200 μM (Abbildung 57 A). Die beiden Deletionsstämme *oshC* und *oshD* wiesen hingegen eine MHK von 50 bzw. 10 μM auf.

Bei der Behandlung mit dem Wirkstoff Filipin zeigte der *oshB*-Deletionsstamm als Einziger eine MHK von 200 μM , wohingegen der Wildtyp und der *oshE*-Deletionsstamm einen MHK von 20 μM aufwiesen (Abbildung 57 B). Die beiden Deletionsstämme *oshC* und *oshD* zeigten bei einer MHK von 10 μM eine höhere Sensitivität gegenüber Filipin.

Die dritte Wirkstoffbehandlung mit M β CD zeigte beim Wildtyp und den *oshA*- und *oshB*-Deletionsstämmen eine Sensitivität bei einer MHK von 6 mM (Abbildung 57 C). Eine Resistenz gegenüber M β CD wies der *oshE*-Deletionsstamm mit einem MHK von 10 mM auf. Bei einer MHK von 2 mM wiesen die beiden Deletionsstämme *oshC* und *oshD* eine Sensitivität auf.

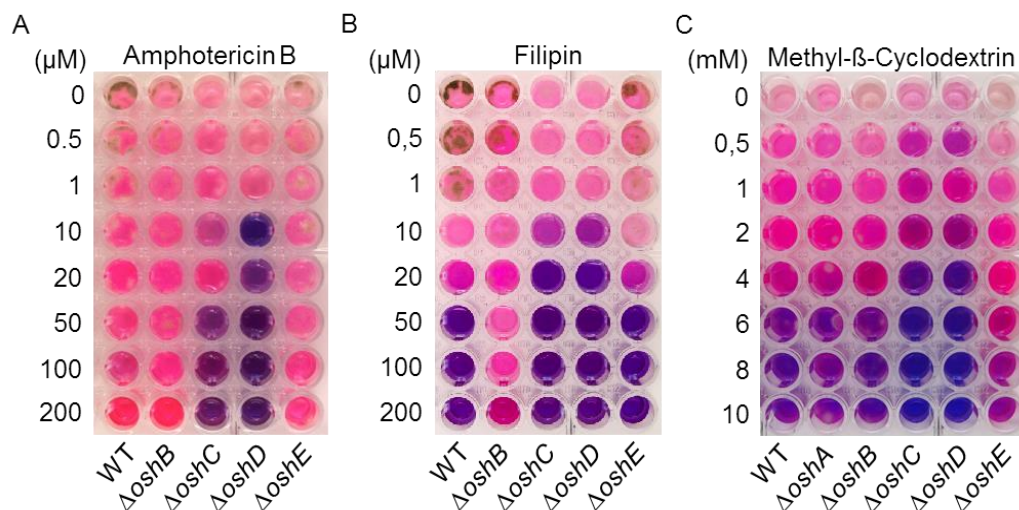


Abbildung 57: Sensitivitätstest auf verschiedene ergosterolassoziierende Wirkstoffe mit den *osh*-Deletionsstämmen und dem Wildtyp. Es wurde je eine 96-*well*-Mikrotiterplatte mit (A) AmphotericinB, (B) Filipin und (C) Methyl- β -Cyclodextrin angesetzt. Jedes *well* enthält $2,5 \cdot 10^4$ Konidiosporen des Wildtyps, der *oshB-E* Deletionsstämme oder der Deletionsstämme *oshA-E*

in 200 µl entsprechendem MM und 100 µM Reazurin. Die Wirkstoffkonzentrationen von 0 - 200 µM AmB bzw. Filipin und 0 – 10 mM MβCD wurden von oben nach unten in der Mikrotiterplatte verteilt, welche statisch bei 37 °C inkubiert wurden. Die Bilder wurden nach 32 h (A), 42 h (B) und 32 h (C) aufgenommen.

3.8 Erhöhte Expressionen der Gene *cyp51A* und *cyp51B* in *ΔoshA-ΔoshE*

Die Ergosterolbiosynthese erfolgt in der Zelle im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Das Ergosterol wurde über mehrere Stufen aus dem Vorläufer Lanosterol synthetisiert (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2012; Schulz & Prinz, 2007). An dieser Biosynthese ist das Enzyme Lanosterol 14- α -Demethylase, auch bekannt als Cytochrom P450, involviert und wird in *Aspergillus fumigatus* durch die beiden Gene *cyp51A* und *cyp51B* codiert (Buied *et al.*, 2013; Mellado *et al.*, 2005). Das Enzym 14- α -Demethylase ist ein bekanntes Ziel für Azol-Antimykotika (Vermeulen *et al.*, 2013), welche an das Enzym binden. Die Gene *cyp51A* und *cyp51B* sind in allen *Aspergillus spp.* Arten konserviert (Blosser & Cramer, 2012; Mellado *et al.*, 2001), so auch in *A. nidulans* (*cyp51A*: AN1901, *cyp51B*: AN8283). Aufgrund der Voriconazolanfälligkeit beziehungsweise -resistenz der *osh*-Deletionsstämme wurde die Expression der Gene *cyp51A* und *cyp51B* in den *osh*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Zur Überprüfung der Expression der Gene *cyp51A* und *cyp51B* im Wildtyp und in den Deletionsstämmen *oshA-E* wurde die gleiche RNA verwendet, welche für die Expression der Gene *oshA-E* genutzt wurde. Die Expression der beiden Enzyme wurden mittels quantitativer Real-time-PCR ermittelt. Hierfür wurde das Haushaltsgen Histon H2B verwendet. Die Primer für die Gene *cyp51A* und *cyp51B* sowie *H2B* sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die relative Expression wurde anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt.

Die relative Expression der Gene *cyp51A* und *cyp51B* wurde im Wildtyp und den Deletionsstämmen *oshA-E* analysiert (Abbildung 58). Die beiden Gene zeigten im Wildtyp eine unterschiedlich starke Expression. Das Gen *cyp51A* wurde stärker exprimiert als das *cyp51B*-Gen. In der *oshA*- und *oshC*-Deletionsmutante konnte eine signifikante Expressionsänderung des Gens *cyp51A* ermittelt werden, welche dreifach höher als beim Wildtyp war. In den beiden Deletionsmutanten *oshD* und *oshE* wurde eine signifikant höhere Expression mit dem 1,5-fachen Wert des Wildtyps analysiert. Das *cyp51B*-Gen wurde im Wildtyp und den Deletionsmutanten *oshA* und *oshB* ähnlich stark exprimiert. Eine signifikant höhere Expression des *cyp51B*-Gens konnte bei den *oshD* und *oshE*-Deletionsmutanten festgestellt werden. In der Deletionsmutanten *oshD* wurde eine dreifach höhere Expression und in der *oshE*-Deletionsmutanten eine 2,4-fach höhere Expression gemessen. Eine schwache Expression des Gens konnte bei der Deletionsmutante *oshC* festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine veränderte Expression der beiden Gene *cyp51A* und *cyp51B* in der

Ergosterolbiosynthese hin, was möglicherweise Auswirkungen auf die Ergosterolproduktion haben könnte.

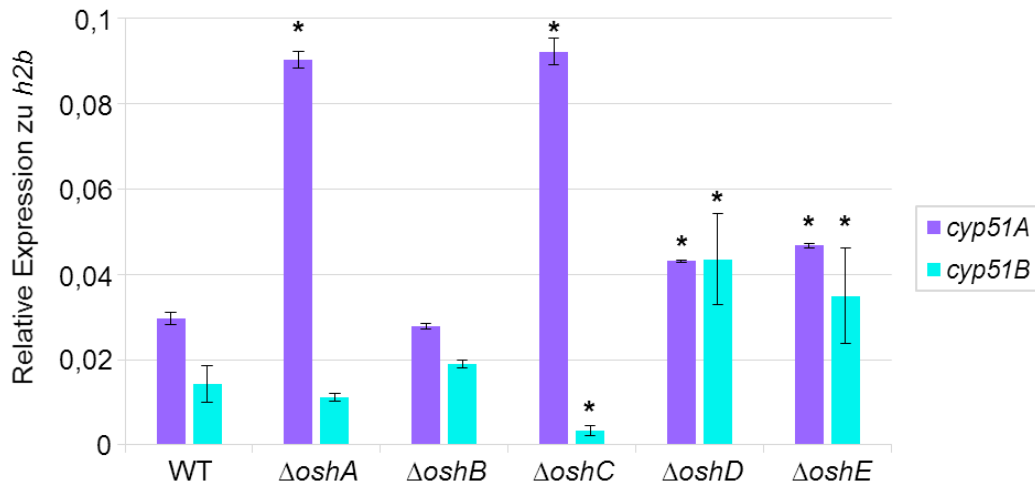


Abbildung 58: Relative Expression der Gene *cyp51A* und *cyp51B* im Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen anhand der quantitativen RT-PCR. Messungen der Expressionen von *cyp51A* und *cyp51B* im Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen wurde jeweils mit drei biologischen und drei technischen Replikaten des Wildtyps und der *osh*-Mutanten durchgeführt. In flüssigem MM mit entsprechenden Auxotrophiemarkern wurden die Stämme angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Jeweils 100 ng RNA wurden für die qRT-PCR eingesetzt. Als Template wurden jeweils 100-150 bp große Stücke in den Exons der Gene gewählt. Die relative Expression erfolgte zu dem Haushaltsgen Histon H2B. Die Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz ($p < 0,05$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

3.9 Verschiedene Wachstumstest der Deletionsstämmen *oshA-E*

3.9.1 Temperaturstress der Deletionsstämmen *oshA-E* bei 42 °C

Verschiedene Temperaturen können das Wachstum von Pilzen stark beeinträchtigen. Hier sollte das Wachstumsverhalten der Deletionsstämmen *oshA-E* und des Wildtypstammes bei drei verschiedenen Temperaturen getestet werden. Dafür wurde für jeden Stamm $2,5 \cdot 10^4$ Sporen in 10 μ l auf MM Platten mit den entsprechenden Auxotrophiemarkern getropft und für drei Tage bei 28 °C, 37 °C und 42 °C inkubiert. Das Wachstum wurde durch das Abfotografieren und die Bestimmung des Koloniedurchmessers dokumentiert.

Bei der Analyse der einzelnen Temperaturen wurde bei 28 °C eine veränderte Konidiosporenfärbung beobachtet. Die Koloniefarben des Wildtypstammes und des $\Delta oshA$ -Deletionsstammes zeigten eine leichte bis starke grüne Färbung der Konidiosporen, wohingegen die Kolonien der anderen Deletionsstämmen *oshB-E* eine braune bis weiße Färbung aufwiesen. Dies deutete auf eine Reduktion bzw. eine

langsamere Konidiosporenproduktion hin (Abbildung 59 A). Bei allen Stämmen wurde außerdem weißes Myzel festgestellt. Die Kolonien der Deletionsstämmen *oshB* und *oshD* zeigten ein kompakteres Wachstum, wohingegen Δ *oshC* mehr Luftmyzel aufwies (Abbildung 59 A). Bei der Bestimmung des Durchmessers konnte ein gleiches Wachstum des Δ *oshA*-Stammes, des Wildtyps sowie Δ *oshE* und eine Wachstumsreduktion von 3 % festgestellt werden. Die Deletionsstämmen *oshB*, *oshC* und *oshD* wiesen eine Wachstumsreduktion von 25 %, 26% und 40 % auf (Abbildung 59 B).

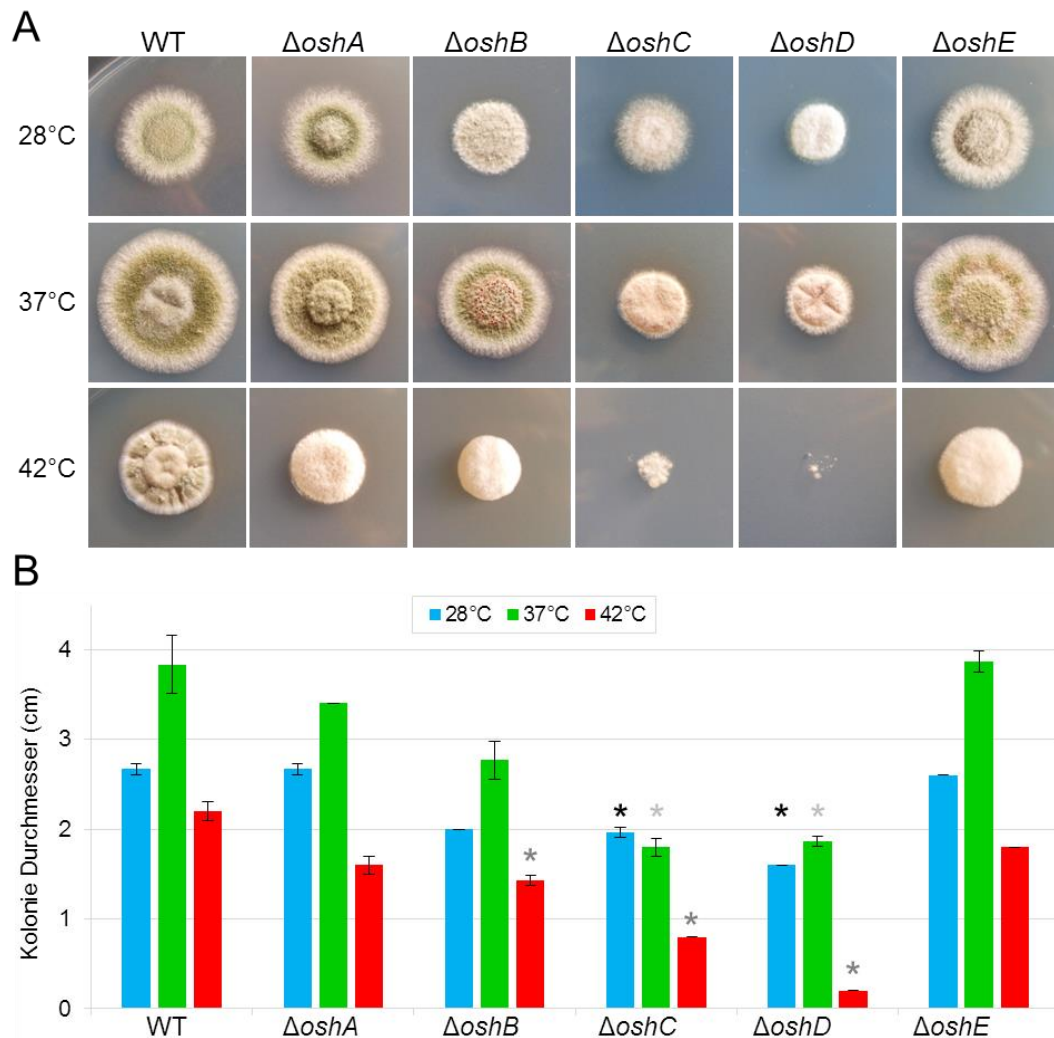


Abbildung 59: Temperaturwachstumstest mit dem Wildtyp und den Deletionsstämmen *oshA-E* bei 28°, 37°C und 42°C. (A) Phänotypen des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstämmen bei verschiedenen Temperaturen. Von oben nach unten sind die verschiedenen Temperaturen abgebildet. (B) Koloniedurchmesser des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstämmen bei verschiedenen Temperaturen nach drei Tagen Inkubation. Schwarze, dunkelgraue und hellgraue Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz ($p < 0,01$) hin. Die signifikanten Kolonien von 28 °C wurden mit einem schwarzen Sternchen markiert. Die signifikanten Kolonien von 37 °C wurden mit einem hellen Sternchen und die signifikanten Kolonien von 42 °C mit einem dunkelgrauen Sternchen angezeigt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$). Jeweils $2,5 \cdot 10^4$ Sporen/10 μ l Sporensuspension der Stämme wurden auf Platte punktinokuliert und bei 28 °C, 37 °C und 42 °C für drei Tagen inkubiert.

Die Färbung der Kolonien bei der 37 °C Inkubation zeigten bei $\Delta oshA$ und $\Delta oshB$ eine grüne Färbung der Konidiosporen, sowie eine grün-braune Färbung bei $\Delta oshE$. Braune kompakte Kolonien wurden bei $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ beobachtet, was auf eine Reduktion oder eine langsamere Konidiosporenproduktion hinwies (Abbildung 59 A). Der Deletionsstamm $\Delta oshA$ wuchs 11 % langsamer als der Wildtyp, wohingegen $\Delta oshB$ im Vergleich 28 % langsamer wuchs. Die beiden Deletionsstämme $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ wiesen auch hier wieder eine Reduktion von 53 % bzw. 50 % auf. Der $\Delta oshE$ Stamm zeigte das gleiche Wachstum wie der Wildtyp (Abbildung 59).

Die größte Stressreaktion wurde bei der Temperatur von 42 °C festgestellt (Abbildung 59 A, B). Der Wildtyp konnte bei dieser Temperatur nur noch wenige grüne Konidiosporen produzieren und wuchs im Vergleich zu den beiden anderen Temperaturen kompakter. Die Deletionsstämme *oshA-E* wiesen eine braune bis weiße Färbung auf und wenn sie wuchsen, wuchsen sie auch kompakter (Abbildung 59 A). Das Wachstumsverhalten von $\Delta oshA$ zeigte hier eine 27 %-ige Reduktion auf. Die *oshB*-Deletionsmutante wuchs 35 % langsamer. $\Delta oshC$ zeigte bei dieser Temperatur eine Reduktion des Wachstums von 64 % auf. Dies ist im Vergleich zu den 37 °C eine 11 %-ige Wachstumsreduktion. Eine drastische Reduktion des Wachstums von 91 % konnte bei der *oshD*-Deletionsmutante festgestellt werden, was einer Reduktion von 41 % im Vergleich zu den Werten bei 37 °C entspricht. Ein besseres Wachstum bei dieser Temperatur zeigte die *oshE*-Deletionsmutante mit nur einem geringem Wachstum von 18 % im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 59 B).

Beim Vergleich des Wachstums der Stämme bei unterschiedlichen Temperaturen (28 °C – 42 °C) fiel auf, dass sowohl der Wildtypstamm als auch die Deletionsstämme *oshA-E* bei 37 °C insgesamt am besten wuchs (Abbildung 59 A, B). Alle Deletionsstämme sowie der Wildtyp reagierten sensitiv auf die Temperatur von 42 °C. Überraschend war das Wachstumsverhalten von $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$. Der Deletionsstamm *oshC* wuchs bei 28 °C um 9 % schneller als bei 37°C und um 41 % langsamer bei 42 °C. Der Deletionsstamm $\Delta oshD$ reagierte wesentlich sensitiver auf die 42 °C als die restlichen Deletionsstämme (Abbildung 59 B).

3.9.2 Keine Wachstumsveränderung von $\Delta oshA-E$ auf Glukose-, Glycerin- und Threoninmedium

Die Phänotypen (Abbildung 60), das Wachstum des Wildtyps (Abbildung 61) und der *osh*-Deletionsstämme wurden auf Glukose-, Glycerin- und Threoninmedien untersucht. Auf Glukosemedium wurde im Vergleich zum Wildtyp bei den Deletionsstämmen *oshB-E* eine braune Färbung der Sporen beobachtet (Abbildung 60, oben). Die Deletionsmutante *oshA* zeigte eine grüne Sporenfärbung wie der Wildtyp auf. Die Wuchsform von $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ war kompakter als beim Wildtyp. Auf Glycerinmedium wiesen $\Delta oshA$ und $\Delta oshB$ die gleiche Sporenfärbung wie der Wildtyp auf (Abbildung 60, Mitte). $\Delta oshB$, $\Delta oshC$ und $\Delta oshE$ zeigten auch hier braun gefärbte Sporen. Die Wuchsform von $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ auf Glycerinmedium ist im Vergleich

zum Wildtyp kompakter. Auf Threoninmedium wurden grün gefärbte Sporen bei $\Delta oshA$, $\Delta oshB$ und $\Delta oshE$ wie beim Wildtyp festgestellt (Abbildung 60, unten). Die beiden Deletionsstämme $oshC$ und $oshD$ bildeten hingegen weiße Sporen und kompaktere Kolonien. Die Deletionsstämme $\Delta oshA$, $\Delta oshB$ und $\Delta oshE$ wiesen kein so dichtes Myzel wie der Wildtyp auf.

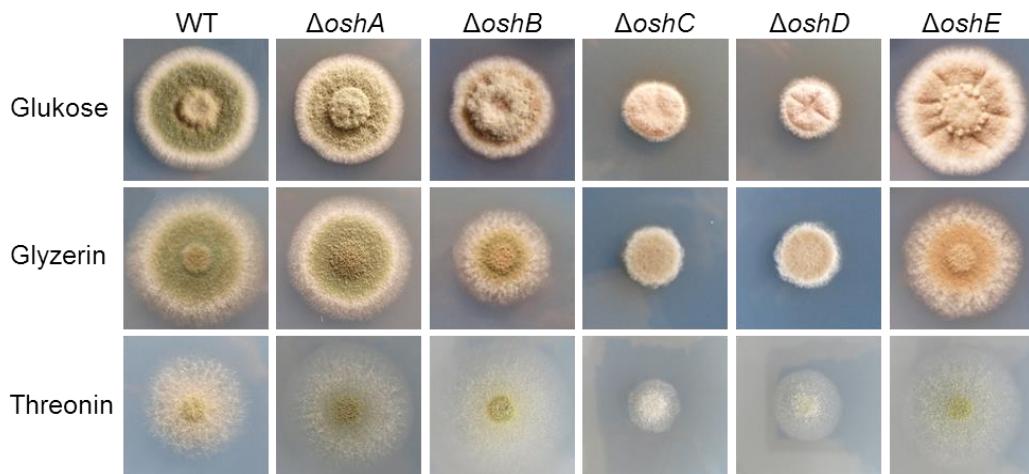


Abbildung 60: Phänotypen des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstämmen auf Glukose-, Glyzerin- und Threoninmedien. Der Wildtyp und die *osh*-Deletionsstämmen sind von links nach rechts abgebildet und die verschiedenen Medien von oben nach unten. Es wurden jeweils 10 μ l einer Sporensuspension mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen pro Platte bei 37 °C punktinokuliert und 3 Tage inkubiert.

Der Koloniedurchmesser auf Glukose und Glyzerin zeigte bei den Deletionsstämmen *oshB-D* einen Wachstumsverzug in Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 61). Die beiden Mutanten *oshA* und *oshE* zeigten auf dem Glukosemedium einen ähnlichen Koloniedurchmesser wie der Wildtyp, wohingegen auf dem Glyzerinmedium kleinere Kolonien wuchsen. Ein stärkeres Wachstum wurde bei den Deletionsstämmen *oshA*, *oshB*, und *oshE* auf dem Threoninmedium im Vergleich zum Wildtyp verzeichnet.

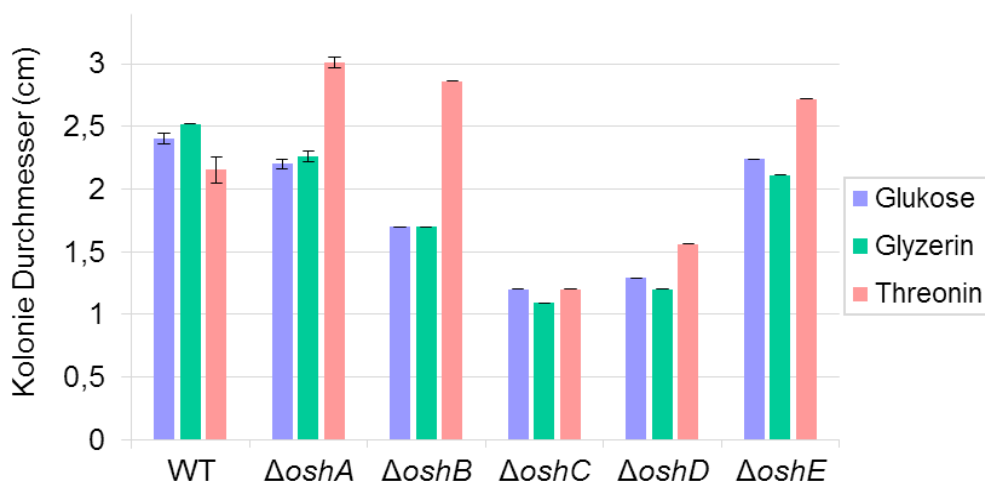


Abbildung 61: Koloniedurchmesser in cm des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstämmen auf Glukose- (lila), Glyzerin- (grün) und Threoninmedien (rosa). Die Platten wurden mit

einer Sporendichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen/10 μ l Sporensuspension punktinokuliert und für drei Tage bei 37 °C inkubiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$).

3.9.3 Zellyse an den Hyphenspitzen bei verschiedenen CFW-Konzentrationen bei $\Delta oshA-E$

Der Deletionsstamm *oshD* wies bei der Untersuchung der Hyphenmorphologie zum Teil Hyphen auf, welche an der Spitze geschwollen oder auch schon ausgelaufen waren. Durch die Verwendung des Zellwandstressfaktors Calcofluor White (CFW), welches unter anderem an Chitin in der Zellwand bindet (Maeda & Ishida, 1967), sollte Aufschluss über eine mögliche Zellwandveränderung in den *osh*-Deletionsmutanten geben. Dafür wurden MM Agarplatten mit unterschiedlichen CFW-Konzentrationen von 10 – 100 μ M verwendet. Auf jede Platte wurden 10 μ l einer Sporensuspension mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen punktinokuliert und für drei Tage bei 37 °C inkubiert, um im Anschluss den Koloniedurchmesser zu bestimmen.

Die *osh*-Deletionsstämme sowie der Wildtyp wiesen bei den verschiedenen CFW Konzentrationen (10 – 100 μ M) keine eindeutige Sensitivität auf (Abbildung 62 A). Die CFW-Konzentration von 10 μ M beeinträchtigte das Wachstum von $\Delta oshA$ lediglich um 4%, während beim Wildtyp und den restlichen Deletionsmutanten ein ungefährer Wachstumsrückgang von 20% festgestellt werden konnte (Abbildung 62 B). Auffallend beim Wildtyp sowie der *oshA*- und *oshE*-Mutante war jedoch ein Wachstumsrückgang von ungefähr 50% bei einer CFW-Konzentration von 25 μ M im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Platte. Das Wachstum von $\Delta oshB$, $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ zeigte bei der 25 μ M Konzentration eine Wachstumsbeeinträchtigung von ungefähr 25 %. Bei den 50 und 100 μ M CFW-Konzentrationen waren die Koloniedurchmesser des Wildtyps sowie der *osh*-Deletionsstämme in etwa gleich. Bei den 25 – 100 μ M Konzentrationen wiesen alle Kolonien ein kompakteres Aussehen auf (Abbildung 62 A). Der Wildtyp sowie die drei Deletionsmutanten *oshA*, *oshB* und *oshE* zeigten um ihre Kolonien jeweils eine schwache Verfärbung des Mediums bei den Konzentrationen von 50 und 100 μ M auf (Abbildung 62 A, Pfeile). Bei den beiden Mutanten *oshB* und *oshE* konnte diese Verfärbung auch bei 25 μ M festgestellt werden.

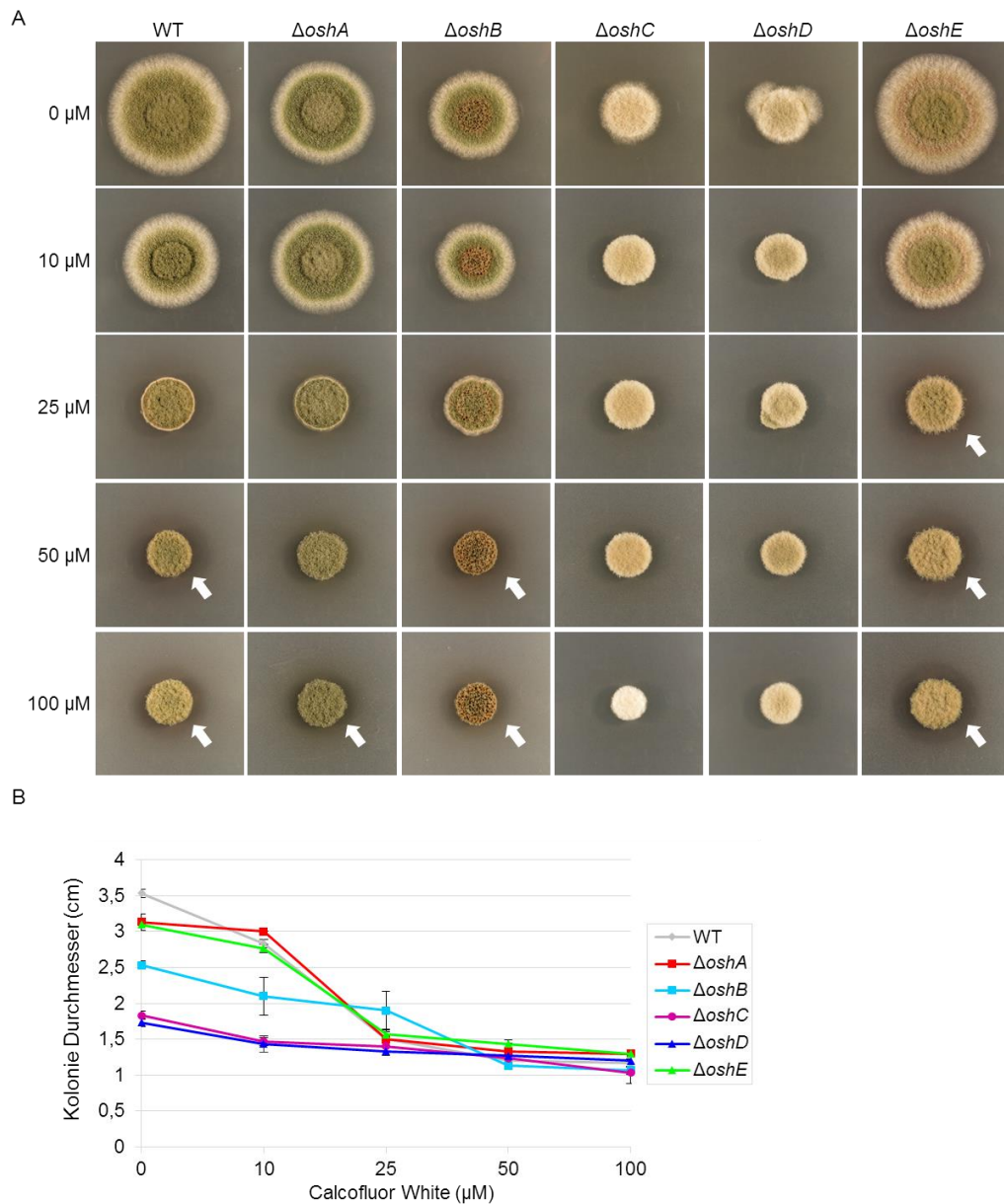


Abbildung 62: Calcofluor White (CFW) Assay mit verschiedenen CFW-Konzentrationen (0- 100 μM) vom Wildtyp und den $\DeltaoshA-E$ Stämmen. (A) Bilder des Koloniewachstums des Wildtyps sowie der *osh*-Deletionsstämmen mit den unterschiedlichen CFW-Konzentrationen (oben nach unten). Die Pfeile markieren Verfärbung des Mediums. (B) Koloniedurchmesser der *osh*-Mutanten und des Wildtyps in Abhängigkeit der CFW-Konzentration (0-100 μM). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 3$). Die Platten wurden mit einer Sporendichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen/10 μl Sporensuspension auf Platten mit verschiedenen CFW-Konzentrationen punktinokuliert und für drei Tage bei 37 °C inkubiert.

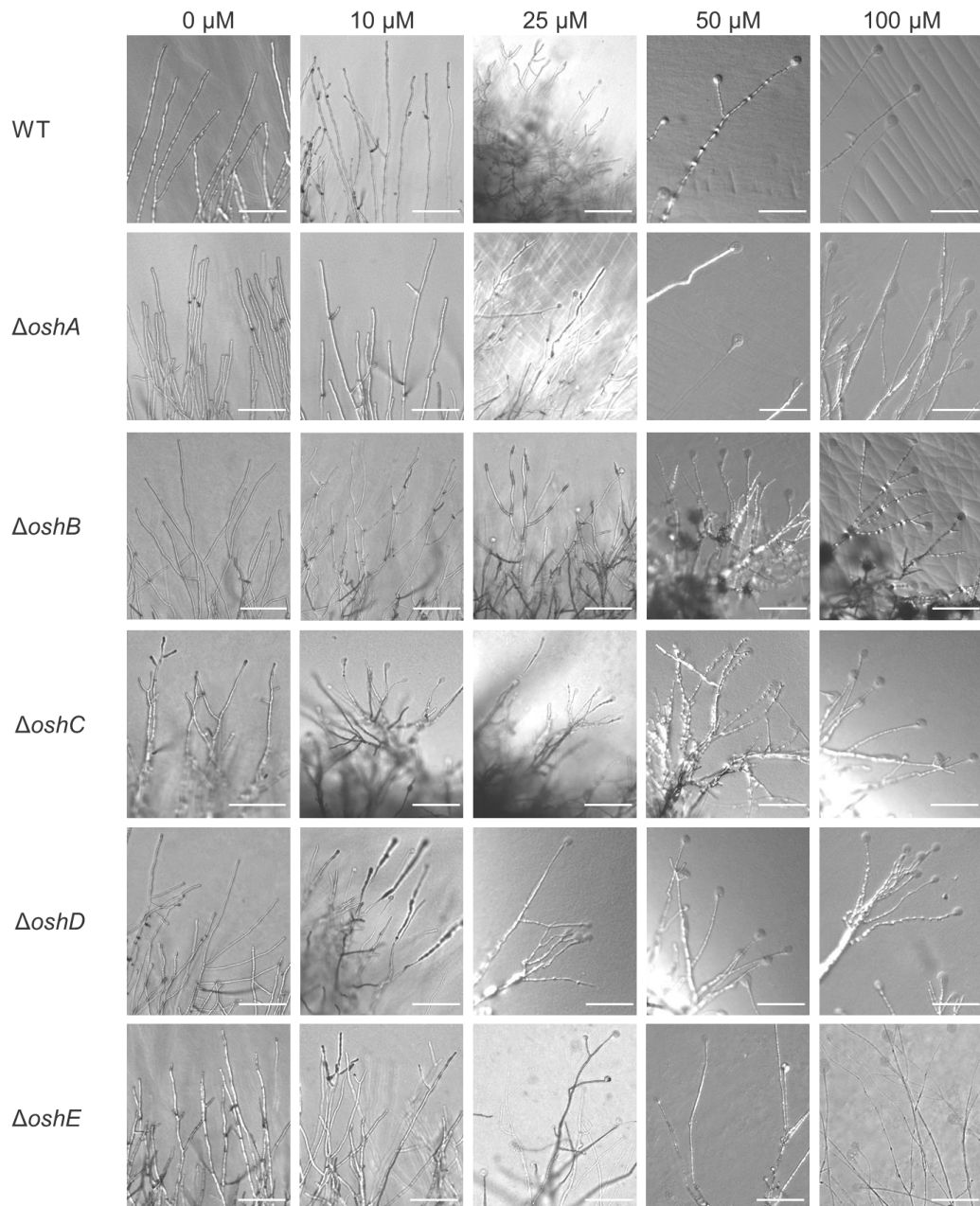


Abbildung 63: Phänotypen der *osh*-Deletionsstämmen und des Wildtyps auf Calcofluor White (CFW)-Agarplatten mit Konzentrationen von 0-100 μM . Die unterschiedlichen CFW-Konzentrationen sind von links nach rechts sowie die Stämme von oben nach unten abgebildet. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden im DIC (*Differential Interference Contrast*)-Kanal aufgenommen. Es wurden 10 μl einer Sporensuspension mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen auf den CFW Platten punktinokuliert und für drei Tage bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Maßstabbalken: 100 μm

Die CFW-Platten mit den *osh*-Deletionsstämmen und dem Wildtyp wurden zusätzlich mikroskopisch untersucht, um festzustellen ob bei den verschiedenen Konzentrationen eine Zell-Lyse an den Hyphenspitzen vorhanden war. Der Wildtyp, ΔoshA , ΔoshB und ΔoshE wiesen bei der 10 μM CFW-Konzentration keine ausgelaufenen Hyphenspitzen auf (Abbildung 63). Allerdings konnten ab einer Konzentration von 25 μM zum Teil geschwollene und auslaufende Hyphenspitzen beobachtet werden, wohingegen

lysierte Spitzen bei höherer CFW-Konzentration vermehrt vorhanden waren (Abbildung 64). Die beiden Deletionsstämme *oshC* und *oshD* wiesen bei der 10 μM CFW-Konzentration geschwollene und ausgelaufene Hyphenspitzen auf (Abbildung 63), die bei den höheren CFW-Konzentrationen ebenso vermehrt auftraten (Abbildung 64).

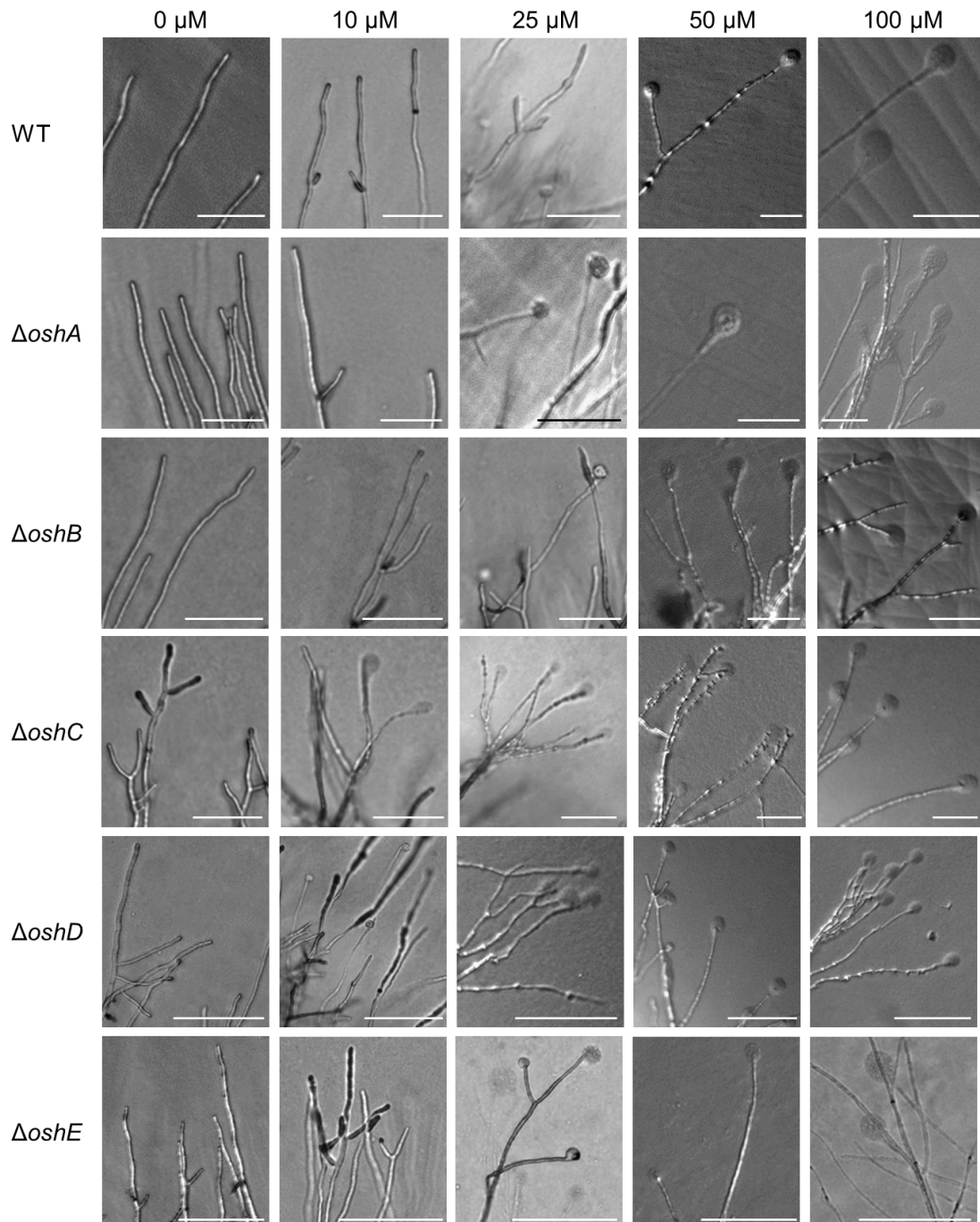


Abbildung 64: Ausschnittsvergrößerungen der Phänotypen der *osh*-Deletionsstämme und des Wildtyps auf Calcofluor White (CFW)-Agarplatten mit Konzentrationen von 0-100 μM . Von oben nach unten sind die Aufnahmen der Stämme und von links nach rechts die unterschiedlichen CFW-Konzentrationen zu sehen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden im DIC (*Differential Interference Contrast*)-Kanal aufgenommen. Es wurden $2,5 \cdot 10^4$ Sporen/10 μl Sporensuspension auf den CFW Platten angeimpft und für drei Tage bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Maßstabbalken: 50 μm

3.10 Keine signifikanten Veränderungen in den SRDs und den Zellendmarker der *osh*-Deletionsstämmen

Sterolreiche Domänen (SRDs) wurden in filamentösen Pilzen an der Hyphenspitze oder an Septen lokalisiert (Alvarez *et al.*, 2007; Takeshita *et al.*, 2012). SRDs können durch die Färbung mit Filipin, welches an Sterol bindet, sichtbar gemacht werden (Alvarez *et al.*, 2007; Pearson *et al.*, 2004; Takeshita *et al.*, 2008). Ob die Osh-Proteine bei der Bildung der apikalen SRD eine Rolle spielen wurde hier durch die Färbung mit Filipin untersucht. Dafür wurden der Wildtyp und die *osh*-Deletionsstämmen auf Deckgläschen mit entsprechendem Medium angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Um die SRDs sichtbar zu machen, wurden die Hyphen für 5 min mit 1 µl Filipin (Stocklösung 10 mg/ml) inkubiert und mikroskopiert. Das Anregen des Filipins erfolgte bei einer Wellenlänge von 353 nm für eine Sekunde.

Im Wildtyp und den Deletionsstämmen *oshA-oshE* wurden die Signale des Filipins und somit die SRDs an den Hyphenspitzen lokalisiert (Abbildung 65 A). Zusätzlich zeigten die Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* mehr Verzweigungen als der Wildtyp. Weiter wurden die Filipin Signale der SRDs im subapikalen Bereich an neu entstehenden Verzweigungsbereichen (Abbildung 65 B, Pfeile), sowie an Septen (Abbildung 65 B, Sternchen) lokalisiert.

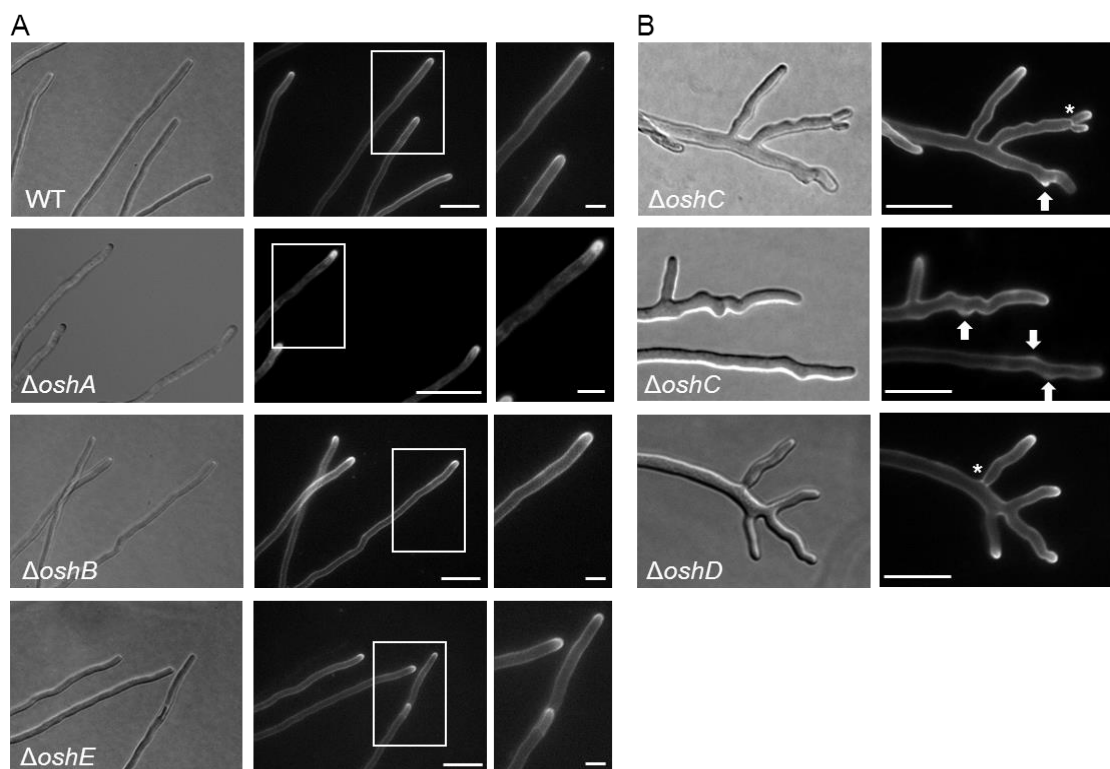


Abbildung 65: Sterolreiche Domänen (SRDs) des Wildtyps und der *osh*-Deletionsstämmen anhand einer Filipinfärbung. (A) Hyphenwachstum und SRD an der Hyphenspitze im Wildtyp und den Deletionsmutanten *oshA-E*. Die linken Bilder zeigen die DIC (*Differential Interference Contrast*)-Aufnahmen der Hyphen und in der Mitte die Aufnahmen der Hyphen mit den SRD Signalen an den Hyphenspitzen anhand der Filipinfärbung. Die Rahmen zeigen die Fläche der rechts nebenstehenden Ausschnittsvergrößerungen. (B) SRD Signale (rechtes) an den Spitzen

in den stärker verzweigten Hyphen von $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$, sowie neue Verzweigungsseiten im subapikalen Bereich (Pfeile) und an den Septen (Sternchen). Links sind die DIC-Aufnahmen abgebildet. Es wurden Sporen auf Platten mittels Zahnstocher angeimpft und für zwei Tage bei 37 °C wachsen gelassen. Die Hyphen wurden mit dem Filipin (1 µg/ml) fünf Minuten inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit dem DAPI-Kanal (Anregung mit 353 nm; Emission von 465 nm) mit der gleichen Signalstärke und der gleichen Belichtungszeit (eine Sek.) aufgenommen. Maßstab Balken: 20 µm, Ausschnitt: 5 µm.

Die Messung der SRD-Signalintensität und der SRD-Länge wurden mittels Bildaufnahmen und mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet (Schindelin *et al.*, 2012).

Die SRD-Signalintensität, die durch die Bestrahlung mit UV-Licht und der Färbung mit Filipin entstand, wurde im Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen gemessen (Abbildung 66 A). Die Deletionsmutanten *oshB*, *oshC* und *oshD* wiesen ungefähr die gleiche Signalintensität auf wie der Wildtyp. Ein signifikanter Unterschied in der Signalstärke wurde bei $\Delta oshE$ gemessen, welche um ca. 30 % geringer war.

Die SRD-Länge in $\Delta oshE$ zum Wildtyp war im Schnitt um 5% kürzer (Abbildung 66 B). In den Deletionsmutanten *oshA* und *oshD* waren die SRD-Längen um 34 % bzw. 37 % kürzer als im Wildtyp. In den beiden Mutanten *oshB* und *oshC* konnten um 23 % bzw. 17 % kürze SRDs gemessen werden.

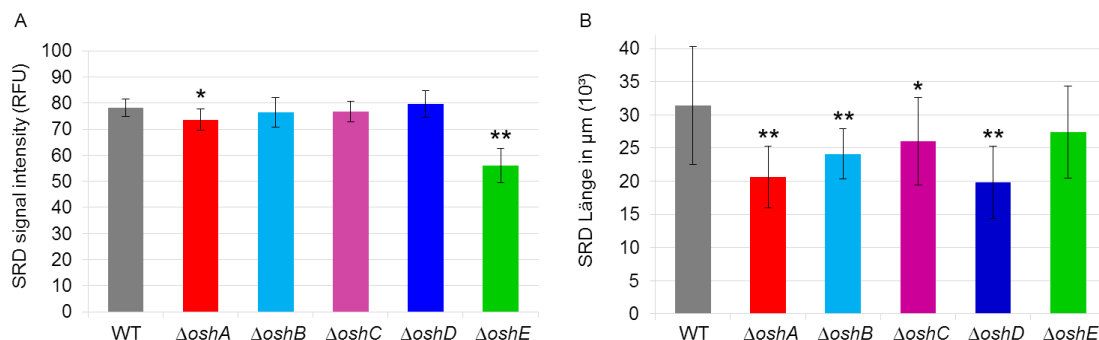


Abbildung 66: Messung der SRD-Signalintensität in RFU (Relative Fluorescence Unit) und der SRD-Länge in µm im Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen. (A) SRD Signalintensität vom Wildtyp und $\Delta oshA-E$. Die Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 20$). (B) Die SRD-Länge der Deletionsmutanten *oshA-E* und die des Wildtyps. Die Sternchen weisen auf die statistische Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) hin. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler ($n = 20$). Für beide Auswertungen wurden mittels Zahnstocher Sporen auf Platte angeimpft und für zwei Tage bei 37 °C wachsen gelassen. Das Filipin (1 µg/ml) wurde zu den Hyphen gegeben und fünf Minuten inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit dem DAPI-Kanal (Anregung mit 353 nm; Emission von 465 nm) mit der gleichen Signalstärke und Belichtungszeit (eine Sekunde) aufgenommen. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte anhand des Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

Die SRDs sind für die Lokalisation der Zellendmarker TeaA und TeaR wichtig (Takeshita *et al.*, 2008; Takeshita *et al.*, 2012). Der Zellendmarker TeaA wird über Mikrotubuli-Plusenden zu der Hyphenspitze transportiert und ist an der apikalen

Plasmamembran durch die Interaktion mit TeaR verankert (Takeshita *et al.*, 2008). Die Lokalisation beider Proteine wurde in den *osh*-Deletionsstämmen und im Wildtyp untersucht.

Die *osh*-Deletionsstämmen wurden mit einem Stamm gekreuzt, der die beiden Zellendmarker TeaA und TeaR unter dem natürlichen Promotor exprimiert. Der Zellendmarker TeaA war mit dem Fluoreszenzprotein mRFP und TeaR mit dem Fluoreszenz-Protein GFP fusioniert.

Im Wildtypstamm sowie den Deletionsstämmen *oshA* und *oshE* wurden die Signale von mRFP-TeaA und GFP-TeaR an der Hyphenspitze lokalisiert (Abbildung 67). Diese Lokalisierung wurde auch bei den Deletionsstämmen *oshC* und *oshD* beobachtet, zusätzlich wiesen diese Mutanten noch eine Lokalisation des GFP-TeaR-Signals in den subapikalen Regionen auf, an welchen neue Verzweigungen entstehen könnten. Der Deletionsstamm *oshB* mit GFP-TeaR und mRFP-TeaA konnte während dieser Arbeit nicht generiert werden.

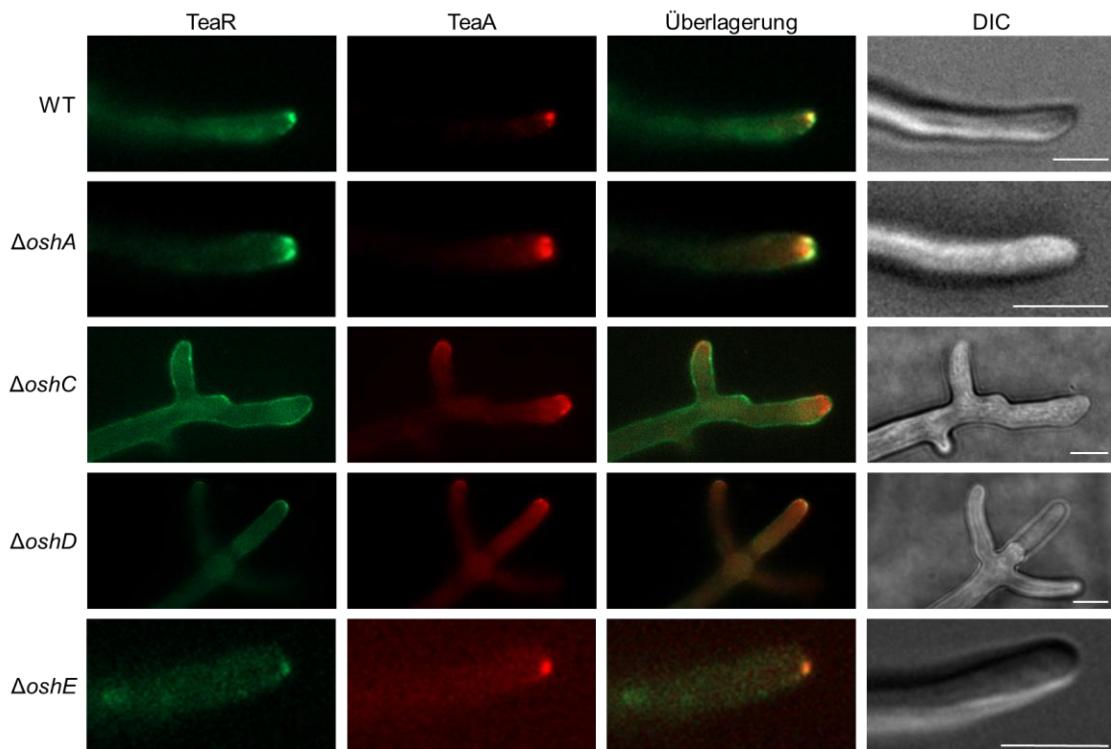


Abbildung 67: Lokalisation der Zellendmarker GFP-TeaR und mRFP-TeaA im Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen. In der ersten Spalte von links sind die mikroskopischen Aufnahmen von GFP-TeaR, in der zweiten Spalte von mRFP-TeaA, in der dritten Spalte sind die Überlagerungen beider Aufnahmen von TeaR und TeaA sowie die Aufnahmen in der vierten Spalte (rechts) des DIC (*Differential Interference Contrast*)-Kanals vom Wildtyp und den *osh*-Deletionsstämmen abgebildet. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden die Platten mit inokulierten Sporen, welche mit einem Zahnstocher angeimpft wurde, für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Maßstabbalken: 5 μ m

4 Diskussion

Polarität ist für das Wachstum einer Zelle eine bedeutende Eigenschaft, so auch in filamentösen Pilzen, in denen das Wachstum hauptsächlich an der Hyphenspitze abläuft (Riquelme *et al.*, 2011; Riquelme, 2013; Takeshita *et al.*, 2014).

An den Hyphenspitzen befinden sich die einzigartigen sterolreichen Domänen (SRDs), die bisher nur in Pilzen beschrieben wurden (Alvarez *et al.*, 2007). Sie sind in *Aspergillus nidulans* für die Positionierung der Zellenmarker TeaA und TeaR und dadurch für das polare Wachstum wichtig (Takeshita *et al.*, 2008). Wie die SRDs entstehen, ihre genaue Funktion und wie das Ergosterol an die Hyphenspitze gelangt, ist in Bezug auf filamentöse Pilze unbekannt. Um diese Mechanismen für das polare Wachstum besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit fünf homologe oxysterolbinde Proteine (OshA-E; *oxysterol-binding protein homologous*) in dem filamentösen Pilz *A. nidulans* untersucht. Diese fünf Osh-Proteine wurden mit GFP fusioniert und zeigten in der Hyphe unterschiedliche Lokalisierungen. OshA co-lokalisiert mit dem *late*-Golgi-Marker TlgB, OshB und OshE wurden am ER detektiert, OshC und OshD lokalisierten im Zytoplasma. So wurde OshC in einzelnen Hyphen an der Hyphenspitze gefunden. Von den generierten Deletionsstämmen *oshA-E* wiesen $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ Wachstumsdefekte und mehr Hyphenverzweigungen als der Wildtyp auf. Die Expressionen der einzelnen *osh*-Gene waren im Wildtyp relativ gleich stark zu beobachten, wohingegen die Expression in den *osh*-Deletionsstämmen unterschiedlich stark waren. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion eines einzelnen *osh*-Gens ein anderes wie beispielsweise *oshD* in $\Delta oshB$ stärker exprimiert wurde. Des Weiteren zeigten die *osh*-Deletionsstämme reduzierte Ergosterolkonzentrationen, verschiedene Sensitivitäten gegenüber ergosterolassozierten Wirkstoffen sowie eine stärkere Expression der Gene *cyp51A* und *cyp51B* auf. Die Deletion von *oshE* verändert teilweise die SRD. Für OshE konnte eine Beteiligung an der Konidiophorentwicklung nachgewiesen werden.

Die Deletion eines einzelnen *osh*-Gens verursacht keine extreme Beeinträchtigung der SRD-Struktur. Die Osh-Proteine sind bei ihrer Beteiligung an der SRD-Bildung und am polaren Wachstum vermutlich mit weiteren Faktoren des polaren Wachstums gekoppelt.

4.1 Transport von Ergosterol an die PM oder Organellen anhand der Proteine OshA-E

Die Lokalisierungen der *A. nidulans*-Proteine OshA-E zeigten in der Hyphe deutliche Unterschiede (Kapitel 3.2). OshA wies eine Co-Lokalisierung mit TlgB, einem *late*-Golgi und einem Endosomenmarker auf. Auffallend war, dass die Co-Lokalisierung hauptsächlich im subapikalen Bereich der Hyphe lag. In den „älteren“ Bereichen der

Hyphe konnte keine Co-Lokalisierung mehr beobachtet werden. Dies könnte aufgrund des Wachstums an der Hyphenspitze erklärt werden, da hier die gelieferten Vesikel mit den Wachstumscomponenten in die Membran eingebaut werden (Riquelme, 2013). Die Lokalisierung der PH-Domäne des Hefe Osh1-Proteins, welches primär an der Membran des *late*-Golgi-Netzwerks und an den frühen Endosomen (EE) beobachtet wurde (Abbildung 68), konnte in Hefe bereits nachgewiesen werden (Levine & Munro, 2001). PH-Domänen binden Phosphoinositole (PI) und geben dem Protein dadurch die Vorgabe an alle Membranen, außer an das ER (Oikkonen & Li, 2013), zu binden. Eine neue Studie zeigt, dass das Hefeprotein Osh4p *in vitro* Ergosterol und PI4P anhand eines Sterol/PI4P Gradienten zu zwei unterschiedlichen Membranen in entgegengesetzte Richtungen transportiert (Moser von Filseck *et al.*, 2015b).

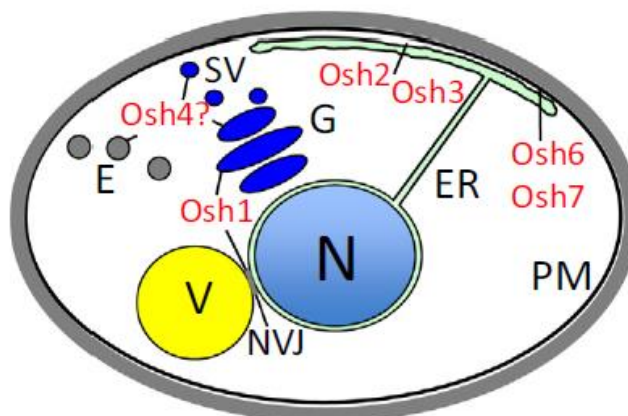


Abbildung 68: Funktionsorte der *S. cerevisiae* Proteine Osh1-7 (rot). Interaktion von Osh1-7 an Organellen oder MCS (*membrane contact sites*) wie NVJ und ER mit PM.

E: Endosomen; ER: Endoplasmatisches Retikulum (mint) G: Golgi; N: Nucleus (Zellkern); NVJ: Zellkern-Vakuolen-Verbindung (*nucleus-vacuole junction*); SV: sekretorische Vesikel; V: Vakuole (gelb); (Oikkonen & Li, 2013)

OshA könnte somit eine mögliche Funktion im Sterol/PI4P-Austausch zwischen dem ER und dem Golgi an den MCS besitzen (Abbildung 69). Ergosterol wird im ER gefertigt, könnte über OshA extrahiert und zum Golgi anhand eines Sterolgradienten transportiert werden. Das ER besitzt wenig Sterol (5 mol% der Lipide) und sowohl der *trans*-Golgi als auch die Plasmamembran haben einen Sterolanteil von 30-40 mol% (Holthuis & Menon, 2014). Somit wäre ein Transport des Sterols anhand von OshA, wie folgt, möglich. Das Ergosterol wird am Golgi durch den Austausch mit PI4P freigegeben. PI4P wird im Golgi durch die Phosphoinositol-4-kinase Pik1p unter ATP-Verbrauch aus PI phosphoryliert und treibt den Sterol/PI4P-Zyklus an (Moser von Filseck *et al.*, 2014). Das PI4P wird durch einen PI4P-Gradienten zum ER transportiert und dort freigegeben. Die Phosphatase Sac1p hydrolysiert PI4P zu PI, was einen neuen Sterol/PI4P-Zyklus antreibt. Im Golgi entstehen sekretorische Vesikel mit verschiedenen Lipidzusammensetzungen (Johansen *et al.*, 2012), anschließend wird das aufgenommene Ergosterol in die Vesikel eingebaut und zur PM transportiert. Die Vesikel werden über das Mikrotubulizytoskelett und das Motorprotein Kinesin-3 zur

Hyphenspitze transportiert (Zekert & Fischer, 2009). Die Vesikel gelangen über einen noch unbekanntem Mechanismus zum Aktin und werden über Myo II zum Spitzenkörper (SPK) weiter transportiert. Der SPK besteht aus einem äußeren Ring mit Makrovesikeln und einem Inneren mit Mikrovesikeln (Riquelme & Sanchez-Leon, 2014; Schultzhause *et al.*, 2015). Für die Vesikelfusionierung mit der PM werden zusätzlich Komponenten wie der Exozystkomplex, SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins*) oder GTPasen benötigt (Riquelme, 2013). Nach der Fusionierung von Vesikel und Membran ist das Ergosterol in die PM eingebaut und bildet dort die SRD. Um über diese Hypothese der indirekten Funktionsbeteiligung von OshA an der SRD eine genaue Aussage treffen zu können, ist es jedoch notwendig, weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang durchzuführen. Die Durchführung einer Messung des Transports von Ergosterol und PI4P *in vitro* mit dem OshA Protein könnte klären, ob Ergosterol wirklich durch OshA und auch durch eines der anderen Osh-Proteine transportiert werden kann.

Das GFP-OshB-Fusionsprotein berührte am Rande die peripheren ER-Strukturen (Sec63) und könnte somit an der ER-PM MCS eine wichtige Rolle für den Ergosterolaustausch spielen (Abbildung 69). OshB könnte Ergosterol vom ER zur PM anhand eines Sterol/PI4P-Gradientens transportieren. Das Sterol wird zusammen mit der Membran bei der Endozytose für die Vesikel zur Abschnürung im endozytotischen Ring benötigt. In diesem Bereich sind Aktin Patches vorhanden, welche in die Endozytose involviert sein sollen (Lichius *et al.*, 2011). Ein Teil der entstandenen *early endosomes* (EE) wird mit Hilfe des Motorproteins Dynein oder Kinesin-3 über MT in einem retrograden Transport in subapikale Bereiche der Hyphenzelle transportiert (Steinberg, 2014). Die EE konvertieren in *late endosomes* (LE) und diese fusionieren letztendlich mit den Vakuolen zur Degradierung (Abenza *et al.*, 2010). Die EE können nach der Abtrennung je nach Inhalt von der PM zum *late-Golgi* transportiert werden (Schultzhause *et al.*, 2015). Hier wird das Ergosterol vermutlich in neu entstehende Vesikel eingebaut und gelangt über den endozytotischen Signalweg (Abbildung 69, lila Pfeile) zur PM und beteiligt sich an der SRD-Bildung.

Aufgrund anderer noch vorhandener Strukturdomänen von OshB, wie die GOLD und PH-Domänen, wäre eine Lokalisationsuntersuchung von OshB mit anderen Organellen empfehlenswert. Die Golgi-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen mit unbekannter Funktion (Raychaudhuri & Prinz, 2010) und die PH-Domäne bindet alle Membranen außer das ER (Oikkonen & Li, 2013). OshB war am Rande des ER lokalisiert, somit könnte auch hier eine Interaktion von OshB mit dem Golgi möglich sein. Um eine definitive Aussage über einen möglichen Transport von Ergosterolen und Phosphoinositolen (PIs) zwischen ER und Golgi zu treffen, werden weitere Experimente nötig, wie die Lokalisierung von OshB mit dem Golgi oder eine *in vitro* Messung des Ergosterol Transportes zwischen zwei Membranen.

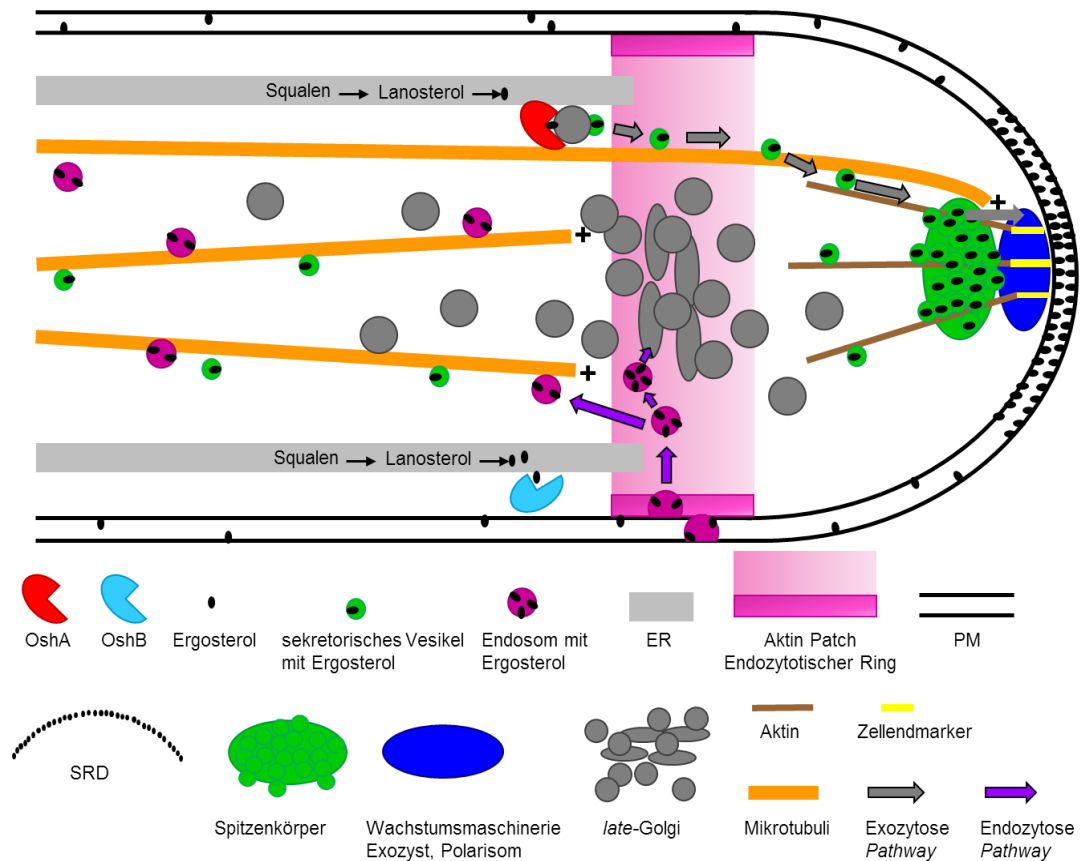


Abbildung 69: Modell des Ergosteroltransports am Beispiel von OshA und OshB. OshA bindet das Ergosterol am ER und transportiert es mittels eines Sterol/PI4P-Gradienten zum Golgi. In die neu entstehenden Vesikel wird das Ergosterol eingebaut, über Mikrotubuli (MT) und Aktin anhand ihrer Motorproteine zum SPK transportiert und fusioniert mit der PM. OshB transportiert das gebundene Ergosterol via Sterol/PI4P-Gradienten zur PM. Das Ergosterol in der PM wird für die Endozytose verwendet. Ein Teil der abgeschnürten Endosomen (EE; *early endosoms*) mit dem enthaltenden Ergosterol wird durch Fusionierung mit sekretorischen Vesikeln zum *late-Golgi* transportiert werden. Nach der Verschmelzung mit dem *late-Golgi* werden die neu entstandenen sekretorischen Vesikel mit Ergosterol über MT sowie Aktin via Motorproteine zur PM transportiert und fusionieren dort. Ein anderer Teil der EE wird über MT durch Dynein oder Kinesin-3 zu Vakuolen transportiert, welche anschließend dort degradiert werden.

Cholesterin kann sich via der lateralen Diffusion und des Flip-Flop-Mechanismus, welcher auch als transversale Diffusion bekannt ist, zwischen einer Membrandoppelschicht bewegen (Bennett *et al.*, 2009). Somit könnte Ergosterol anhand der beiden Mechanismen zur Hyphenspitze gelangen, jedoch mit einem wesentlich geringen Anteil und viel langsamer als über den nicht-vesikulären Transport.

OshC zeigte sowohl im Zytoplasma als auch in einigen Hyphen im apikalen Bereich der Hyphenspitze Fluoreszenzsignale. Die Lokalisierung von Osh4 in Hefe, welches im Stammbaum in der gleichen Gruppe wie OshC befindet, wurde in Zytoplasma, im Golgi und in exozytotischen Vesikeln beobachtet (Abbildung 68) (Alfaro *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2002). Aufgrund der Lokalisierung von GFP-OshC und der Größe des Signals könnte

eine Ansammlung exozytotischer Vesikel am Spitzenkörper vorliegen, jedoch sollte dies mit Marken für diese Vesikel genauer untersucht werden. Zusätzlich zur Sterolbindung (Im *et al.*, 2005) konnte für Osh4 eine PI4P-Bindung (de Saint-Jean *et al.*, 2011) nachgewiesen werden. Auch hier sollte einem eventuellen Zusammenhang von OshC und PI4P nachgegangen werden, da eine Interaktion mit dem Golgi und OshC, wie die Interaktion in Hefe Osh4, durchaus möglich wäre. Bevor dies jedoch untersucht werden kann, sollte OshC unter seinem natürlichen Promotor untersucht werden, um einen besseren Rückschluss auf die Lokalisierung und somit auf eine mögliche Funktion zu erhalten. Zusätzlich sollte ein „stärkeres“ Fluorophor (3xGFP) unter dieser Expression benutzt werden, um eine Abschwächung des Signals von OshC zu verhindern, da selbst unter dem *alcA*-Promotor das GFP-Signal an der Hyphenspitze schwach war.

Die Lokalisierung von OshD im Zytoplasma wurde auch bei den Hefehomologen Osh6 und Osh7 beobachtet (Wang *et al.*, 2005a), jedoch wurden weitere Lokalisierungen dieser beiden Proteinen in Hefe an den ER-PM MCS gefunden (Maeda *et al.*, 2013; Schulz *et al.*, 2009). Auch hier wäre eine Expression von *OshD* unter seinem natürlichen Promotor für eine Bestätigung der Lokalisierung und für einen möglichen Rückschluss auf die Funktion notwendig.

Unter dem Mikroskop wiesen die Hyphenmorphologien von $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ einen stärkeren Verzweigungsgrad auf, als die restlichen Deletionsstämme und der Wildtyp. Die Lokalisierung von OshC und OshD war im Zytoplasma sowie bei OshC an der Hyphenspitze festzustellen. Anhand dieser Lokalisierungen ist es schwer Rückschlüsse auf eine eindeutige Funktion zu ziehen, weshalb die folgende Funktionszuweisung für OshC höchst spekulativ ist und anhand weiterer Lokalisierungsanalysen untersucht werden muss. Angenommen OshC hätte an der Hyphenspitze eine essentielle Rolle in der Zusammenarbeit mit den exozytotischen Vesikeln, so könnte das Ausschalten von *oshC* die richtige Lokalisierung der Vesikeln an der Hyphenspitze beeinflussen. Durch ein Fehlleiten der exozytotischen Vesikeln und möglichen vorausgehenden Signalen würden die Vesikel an eine andere Stelle der Hyphe geliefert um dort mit der Membran zu verschmelzen. Dies könnte somit zur Folge haben, dass mehr Verzweigungen in der Hyphe entstehen.

Für das Hefeprotein Osh4 wurde eine Komplexbildung mit der Untereinheit Sec6 des Exozystkomplex bestätigt, welche auch für eine Osh4-Assoziation mit Vesikeln benötigt wird (Alfaro *et al.*, 2011). So besaßen Hefezellen, bei denen die funktionellen Osh-Proteine fehlten und Konstrukte für eine gezielte *osh*-Genregulation enthielten (*osh* Δ *OSH4* oder *osh* Δ *osh4-1^{ts}*), einen Defekt in der exozytotischen Vesikelfusionierung mit der PM (Alfaro *et al.*, 2011).

Zusätzlich zu der Exozystkomplexuntereinheit Sec6 konnte eine Komplexbildung mit den kleinen GTPasen Cdc42, Rho1 und Sec4 bestimmt werden, welche ebenso an der polaren Exozytose beteiligt sind (Alfaro *et al.*, 2011). Die Eliminierung von allen Osh-Proteinen resultierte in einer depolarisierten Lokalisierung von Rho1 und CDC42 sowie

anormaler Akkumulationen von Sec4-markierten Vesikeln innerhalb von knospenden Hefezellen (Kozminski *et al.*, 2006). Eine Untersuchung von OshC mit den homologen Komponenten von Cdc42, Rho1, Sec4 und den Exozystuntereinheiten in *A. nidulans* könnte neue Aufschlüsse über die Funktion von OshC in Verbindung mit dem polaren Wachstum bringen. Analysen der anderen vier Osh-Proteine mit homologen Proteinen, der oben genannten Hefe-Komponenten, in *A. nidulans* könnten ebenfalls helfen herauszufinden, ob eine Verbindung der Osh-Proteine und dem polaren Wachstum besteht.

Die stärkeren Verzweigungen und kompakteren Wuchsformen von $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ könnten zusätzlich direkt oder indirekt eine Beteiligung der MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskade andeuten. So konnte dieser MAP-Kinase-Kaskade eine Involvierung in die Intaktheit der Zellwand in *A. fumigatus* nachgewiesen werden (Shapiro *et al.*, 2011; Valiante *et al.*, 2008). Eine Deletion der MAP-Kinase *mpkA* in *A. fumigatus* zeigte einen Phänotypen mit kleineren sowie stärker verzweigten Hyphen und kleineren Kolonien. Deletionen der vorgeschalteten MAPKs *mkk2* und *bck1* resultierten in ähnlichen Phänotypen (Valiante *et al.*, 2008; Valiante *et al.*, 2009; Valiante *et al.*, 2015). Die Analyse der beiden Proteine OshC und OshD mit der entsprechenden MAPK-Kaskade in *A. nidulans* könnte Aufschluss über diese beiden Phänotypen liefern. Weiterhin wäre eine Analyse der kleinen GTPasen in diesem Zusammenhang sinnvoll. Zusätzlich sollten auch die restlichen Osh-Proteine auf eine mögliche Interaktion mit der MAPK-Kaskade untersucht werden.

Auffallend bei $\Delta oshD$ war die zum Teil an den Hyphenspitzen vorhandene Zellyse. Durch einen Wachstumstest mit dem Zellwandstresser Calcofluor White (CFW) sollte eine Veränderung der Zellwände untersucht werden. Der stärkste Wachstumsrückgang des Wildtyps sowie der Deletionsmutanten *oshA* und *oshE* konnte bei 25 μM CFW verzeichnet werden. Die Mutanten *oshD* und *oshC* wiesen schon bei 10 μM CFW Zellyse an den Spitzen der Hyphe auf (Kapitel 3.9.3, Abbildung 64), während der Wildtyp, $\Delta oshA$ und $\Delta oshE$ keine aufgeblähten oder ausgelaufenen Spitzen aufwiesen. Eine Anpassung der *osh*-Deletionsstämmen an die Bedingungen innerhalb der drei Tage Inkubationszeit könnte möglich sein. Der CFW-Assay wurde in *S. cerevisiae* mit unterschiedlichen Inkubationszeiten und Zellverdünnungen durchgeführt (Fang *et al.*, 2009; Hill *et al.*, 2006; Samantaray *et al.*, 2013; Wagener *et al.*, 2008). Eine Wiederholung des Assays mit den Deletionsstämmen *oshA-E* und kürzeren Inkubationszeiten sowie verschiedenen Sporenverdünnungen könnte Aufschluss über eine Zellwandveränderung im Anfangsstadium des Wachstums liefern. Aufnahmen der Zellmembranen der *oshA-E*-Mutanten mit einem REM (Rasterelektronen Mikroskop) würden letztendlich am besten zeigen, ob eine Veränderung der Zellmembranen besteht. Wenn OshC und OshD nur indirekt am Zellwandaufbau und der Aufrechterhaltung beteiligt sind, so würde der CFW-Assay das Wachstum nicht maßgeblich beeinträchtigen, da die anderen Osh-Proteine oder die Wachstumsmaschinerie den Defekt ausgleichen könnten. Die Genexpression der *osh*-

Gene zeigte bei den einzelnen Deletionen der *osh*-Gene, dass ein anderes Gen mehr exprimiert wurde als der Rest und somit die Funktion komplementieren könnte. Möglicherweise liefern Doppel- oder Mehrfachdeletionsmutanten mehr Hinweise.

OshE aus *A. nidulans* wurde erstmals in dieser Arbeit untersucht. Es konnte keinem der Hefeproteinen Osh1-7 in der phylogenetischen Untersuchung zugewiesen werden, was auf eine spezifische, jedoch noch unbekannt Funktion von OshE in *A. nidulans* hinweist. GFP-OshE lokalisierte in der gesamten Hyphe und wurde an den peripheren ER-Strängen in der Nähe der PM beobachtet. Somit könnte OshE an der ER-PM MCS Ergosterol vom ER zur Membran liefern, welches über andere noch unbekannt, involvierte Mechanismen zur Hyphenspitze gelangt. Um auf weitere mögliche Funktionen von OshE und eine denkbare Beteiligung bei der SRD-Bildung oder Aufrechterhaltung schließen zu können, sollten zusätzlich Untersuchungen - auch mit anderen Organellen wie Vesikeln- durchgeführt werden.

Allgemein sollte in *A. nidulans* für alle Osh-Proteine ein Zusammenhang mit PI4P und seiner PI-4-Kinase bzw. Phosphatase sowie deren Mutanten untersucht werden.

Die Hauptwuchsform von *A. nidulans* ist nach dem Auskeimen schlauchförmig während *S. cerevisiae* durch das isotrophe Wachstum eine runde Wachstumsform aufweist. Das polare Wachstum bei *A. nidulans* findet hauptsächlich an der Hyphenspitze und bei Hefe während der Knospung statt. Durch diese unterschiedlichen Wuchsformen und Stellen des polaren Wachstums können die Funktionen und Lokalisierungen der Hefe Osh-Proteine in *A. nidulans* abweichen.

Aufgrund der Bewegungsanalyse der Signale von GFP-OshA, GFP-OshB, GFP-OshC und GFP-OshE anhand von Kymographen konnte bei allen Osh-Proteinen eine mit dem Mikroskop sichtbar aktive Bewegung ausgeschlossen werden. Jedoch wurde der Austausch von Sterol an Liposomen *in vitro* durch die Untersuchung des Osh4-Proteins in Hefe nachgewiesen (Raychaudhuri *et al.*, 2006), was für eine aktive Bewegung dieses Proteins spricht. Die Bewegung liegt allerdings in einem Bereich, die weder mit dem Auge noch mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann. Die Arbeitsgruppe um Prinz konnte in Experimenten nachweisen, dass die Kernsequenz der ORPs an zwei Membranen gleichzeitig binden kann und vier der sieben Osh-Proteine in Hefe an möglichen MCS (*membrane contact sites*) vorkommen (Schulz *et al.*, 2009). MCS sind Regionen, an denen die Membranen von zwei Organellen in einen Abstand von 10-30 nm nahe beieinander liegen (Toulmay & Prinz, 2011). Der Abstand von 10-30 nm kann mit der Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops nicht gemessen werden, was somit in einer nicht aktiven Bewegung als Linie im Kymographen resultiert. Untersuchungen der Proteine OshA-E

an MCS könnten durch neue, noch unbekannte Mikroskoptechniken in Zukunft Hinweise auf die Bewegungen der Osh-Proteine liefern.

Für die *A. nidulans* Proteine OshA-E und vor allem für OshE wäre eine Untersuchung der Sterolbindung interessant, da neuere Untersuchungen der Ligandenbindung in Hefe im Fall von Osh6 und Osh7 zeigten, dass beide Proteine eine schlechtere Steroltransferaktivität *in vitro* besitzen (Schulz *et al.*, 2009). Bemerkenswerterweise fand jedoch ein spezifischer Transfer für Phosphatidylserin (PS) zwischen Donor und Akzeptormembran *in vitro* und *in vivo* zwischen PS und PI4P statt (Maeda *et al.*, 2013; Moser von Filseck *et al.*, 2015a). Wäre dies auf *A. nidulans* übertragbar, so würde das bedeuten, dass OshD für andere Lipidtransporte als Ergosterol zuständig wäre und eine Beteiligung an der Entstehung und Aufrechterhaltung der SRD könnte vermindert sein oder möglicherweise gänzlich ausgeschlossen werden. Über das OshE-Protein und seine genaue Funktion ist noch nichts bekannt. Die Überprüfung der Liganden für OshE würde Aufschluss über seine mögliche Funktion geben. Eine Bindung von Ergosterol in der Bindungstasche von OshE würde sicherstellen, dass Ergosterol transportiert wird und eine Beteiligung an der SRD und somit am polaren Wachstum haben könnte.

Die Phänotypen der Deletionen von *oshA* und *oshE* zeigten kaum Wachstumsdefekte auf, welche jedoch bei $\Delta oshB$, $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ zu beobachten waren. In *S. cerevisiae* zeigten die Proteine Osh1-7 bei der Deletion eines einzelnen *osh*-Gens nur eine minimale Wachstumsbeeinträchtigung, jedoch ist das Ausschalten aller sieben *osh*-Gene letal und dadurch die Gene in ihrer Gesamtheit essentiell (Beh *et al.*, 2001).

Die gemessene Ergosterolkonzentration der *osh*-Deletionsstämme war bei $\Delta oshB$ niedriger als im Wildtyp sowie auch bei $\Delta oshA$, $\Delta oshC$, $\Delta oshD$ und $\Delta oshE$ signifikant reduziert (Kapitel 3.4.2, Abbildung 47). Dies deutet auf einen geringeren Ergosterolgehalt der Zellmembran oder der Organellen hin, wobei die Osh-Proteine an der Verteilung innerhalb der Zelle bzw. an der Membran direkt oder indirekt involviert sind. Die Osh-Proteine spielen nicht nur bei der Verteilung, sondern vor allem bei der Zellbildung eine Rolle: Je weniger Ergosterol produziert wird, desto weniger kann in die Membran eingebaut werden. Weitere Untersuchungen mit anderen Proteinen, die am polaren Wachstum beteiligten sind, wie zum Beispiel kleine GTPasen oder Komponenten des Exozystkomplexes, könnten helfen, offene Fragen, wie Verwicklung der Osh-Proteine in eine polaritätsabhängigen Regulation, zu klären.

Durch das Fehlen der SRDs und unterschiedlicher Funktionen menschlicher ORPs in verschiedenen Gewebetypen ist ein Vergleich der Funktionen mit *A. nidulans* nicht möglich, weshalb hier nur ein Vergleich mit den *S. cerevisiae* Oshs berücksichtigt wurde.

4.2 Keine signifikanten Veränderungen in den SRDs und den Zellendmarker der *osh*-Deletionsstämme

Die Filipinfärbung an den Hyphenspitzen der *osh*-Deletionsstämme zeigte im Vergleich zum Wildtyp anhand der Mikroskopbilder keinen sichtbaren Unterschiede (Kapitel 3.10, Abbildung 65). Bei der Untersuchung der SRD-Intensität wurde die Signalstärke des Filipins gemessen und eine signifikante Reduktion in $\Delta oshA$ und $\Delta oshE$ analysiert (Kapitel 3.10, Abbildung 66 A). Die SRD-Länge waren bei allen *osh*-Deletionsmutanten reduziert, bei manchen Mutanten stellte sich diese Reduktion als signifikant heraus, wie bei $\Delta oshD$ (Kapitel 3.10, Abbildung 66 B). Die Signalintensität der SRDs und ihre Länge wurden anhand der aufgenommenen und unbearbeiteten Mikroskopbilder ausgewertet, welche für die Aufnahmen alle die gleichen Parameter besaßen. Diese Messungen sollten nochmals wiederholt werden, da 20 ausgewertete Hyphen nur einen Hinweis geben und für eine relevante Statistik wesentlich mehr Hyphen untersucht werden sollten.

Die Ergebnisse der SRD-Intensität und der SRD-Länge stehen nicht im Einklang zueinander. Bei gleicher Signalintensität der *osh*-Deletionsstämme wie im Wildtyp sollten auch ungefähr die gleichen SRD-Längen gemessen werden, was jedoch nicht der Fall war. Eine Erklärung hierfür könnte in der Aufnahme im Hellfeldkanal (DIC; *Differential Interference Contrast*) liegen. Es wurde versucht, die Hyphenspitzen optimal scharf zu stellen, jedoch ist ein Einstellen im Fluoreszenzkanal immer besser möglich. Filipin bleicht aber nach dem Färben schnell aus und verhindert so eine optimale Einstellung der Hyphen anhand des Fluoreszenzsignals. Dies könnte die Messung hinsichtlich der Länge der SRDs beeinträchtigen, da keine bestmögliche Einstellung erfolgen kann.

Filipin ist in Lösung nicht sehr stabil (Alvarez *et al.*, 2007) und sollte für jeden Versuch grundsätzlich neu angesetzt werden. Auch durch das sorgfältige Einwiegen des Filipins sind geringe Gewichtsunterschiede in der Versuchsreihe unvermeidbar, was möglicherweise durch mehr bindungswilliges Filipin und somit zu einem abweichenden Messergebnis führen könnte. Zudem benötigt Filipin für die Bindung mit Sterol ein freies 3'-OH Ende des Sterols (Gimpl & Gehrig-Burger, 2007), doch wie viele Ergosterole in der Membran mit einem freien 3'-OH Ende an der Hyphenspitze der *osh*-Deletionsstämmen in *A. nidulans* wirklich eingebaut sind und wie viele Filipinmoleküle letztendlich binden, ist nicht bekannt.

Für die Deletionsmutante *oshE* wurde sowohl ein signifikanter Rückgang der SRD-Signalintensität als auch eine Reduktion der SRD-Länge gemessen, obwohl die Morphologie von $\Delta oshE$ keinen Unterschied zum Wildtyp aufwies. Dies könnte durch einen geringeren Ergosterolgehalt an der Hyphenspitze erklärt werden und könnte somit eine indirekte Involvierung in die SRD-Organisation bedeuten. Denn OshE wurde an der ER-PM-MCS lokalisiert, wodurch ein Ergosteroltransport an dieser Stelle begünstigt wird und prinzipiell einen indirekten Einfluss auf die SRD-Organisation haben könnte.

Die Reduktion der SRD Signalintensität und der Länge von $\Delta oshA$ waren beide signifikant. OshA wurde in der gesamten Hyphe gefunden und eine Zusammenarbeit mit dem Golgi durch die Co-Lokalisierung vermutet. Sekretorischen Vesikel, welche am Golgi gebildet und zur PM transportiert werden (Johansen *et al.*, 2012), sind in den Steroltransport durch den vesikulären Transport involviert (Schulz & Prinz, 2007). Somit wäre eine indirekte Beteiligung von OshA in der SRD Organisation möglich.

Die richtige Lokalisierung der Zellendmarker (Kapitel 3.10, Abbildung 67) ist von den SRDs abhängig (Takeshita *et al.*, 2008; Takeshita *et al.*, 2012). In den *osh*-Deletionsmutanten waren die SRDs nicht beeinträchtigt, wodurch die Zellendmarker TeaA und TeaR richtig lokalisiert sein müssten. So waren in den Deletionsmutanten *oshA*, *oshC*, *oshD* und *oshE* die beiden getesteten Zellendmarker erwartungsgemäß lokalisiert, dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass keine spezifischen Störungen der SRDs aufgetreten sind.

Die Lokalisierung von TeaR im subapikalen Bereich bei $\Delta oshC$ würde die vermehrten Verzweigungen erklären, da die SRD im subapikalen Bereich detektiert wurde.

Bei temperatursensitiven Mutanten in Hefe, bei denen eins der sieben Gene noch funktionell war, konnten bedeutende Veränderungen in der Sterol- und Lipidverteilung festgestellt werden (Beh & Rine, 2004).

Um Störungen der SRD und dadurch eine falsche Positionierung der Zellendmarker zu untersuchen sollten Mehrfachdeletionsmutanten sowie temperatursensitive Mutanten, für die Kontrolle einzelner Gene, hergestellt werden. Die dadurch neu entstehenden Ergebnisse könnten vermutlich bessere Hinweise liefern, wodurch Rückschlüsse auf eine Beteiligung an der SRD-Bildung oder -Aufrechterhaltung gewonnen werden könnten.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den Oshs, dem polaren Wachstum und den SRDs sowie weiteren involvierten Proteinen zu finden, sind weitere Untersuchungen in *A. nidulans* notwendig.

4.3 Stärkere Expressionen der Gene *cyp51A* und *cyp51B* in $\Delta oshA$ - $\Delta oshE$ verändern die Voriconazolanfälligkeit

Die Expression der Gene *cyp51A* und *cyp51B* waren in den *oshA*-, *oshC*, *oshD* und *oshE*-Mutanten stärker exprimiert als im Wildtyp (Kapitel 3.8, Abbildung 58). Die Deletionsstämme *oshC* und *oshD* wiesen eine bessere Resistenz gegenüber höheren Voriconazol (VCZ)-Konzentrationen auf, wohingegen $\Delta oshA$, $\Delta oshE$ und der Wildtyp beeinträchtigt waren. Voriconazol inhibiert die 14- α -Demethylase in der Ergosterolbiosynthese welche in *Aspergillus spp.* durch die Gene *cyp51A* und *cyp51B* codiert werden. (Mellado *et al.*, 2001). Die Deletionsmutante *oshB* war gegenüber VCZ sehr sensitiv. Die Expression des *cyp51A*-Gens in $\Delta oshB$ war zum Wildtyp ähnlich,

jedoch wurde *cyp51B* minimal stärker exprimiert. Dies könnte möglicherweise im Hinblick auf die Ausprägung der Sensitivität eine Rolle spielen.

In *A. fumigatus* können Resistenzen gegenüber Azolen durch verschiedene Punktmutationen im *cyp51A*-Gen verursacht werden, welche zum Teil in Kombination mit einem 34 bp Tandemrepeat in der *cyp51A* Promotorregion auftreten (Lelievre *et al.*, 2013) und einer Überexpression des *cyp51A*-Gens bewirken (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2012). So könnte in den *oshC*- und *oshD*-Deletionsstämmen von *A. nidulans* eine Veränderung im *cyp51A*-Gen oder in dessen Promotor die Resistenz gegenüber VCZ bewirken. Dies sollte anhand weiterer Versuche, wie zum Beispiel Promotoranalysen, geklärt werden.

Bei Säugetieren ist bekannt, dass der Sterolgehalt durch ein aufwändiges Feedbacksystem kontrolliert wird, in das der membrangebundene Transkriptionsfaktor SREBP2 und das SCAP (*sterol-sensing protein*) involviert sind. Fällt der Sterolgehalt im ER unter 5 mol%, wird SREBP2 vom ER zum Golgi durch SCAP eskortiert. Dort wird SREBP2 einer proteolytischen Spaltung unterzogen, was zur Freigabe eines Transkriptionsfaktors führt und dieser Gene aktiviert, die sowohl in die Biosynthese, als auch in die Aufnahme von Sterol involviert sind (Holthuis & Menon, 2014). SREBP wurde als Regulator von Cholesterol und Lipiden zuerst in höheren Eukaryoten identifiziert und ist mittlerweile unter anderem in *A. fumigatus* gut untersucht (Willger *et al.*, 2008). Aus diesem Organismus ist bekannt, dass die Expression der Gene *cyp51A* und *cyp51B*, auch *erg11A* und *erg11B* benannt, durch den Transkriptionsfaktor SrbA (*sterol-regulatory element binding protein* (SREBP) A) als Reaktion auf Azolwirkstoffe und Sauerstoffmangel hin kontrolliert wird (Blosser & Cramer, 2012). So konnte in der *A. fumigatus* Δ *srbA*-Mutante eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber VCZ nachgewiesen werden und SrbA wurde als primärer direkter transkriptioneller Regulator von *erg11A* (*cyp51A*) und *erg11B* (*cyp51B*) gefunden (Blosser & Cramer, 2012). Zusätzlich wurde vorgeschlagen, dass die unterschiedliche Regulation der *erg11*-Transkripte durch SrbA wahrscheinlich einem Mechanismus unterliegt, der in der Δ *srbA*-Mutante für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber VCZ verantwortlich ist (Blosser & Cramer, 2012). Sollte SrbA an der Expression der beiden *cyp51*-Gene in *A. nidulans* mitbeteiligt sein, würde die unterschiedliche Expression in den *osh*-Deletionsstämmen durch Hervorrufen einer möglichen Störung des SrbA-Signalweges erklärt werden können. Weitere Untersuchungen dieses SrbA-Signalweges in den *osh*-Deletionsmutanten könnten beim Verständnis dieser Ergebnisse helfen und die Resistenzen bzw. Sensitivitäten gegenüber VCZ erklären.

4.4 OshE ist an der Konidiophorentwicklung beteiligt

Die Sporenbildung der Deletionsstämmen *oshA-E* war bei allen untersuchten Stämmen signifikant reduziert und fiel besonders bei Δ *oshE* auf, da die Koloniegröße kaum kleiner war als die des Wildtyps. Zusätzlich wurde bei Δ *oshE* teilweise auch eine braune Sporenfärbung beobachtet. Die Untersuchung der Expression von *oshE* im

entwicklungsabhängigen Wachstum der Konidiophoren wies eine Beteiligung an der Bildung von den Vesikeln und den Metulae auf (Kapitel 3.6, Abbildung 52). Die Expression von *oshE* war nach 24 h am stärksten induziert. In der asexuellen Entwicklung werden die Vesikel nach ca. fünf bis sechs Stunden, die Metulae und Phialiden nach zehn bis zwölf Stunden und die Konidiosporen nach 15 bis 18 Stunden gebildet, sodass für die Reifung der Sporen ein bis zwei Tage benötigt werden (Yu, 2010). Die Promotoranalyse der Osh-Proteine zeigte außer im Fall von OshC jeweils eine oder mehrere BrlA-Bindungsstellen (Chang & Timberlake, 1993) auf. Die Konidiophorenentwicklung wird von BrlA, einem Transkriptionsfaktor, kontrolliert (Adams *et al.*, 1988; Boylan *et al.*, 1987). Diese Bindungsstelle für BrlA in OshE bestätigt die Ergebnisse des entwicklungsabhängigen Wachstums von OshE und einer Involvierung in die Bildung von Vesikeln, welche nach 6-8 h ein signifikant höheres *oshE* Expressionsmuster zeigten. Zusätzlich wurden Konidiophoren von GFP-OshE mikroskopiert (Abbildung 70 B, links), wodurch die Ergebnisse der entwicklungsabhängigen *oshE* Expression bestätigt werden konnte. Der Stiel und die Metulae wiesen Akkumulationen des GFP-OshE Signals auf. Jedoch sollten weitere Untersuchungen der Vesikel in Verbindung mit dem ER vorgenommen werden. Sollte OshE in der PM mit dem ER co-lokalisieren, könnte auch hier der Sterolaustausch über die ER-PM MCS erfolgen.

In den Phialiden konnten keine spezifischen Signale detektiert werden (Abbildung 70 B, rechts) (Bühler *et al.*, 2015), was mit der reduzierten Expression von *oshE* bei einer Versuchsdauer von zwölf Stunden übereinstimmt. Zusätzlich belegt wird dies auch durch die fehlende Bindungsstelle für AbaA, das in der Konidiophorenentwicklung durch BrlA induziert und anschließend exprimiert wird (Boylan *et al.*, 1987; Yu, 2010).

Die Expression von *oshE* nach 24 Stunden deutet auf eine bestehende Funktion bei der Konidiophorenreifung hin. Eine Aufgabe von OshE könnte die Lieferung von Ergosterol bei der Neubildung der Sporenmembranen sein. Um die Funktion von OshE in der Konidiophorenentwicklung zu verstehen, sind weitere Untersuchungen zum Beispiel mit dem ER oder der Exozytose notwendig. Die Konidiophoren könnten in Zusammenhang mit dem ER für die Hypothese wichtig sein. Es wäre auch bedeutend, die Membranzusammensetzung der Vesikel bzw. der Konidiophoren anhand einer Filipinfärbung zu untersuchen. So könnten Aufschlüsse über eine SRD-Bildung im Zusammenhang mit der Entwicklung gewonnen werden. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass *oshE* in die Bildung der Konidiophoren involviert ist und eine wichtige Aufgabe in der Entwicklung inne hat.

In der Stammbaumanalyse wurde OshE zusammen mit anderen filamentösen Pilzen, mit Ausnahme von *S. pombe*, in eine gemeinsame Gruppe eingruppiert. Dies lässt sich durch eine Involvierung in die Konidiophorenentwicklung erklären.

Die reduzierte Sporenanzahl von $\Delta oshE$ könnte wiederum auf einen Defekt in der Konidiophorenentwicklung zurück zu führen sein, der jedoch durch die Induktion eines der anderen *osh*-Gene teilweise komplementiert werden könnte. Eine

Expressionsanalyse der anderen *osh*-Gene in die Konidiophorenentwicklung könnte hier vielleicht Aufschluss geben, da die Promotorsequenzen der *oshA*-, *oshB*- und *oshD*-Gene ebenfalls BrIA-Bindungsstellen aufweisen. Zusätzlich könnte die Untersuchung der Konidiophorenmorphologie der *osh*-Deletionsstämme durch mikroskopieren vielleicht Aufklärung über einen Defekt von $\Delta oshE$ und der anderen *osh*-Deletionen bei der Konidiophorenentwicklung leisten.

Die Expressionsanalyse des *oshE*-Gens in einer *brlA*-Deletionsmutante könnte sehr interessant sein und eine Lokalisationsstudie von OshE in $\Delta brlA$ könnte zusätzliche Hinweise über die Funktion geben.

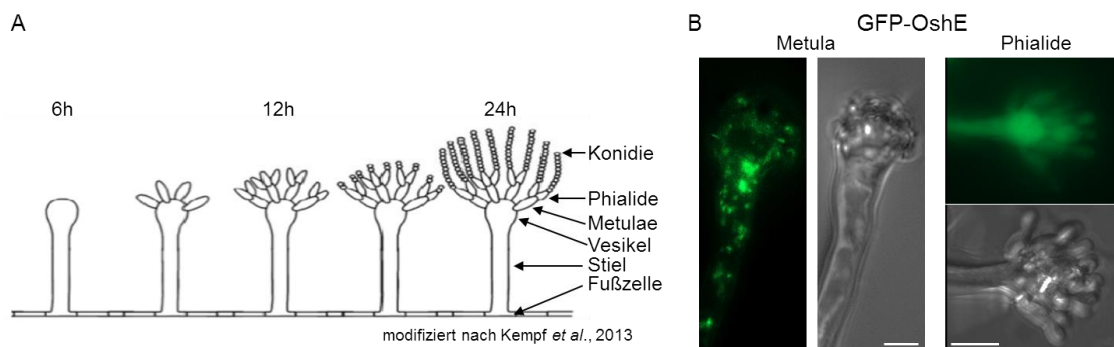


Abbildung 70: Konidiophorenentwicklung in *Aspergillus nidulans*. (A) Schematische Darstellung der Konidiophorenentwicklung. Modifiziert nach (Kempf *et al.*, 2013). (B) GFP-OshE lokalisierte in mehreren Punkten im Konidiophorstiel und innerhalb der Metula. Die Phialiden zeigten keine spezifischen GFP-OshE-Signale (Bühler *et al.*, 2015). Maßstabbalken: 200 μm (Mikroskopische Aufnahmen: N. Takeshita).

5 Material & Methoden

5.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Kits wurden über folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Axon Labortechnik GmbH (Kaiserslautern), Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht), Invitrogen GmbH (Karlsruhe) Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

5.2 Verwendete Organismen und Kultivierungen

5.2.1 Verwendete Stämme von *Aspergillus nidulans* und Kultivierung

Die Stämme von *Aspergillus nidulans* wurden auf Platten mit Minimalmedium (Tabelle 3) oder in flüssigem Minimalmedium (MM) angeimpft. Abhängig des Bedarfs wurde das MM der *A. nidulans* Stämme mit Auxotrophiemarkern, Aminosäuren, Vitaminen oder Nucleotiden versehen. Die Expression der Proteine unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors wurde mit 2 % Glycerin (Dereprimierung), 2 % Threonin (Überexpression) oder 2 % Glukose (Reprimierung) kontrolliert. Glukose (2 %) wurde als Standardkohlenstoffquelle verwendet, bei den Festmedien wurde zusätzlich 1,5 % Agar eingewogen. Die Flüssigkulturen inkubierten in Erlenmeyerkolben über Nacht bei 180 rpm schüttelnd. Die Inkubationen erfolgten wenn nicht anders vermerkt bei 37°C.

Tabelle 3: Medien für *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung für 1l Medium
Minimalmedium (MM) bzw. Mikroskopiemedium	50 ml Salzstammlösung; 1 ml Spurenelemente Lösung; 20 g Glukose (Glycerin oder Threonin) pH-Wert mit 10 N NaOH auf 6,5 einstellen
MMR Medium	20 ml Salzstammlösung ohne Stickstoff 1 ml Spurenelemente Lösung 342 g Saccharose 10 ml Ammoniumtartrat 100 ml Glukose pH 6,8; 15 g Agar
MMR-Top-Agar	20 ml Salzstammlösung ohne Stickstoff 1 ml Spurenelemente Lösung

Medium	Zusammensetzung für 1l Medium
	342 g Saccharose pH-Wert mit 10 N NaOH auf 6,8 einstellen 3 g Agar für 500 ml
Spurenelemente Lösung (1000 x)	22 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 5 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5 H ₂ O; (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit 4 N KOH-Lösung auf pH 6,5-6,8 einstellen
Salzstammlösung (20 x)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
Stickstofffreie Salzstammlösung (50 x)	26,0 g KCl; 26,0 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 76,0 g KH ₂ PO ₄ pH ~ 4,0

Tabelle 4: Zusätze für Auxotrophien in *A. nidulans*

Substanzen	Konzentration der Stammlösung	Menge in 1 l Medium
Uridin	500 mM (100 x) ; steril filtrieren	10 ml
Uracil	-	1 g
Pyridoxin-HCL	0,1 % (1000 x); steril filtrieren	1 ml
p-Aminobenzoensäure	0,1 % (1000 x); autoklavieren	1 ml

Tabelle 5: Verwendete *A. nidulans* Stämme

Stämme	Genotyp	Referenzen oder Quellen
TN02A3	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB pyroA4</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
SNT100*	<i>pabaA1;(teaR(p)::gfp::tear, pyr-4); (teaA(p)::mrfp1::tea, pyr-4)</i>	(Takeshita <i>et al.</i> , 2012)
SSH35	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB (alcA(p)::mRFP1-tlgB, pyroA)</i>	S. Herrero de Vega, unveröffentlicht

Stämme	Genotyp	Referenzen oder Quellen
SNB2	TN02A3 transformiert mit pNB1; (<i>alcA(p)::gfp::oshA, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB3	TN02A3 transformiert mit pNB2; (<i>alcA(p)::gfp::oshB, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB4	TN02A3 transformiert mit pNB3; (<i>alcA(p)::gfp::oshC, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB5	TN02A3 transformiert mit pNB5; (<i>alcA(p)::gfp::oshD, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB6	TN02A3 transformiert mit pNB6; (<i>alcA(p)::gfp::oshE, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB7	TN02A3 transformiert mit pNB7; (<i>alcA(p)::oshE::gfp, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB8	Δ <i>oshB::pyrG</i> in TN02A3; <i>pyroA4; argB2; ΔnkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNB9	Δ <i>oshC::pyroA</i> in TN02A3; <i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNB10	Δ <i>oshD::pyroA</i> in TN02A3; <i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNB11	Δ <i>oshE::pyrG</i> in TN02A3; <i>argB2; ΔnkuA::argB, pyroA4</i>	Diese Arbeit
SHH2	TN02A3 transformiert mit pHH2; (<i>sec63::mcherry::pyrG</i>) <i>argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4</i>	Diese Arbeit (Hanna Haag, im Rahmen einer Bachelor Arbeit)
SNB12	SNB9 gekreuzt mit SNT100; (Δ <i>oshC::pyroA; teaR(p)::gfp::teaR, pyr-4;</i> <i>teaA(p)::mrfp1::teaA, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB13	SNB10 gekreuzt mit SNT100; (Δ <i>oshD::pyroA; teaR(p)::gfp::teaR, pyr-4;</i> <i>teaA(p)::mrfp1::teaA, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB14	SNB11 gekreuzt mit SNT100; (Δ <i>oshE::pyrG; teaR(p)::gfp::teaR, pyr-4;</i> <i>teaA(p)::mrfp1::teaA, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SNB15	SNB3 gekreuzt mit SHH2; (<i>alcA(p)::gfp::oshB, pyr-4; sec63::mcherry, pyrG</i>)	Diese Arbeit
SNB16	SNB6 gekreuzt mit SHH2; (<i>alcA(p)::gfp::oshE, pyr-4; sec63::mcherry, pyrG</i>)	Diese Arbeit
SNB17	TN02A3 transformiert mit pNB8;	Diese Arbeit

Stämme	Genotyp	Referenzen oder Quellen
	<i>(oshB(p)::gfp::oshB, pyr-4)</i> <i>argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4</i>	
SNB18	TN02A3 transformiert mit pNB9; <i>(oshE(p)::gfp::oshE, pyr-4)</i> <i>argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4</i>	Diese Arbeit
SNB19	TN02A3 transformiert mit pHH3; <i>(ΔoshA::pyroA)</i> <i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNB20	TN02A3 transformiert mit pNB10; <i>(oshA(p)::gfp::oshA, pyr-4)</i> <i>argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4</i>	Diese Arbeit
SNB21	SNB9 (<i>ΔoshC</i>) transformiert mit pNB11; <i>(oshC(p)::oshC-oshC(t), pyr4)</i> <i>argB2; ΔnkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNB22	SNB10 (<i>ΔoshD</i>) transformiert mit pNB12; <i>(oshD(p)-oshD-oshD(t), pyr4)</i> <i>argB2; ΔnkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNB23	SNB2 gekreuzt SSH35; <i>(alcA(p)::gfp::oshA, pyr-4; alcA(p)::mRFP1-tlgB,</i> <i>pyroA)</i> <i>argB2; ΔnkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNB24	SNB19 gekreuzt mit SNT100; <i>(ΔoshA::pyroA; teaR(p)::gfp::teaR, pyr-4;</i> <i>teaA(p)::mrfp1::teaA, pyr-4)</i>	Diese Arbeit

Tabelle 6: Liste der Auxotrophiemarker von *A. nidulans*

Defektes Gen	Funktion	Chromosom
<i>pabaA1</i>	<i>p</i> -Aminobenzoesäure-Synthese	I
<i>pyrG89</i>	Uracil-Auxotrophie (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase)	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxin-Auxotrophie	IV

5.2.2 Verwendeter Stamm von *Escherichia coli* und Kultivierung

Die *Escherichia coli* Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben als Flüssigkultur aerob bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Das Festmedium wurde mit 1,5% Agar versehen. Nach dem Autoklavieren der Medien wurden hitzeempfindliche Lösungen wie steril-filtrierte Antibiotika hinzugegeben.

Tabelle 7: Verwendeter *E. coli* Stamm

Stamm	Genotyp	Referenzen oder Herkunft
Top10F	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15ΔlacX74 nupG recA1 araD139</i> <i>Δ(ara-leu)7697galE15 galK16 rpsL(Str^R)</i> <i>endA1 χ</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 8: Medien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung für 1l Medium
Luria Bertani (LB)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7.0
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl ₂ x 7 H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 3,6 g Glukose

Tabelle 9: Antibiotikum für *E. coli* Medien

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg / ml

5.3 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

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

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte, je nach ihrer Größe, mit 0,8 - 2 %-igen Agarosegelen, welche mit 0,5 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA) hergestellt wurden. Als Standard Größenmarker diente der 100 bp oder der 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt). Nach ca. 20 minütigem Färben der Gele in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in TAE) wurden die DNA-Banden durch UV-Lichtbestrahlung (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert. Wurden DNA-Fragmente

für Klonierungen benötigt, so wurden diese mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und über das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) aufgereinigt.

Zur Überprüfung der Restriktionsverdau wurde der richtigen Klon in einem 10 µl Ansatz durchgeführt und für Klonierungen in einem 50 µl Ansatz. Die Ansätze enthielten etwa 0,3-1 µl (5-100 U/µl) des jeweiligen Restriktionsenzymes (New England Biolabs, Frankfurt). Die Zusammensetzung für die Ansätze und die Reaktionstemperatur wurden nach den Herstellerempfehlungen verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1 – 2 Stunden.

Um eine Klonierung durchführen zu können, wurde die DNA wie im Abschnitt zuvor beschrieben, verdaut und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, aus diesem ausgeschnitten und eluiert. Die Ligation mit der geschnittenen Insert-DNA und der geschnittenen Vektor-DNA wurde in einem Verhältnis von 3:1 verwendet. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16 °C oder 1 h bei Raumtemperatur mit Hilfe der T4-DNA-Ligase von New England Biolabs, Frankfurt. Teilweise waren Zwischenklonierungen in den Vektor pJET1.2/*blunt Cloning Vector* nötig, die über das CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt wurden.

5.3.2 PCR, verwendete Oligonukleotide und Herstellung DIG-markierter Sonden

PCR-Reaktionen wurden entweder mit der *Taq*-, Phusion- oder der Q5-Polymerase durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH in Erlangen bzw. fertige Oligonukleotide für die Deletionskassetten *oshB* und *oshE* über Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA bezogen. Das Gesamtvolumen einer Standardreaktion betrug 50 µl mit 200 µM dNTPs und 0,2 µM Primern. Die Durchführung der PCR erfolgte für die jeweiligen Polymerasen nach Herstellerangaben, die Primer Schmelztemperatur sowie die Fragmentlänge der PCR Produkte wurden dementsprechend angepasst.

Für die Herstellung der Southern Blot Sonden wurde je 1 µl des DIG Probe Synthesis Mix aus dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) zu dem PCR Ansatz hinzugefügt. Die Aufreinigung der PCR Produkte erfolgte entweder über das DNA Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit oder das innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena).

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
OshA-FW	<u>GGCGCGCCCATGTCGGAGAAGGTT</u> GAAGG	Lokalisierung
OshA-Rev	GAAGGGAAAGCTGCCACAG <u>TTAATT</u> <u>AA</u>	Lokalisierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
OshB-FW	<u>ACAGGCGCGCC</u> CATGGCAGCCATG GAAGAGC	Lokalisierung
OshB-Rev	CAGAGCAAACCAATGGCGT <u>ATTAAT</u> <u>TAA</u>	Lokalisierung
OshC-FW	<u>GGCGCGCCT</u> ATGTCTTCCAAGGATA CTGC	Lokalisierung
OshC-Rev	GCAGGAGAAATATGTCATCT <u>TAATTA</u> <u>A</u>	Lokalisierung
OshD-FW	<u>GGCGCGCCT</u> ATGTCCGCTGACTGG AGCT	Lokalisierung
OshD-Rev	TCCTACGATTCCTGAACCGT <u>TTAATT</u> <u>AA</u>	Lokalisierung
OshE-FW	<u>ACAGGCGCGCCT</u> ATGTCTTCCACAT TAACGCC	Lokalisierung
OshE-Rev	AATCTTCATCAACATTAGCAAG <u>TTAA</u> <u>TTAA</u>	Lokalisierung
OshE-full-FW	<u>GGTACCAT</u> GTCTTCCACATTAACGC <u>C</u>	Lokalisierung
OshE-full-Rev	AGCGAGATCAAAGGCGCCCTGGGC GCAGGT <u>GGCGCGCC</u>	Lokalisierung
GFP-FW	<u>GGCGCGCCT</u> GCGCGCACTGCTTATG AGTAAAGGAGAAGAAGCTTT	Lokalisierung
GFP-Rev	GGCATGGATGAACTATACAAATGAT <u>TAATTAA</u>	Lokalisierung
OshA(p)-FW	<u>GAATTC</u> GCTGGTGTGGAGAGAGTTA TAC	Lokalisierung
OshA(p)-Rev	<u>GGTACCC</u> ACGAGGTACCATAGGTGA <u>G</u>	Lokalisierung
OshB(p)-FW	<u>GAATTC</u> GCGGGAAACGACGCTGAG <u>GG</u>	Lokalisierung
OshB(p)-Rev	CGCTTAGCGACAAATTGACGGCC <u>G</u> <u>GTACC</u>	Lokalisierung
OshE(p)-FW	<u>GAATTC</u> CACCCGCACTGCGAGGAG <u>AC</u>	Lokalisierung
OshE(p)-Rev	CTCGGAAGCACCAAATAATTATGT CTTCC <u>GGTACC</u>	Lokalisierung
Sec63-LB-Fw	CTGATCCAAGCTGTTGCGCCG	Lokalisierung
Sec63-LB-Rev	CCAATACCGAAACCGATGTTGACGA <u>C</u> GAGCTGGTGCAGGCGCTG	Lokalisierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
Sec63-RB-FW	<u>ATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGGGC</u> CTGTCCAGAGTTTTTCATTGG	Lokalisierung
Sec63-RB-Rev	GGATTCGGTTGCGAGAGCTGG	Lokalisierung
Sec63-nLB-FW2	CACCTCTGTTACAACCTCCCTCAC	Lokalisierung
Sec63-nRB-Rev2	GCAACAGTAGAGATAGGGCTGCG	Lokalisierung
GFP-GA-Linker FW	GGAGCTGGTGCAGGCGCTG	Lokalisierung
pyrG-cas-R	CTGTCTGAGAGGAGGCACTGAT	Lokalisierung
oshA-FW-LB	CTGGTGCTGGTGTGGAGAGAG	Deletion
oshA-Rev-LB	GTTTCATCCTACCGAGGTTATGCTC <u>ACTCAGGCCTAGATGGCCACCA</u>	Deletion
oshA-FW-RB	<u>GGCCTGAGTGGCCT</u> GACTACGTCT GTGCGAGCTGC	Deletion
oshA-Rev-RB	GGAGTCGCCGTACACATAGTGAG	Deletion
No. 39 (Δ oshB-Fw)	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC GACGCTATACTAAGGCTAACCCGC	Deletion; Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
No. 39 (Δ oshB-Rev)	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA CAGCAAGTCTACCACACTGGACCT	Deletion; Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
No. 40 (Δ oshE-Fw)	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC GACGCTACGGGGTGCTGTTTATAG	Deletion; Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
No. 40 (Δ oshE-Rev)	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA CAGCGTTAGCGGAGAACTAGCTG	Deletion; Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
oshC-LB-del-Fw	TCAGTGAGCTAATGCCTCC	Deletion
oshC-LB-del-Rev	GGTGGCCATCTAGGCCGTTTATGGT TGCTCACCCC	Deletion
oshC-RB-del-Fw	ATAGGCCTGAGTGGCCAGCACAGG ATATCAGTGGG	Deletion
oshC-RB-del-Rev	TTTGAATAAAAGTTCATGGCGCCC	Deletion
oshD-LB-del-Fw	ACCCGTTTCGAGTACGAAGG	Deletion
oshD-LB-del-Rev	GGTGGCCATCTAGGCCAGTGGGAA TGGGAAGACCG	Deletion

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	Verwendungszweck
oshD-RB-del-Fw	ATAGGCCTGAGTGGCCATGATTTTC ATTCATCACTATGG	Deletion
oshD-RB-del-Rev	GGACGTTGTAGGTGCCTGT	Deletion
Sfi-linker-FW	TCGAGGCCTAGATGGCCACCATGG	Für pyroA Deletionskassette
Sfi-linker-rev	AGCTCGGCCACTCAGGCCTATTAAT G	Für pyroA Deletionskassette
OshC Prom FW	5'- CGCTCCTAGGGGTTCCCATTCTAT TTGC-3'	Für Komplementation mit entsprechendem Deletionsstamm
OshC 3UTR Rev	5'- GATAATGCTTTACTGGTGCAGGGCG CGCCTAAT-3'	Für Komplementation mit entsprechendem Deletionsstamm
OshD Prom FW	5'- CGCTCCTAGGCTGGCGACAGACGA TTTG-3'	Für Komplementation mit entsprechendem Deletionsstamm
OshD 3UTR Rev	5'- CATGTGCCCAATAAGTATATGGGC GCGCCTAAT-3'	Für Komplementation mit entsprechendem Deletionsstamm
H2B FW-qRT	CTGCCGAGAAGAAGCCTAGCAC	qRT-PCR
H2B Rev-qRT	GAAGAGTAGGTCTCCTTCTGGTC	qRT-PCR
oshA FW_qRT-PCR	CGAAGAAAAGCAGCGTGCTAAGCG	qRT-PCR
oshA Rev_qRT-PCR	ACTGGGGTTGTAGGGCTAGGC	qRT-PCR
oshB FW-qRT	GCCGGGGAGAGTTGGAAACC	qRT-PCR
oshB Rev-qRT	CACGAGAAACCCTTCGCCAGC	qRT-PCR
oshC FW-qRT	GTTCTTGGAGCTCGCGAGAAAGG	qRT-PCR
oshC Rev-qRT	GGAGAAGGCCTTGGTGTCTCAAAC	qRT-PCR
oshD FW-qRT	AGCCAACAGGCAATCCGGAGAAC	qRT-PCR
oshD Rev-qRT	TGAGGTTGATCAGTACATGGACGC	qRT-PCR
oshE FW-qRT	AAAGAACGAGGAGTGAAGCCGC	qRT-PCR
oshE Rev-qRT	GATGAAAGCGAGATCAAAGGCC	qRT-PCR
cyp51A-FW qRT-PCR	5'- GAGTAGCCCGTATTTACCCTTCGG- 3'	qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
cyp51A-Rev qRT-PCR	5'- CTCGTCTATGTTTCATGGGGCCTATG- 3'	qRT-PCR
cyp51B-FW qRT-PCR	5'-GACACTGTGTCCGAGTCGGAC-3'	qRT-PCR
cyp51B-Rev qRT-PCR	5'- GAAGCGCAACGTCACAACCAAAGC- 3'	qRT-PCR
LB doshA SB FW	GCCGGAAGAGATTTGGAATC	Sonde für Southern Blot, Deletion
LB doshA SB Rev	CCTCGGTAGGATGAAACACG	Sonde für Southern Blot, Deletion
LB doshB FW- SB	GATTCGACCTGTACGTCACCTTTCC	Sonde für Southern Blot, Deletion
LB doshB Re- SB	GTCAGTGACCTCCTACTGTTCCGC	Sonde für Southern Blot, Deletion
OshC LB del Fw	TCAGTGAGCTAATGCCTCC	Sonde für Southern Blot, Deletion
OshC LB del Rev	GGTGGCCATCTAGGCCGTTTATGGT TGCTCACCCC	Sonde für Southern Blot, Deletion
OshD LB del Fw	ACCCGTTTCGAGTACGAAGG	Sonde für Southern Blot, Deletion
OshD LB del Rev	GGTGGCCATCTAGGCCAGTGGGAA TGGGAAGACCG	Sonde für Southern Blot, Deletion
LB doshE FW- SB	5GGGGTGCTGTTTATAGGTAACGC	Sonde für Southern Blot, Deletion
LB doshE Re- SB	CGCCCGATTTTCAGTAACGTTAAGT	Sonde für Southern Blot, Deletion

Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen.

5.3.3 Herstellung von Deletionskonstrukten und zum Taggen von Genen via Fusion-PCR

Zur Herstellung von Deletionskonstrukten oder für das Taggen von Genen mit GFP oder unter der Kontrolle des jeweiligen natürlichen Promotors, wurde die Fusion-PCR Methode verwendet (Szewczyk *et al.*, 2006). Hier für diese Methode wurden zuerst drei Fragmente mittels PCR amplifiziert. Zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurden je ein Fragment mit einer Länge von etwa 1 kb der 5'-UTR-Region (LB; *left border*) und der 3'-UTR-Region (RB, *right border*) des Gens sowie die Markerkassette amplifiziert. Für das C-terminale taggen von Genen wurden jeweils das gewünschte Gen sowie die GFP-Kassette amplifiziert. Die verwendeten Primer die LB, Marker- oder Tag-Kassette und RB enthielten Linker mit den zueinander entsprechenden komplementären Sequenzen (Abbildung 71). Anschließend wurden mit der eigentlichen Fusion-PCR die schon hergestellten Fragmente miteinander verbunden. Dieses neue Fragment wurde direkt für eine Transformation in *A. nidulans* verwendet oder in den Vektor pJet zwischenkloniert.

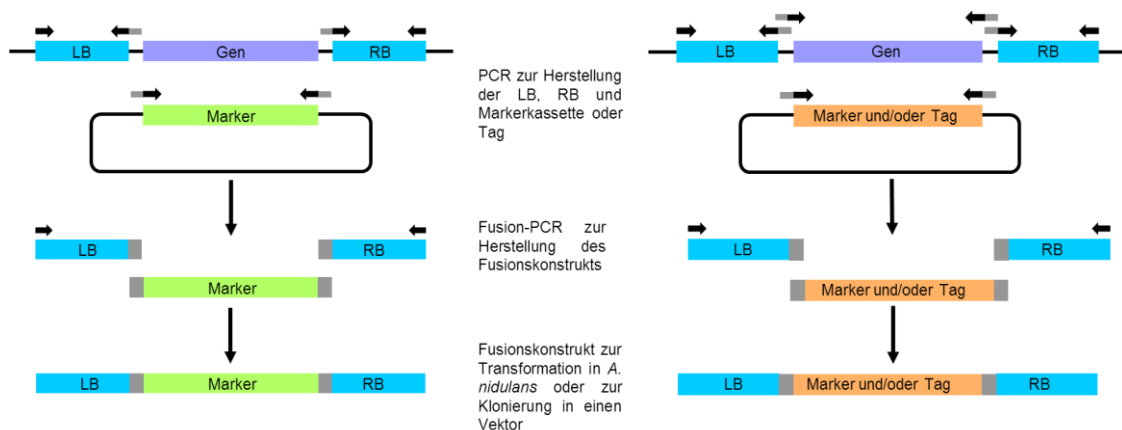


Abbildung 71: Schematische Darstellung für die Herstellung von Deletionskonstrukten anhand einer Fusion-PCR. Bestandteile für die Fusion-PCR wurden mittels einer PCR mit Primern, die einen Linker (hellgrau) besaßen amplifiziert, sowie auf die 5'-UTR (LB) und 3'-UTR (RB) des zu deletierenden oder zu taggenden Gen. Diese PCR-Produkte wurden anhand einer Fusion-PCR zu dem Fusion-Konstrukt amplifiziert und für eine Transformation in *A. nidulans* oder zur Klonierung in einen Vektor genutzt.

5.3.4 Hergestellte und verwendete Plasmide

Folgende Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit hergestellt oder verwendet.

Tabelle 11: Verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenzen oder Quellen
pCMB17apx	<i>alcA</i> (p)-GFP, for N-terminal tagging of GFP to proteins of interest; contains <i>Neurospora crassa</i>	(Efimov <i>et al.</i> , 2006)

Plasmid	Beschreibung	Referenzen oder Quellen
	<i>pyr-4</i>	
pJET1.2/blunt	Klonierungsvektor	Fermentas
pRM83	<i>myoV::mcherry::pyrG</i> , für C-terminales tagging von <i>mcherry-pyrG</i> für Proteine von Interesse	Raphael Mank, unveröffentlicht
pNB1	<i>alcA(p)-gfp-oshA, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB2	<i>alcA(p)-gfp-oshB, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB3	<i>alcA(p)-gfp-oshC, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB5	<i>alcA(p)-gfp-oshD, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB6	<i>alcA(p)-gfp-oshE, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB7	<i>alcA(p)-oshE-gfp, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB8	<i>oshB(p)-gfp-oshB, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB9	<i>oshE(p)-gfp-oshE, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB10	<i>oshA(p)-gfp-oshA, pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNB11	<i>oshC(p)-oshC-oshC(t), pyr4</i>	Diese Arbeit
pNB12	<i>oshD(p)-oshD-oshD(t), pyr4</i>	Diese Arbeit
pHH2	pJet mit <i>sec63::mcherry, pyrG</i>	Diese Arbeit (Hanna Haag, im Rahmen einer Bachelor Arbeit)
pHH3	pJet mit Δ <i>oshA::pyroA</i>	Diese Arbeit (Hanna Haag, im Rahmen einer Bachelor Arbeit)

5.3.5 *E. coli* Transformation mit anschließender Plasmid-DNA-Präparation

Die Transformation wurde mit chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen durchgeführt, welche bei -80 °C gelagert und auf Eis aufgetaut wurden. Der Ligationsansatz (10µl) wurde zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Im Anschluss inkubierten die Zellen für 30 min auf Eis. Der Hitzeschock wurde in einem 42 °C warmen Wasserbad für 50 sec durchgeführt, um darauf 500 µl SOC-Medium zum Ansatz hinzuzugeben und es eine Stunde bei 37 °C und 180 rpm zu inkubieren. Das Ausplattieren erfolgte auf einem LB-Medium mit entsprechender Antibiotikakonzentration.

Tabelle 12: Lösungen für Plasmid-DNA-Präparation

Lösung	Zusammensetzung
Lösung I	50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA 100µg/ml RNase A
Lösung II	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Lösung III	1,5 M KAc pH 4,8 Eisessig pH 4,8
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0

Eine Plasmid-DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Minipräparation) wurde durchgeführt, um Transformanten einer Klonierung zu testen. Die gewachsenen Kolonien wurden mit einem Zahnstocher gepickt und in je 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in Glasröhrchen über Nacht bei 37° C und 180 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 2 ml in Eppendorf-Gefäße überführt und für 2 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Das Aufschließen der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 200 µl der Lösung II und die Fällung der Proteine erfolgte durch die Zugabe von 200 µl der Lösung III, welche Kaliumacetat enthielt, für 5 min auf Eis. Um die Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA zu präzipitieren, wurde 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde durch Dekantieren in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, welches 500 µl Isopropanol enthielt und für 2 min auf Eis inkubiert wurde. Durch das Mischen der Lösungen wurde die Plasmid-DNA gefällt. Um die DNA als Pellet zu erhalten, wurde für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet durch die Zugabe von 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und 5 min bei 13000 rpm und 4 °C erneut abzentrifugiert. Nachdem das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet worden ist, wurde es in 50 µl TE-Puffer auf einem Schüttelheizblock bei 68° C für 10 min gelöst. Eine Überprüfung der Plasmid-DNA fand im Anschluss durch einen Restriktionsverdau statt.

Die Plasmid-DNA-Präparationen im großen Maßstab wurden anhand von 50 ml Übernachtskultur mit einem Kit nach Herstellerangaben (Nucleobond AX100; Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Die Reinheit und Konzentration der insolierten DNA wurde durch Absorptionsmessungen bei 260/280 nm im Nanodrop-Spectrophotometer (Typ ND-100, Peqlab) bestimmt.

5.3.6 Herstellung von *A. nidulans* Protoplasten und Transformation von Plasmiden oder PCR-Produkten

Tabelle 13: Lösungen für die Herstellung von Protoplasten und die Transformation von *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung für 100 ml Medium
Lösung 2	29,8 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 3,6 ml Na ₂ HPO ₄ (0,2M) 1,4 ml NaH ₂ PO ₄ (0,2M) pH ~ 5,5 Steril filtrieren
Lösung 5	10,9 g Sorbitol (0,6M) 10 ml Tris-HCl (1M), pH 7,5 autoklavieren
Lösung 6	18,22 g Sorbitol (1M) 1 ml TrisCl 1M, pH 7,5 autoklavieren
Lösung 7	18,22 g Sorbitol (1M) 1 ml TrisCl 1M, pH 7,5 1 ml CaCl ₂ 1M autoklavieren
Lösung 8	60g PEG 4000 oder PEG 6000 0,5 ml TrisCl 1M, pH 7,5 1 ml CaCl ₂ 1M autoklavieren

In einem 1 l Erlenmeyerkolben wurden für die Transformation 300 ml MM mit entsprechenden Auxotrophiemarkern versehen und mit einer Sporensuspension des zu transformierenden *A. nidulans* Stammes TN02A3 oder einer der *osh*-Deletionsstämme inokuliert. Der Ansatz inkubierte über Nacht bei 30° C und 180 rpm. Das gewachsene Myzel wurde über steriles Miracloth in einem Trichter abfiltriert und mit sterilem Wasser gewaschen. In einem sterilen 100 ml Kolben wurde ungefähr 1 g Myzel überführt und mit 5 ml Lösung 2 versetzt. Zu diesem Ansatz wurde 150 mg Glucanex (Vino Tast® Pro, Novozymes, Dänemark) zur Verdauung der Zellwände gegeben, kurz gevortext und für 1,5 h bei 30° C und 100 rpm geschüttelt. Nach Überprüfung der Lösung auf Protoplasten unter dem Mikroskop wurde anschließend die Protoplasten Suspension in ein steriles 50 ml Falcon überführt und mit 10 ml Lösung 5 vorsichtig überschichtet. Während der Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Universal 320 R von Hettich, Tuttlingen) sammelten sich die Protoplasten in der gebildeten Interphase an. Die Protoplasten wurden mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen, in ein neues steriles 50 ml Falcon überführt und mit der doppelten Menge an Lösung 6 versehen. Nach dem Abzentrifugieren bei 3000 rpm, 4 °C und 15 min wurde das Protoplasten Pellet in 1 ml

Lösung 6 resuspendiert und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Durch erneutes fünfminütiges Abzentrifugieren bei 4 °C und 2800 rcf wurde der Überstand entfernt und das Pellet in mindestens 200 µl Lösung 7 gelöst. Für jede Transformation wurde zu je 200 µl der Protoplasten Lösung 5 – 10 µg DNA oder 2 – 4 µg PCR-Produkt und 50 µl Lösung 8 gegeben und vorsichtig durch rollen des Falcons vermischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut 1 ml Lösung 8 zugegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde das Falcon mit 4 ml Lösung 7 und 10 ml MMR-Top-Agar aufgefüllt. Die Protoplasten-Agar-Suspension wurde auf je zwei Selektionsplatten mit MMR-Medium und entsprechenden Auxotrophiemarkern überführt. Zusätzlich wurden Positiv- und Negativkontrollen angefertigt. Die Platten wurden für drei Tage bei 30 °C inkubiert.

5.3.7 Komplementation und Kreuzungen von *A. nidulans* Stämmen mit den *osh*-Deletionsmutanten

Zur Komplementation der Deletionsstämme wurden zuerst die Sequenzen, welche die Promotor-Sequenz, den *open reading frame* (ORF) des Gens und die Terminator Sequenz enthielt, mittels PCR amplifiziert. Die Forward- und Reverse-Primer für die Amplifikation dieser Sequenzen enthielten jeweils spezifische Restriktionsschnittstellen, welche ebenso im verwendeten Vektor enthalten waren. Nach dem Erhalt der Sequenz wurden die Fragmente und der zu verwendete Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und zusammen ligiert. Das entstandene Plasmid wurde in den entsprechenden Deletionsstamm transformiert und mit einer analytischen PCR auf die gDNA auf Richtigkeit hin überprüft.

Für die Kreuzungen wurde jeder Kreuzungspartner gepickt, nebeneinander in quadratischer Form auf einer Platte mit allen benötigten Markern angeimpft und für 1-2 Tage bei 37 °C inkubiert. Trafen die beiden Kolonien im Randbereich aufeinander, so wurde diese Grenzschicht mit den Berührungspunkten der Hyphen aus dem Agar als Agarblöckchen ausgeschnitten. Diese wurden anschließend auf MM Platten mit den geeigneten Auxotrophiemarkern, welche nur ein Wachstum des Heterokaryons erlaubten, überführt. Um die sexuelle Entwicklung durch einen höheren CO₂-Partialdruck einzuleiten, wurde die Platten mit Parafilm verschlossen. Um die Kleistothezien-Bildung anzuregen, wurden die Platten in Alufolie eingewickelt. Die Platten wurden bei 37 °C für ca. 14 Tage bis zur Ausbildung reifer Kleistothezien inkubiert. Mit einer Impfnadel wurden die Kleistothezien gepickt und über eine Agarplatte gerollt, um sie von den umgebenden Hüllzellen zu befreien. Jedes Kleistothezium wurde in ein Eppendorf Gefäß mit 1 ml sterilem dH₂O überführt und zerdrückt, damit die Ascosporen freigesetzt wurden. Von dieser Ascosporen-Suspension wurden 50 µl auf MM Platten ausplattiert, um nach Kolonien zu selektieren, welche die benötigten Marker enthielten. Die Platten inkubierte man für 3 Tage bei 37 °C.

5.3.8 Präparation von genomischer DNA und Southern Blot von *A. nidulans* Stämmen

Tabelle 14: Lösungen zur Isolierung genomischer DNA

Lösung	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA 0,2 % SDS
8M KAc pH 4,2	29,45 g Kalium-Acetat in 60 ml ddH ₂ O lösen 11,5 ml Eisessig zugeben pH 4,2 mit konzentrierter HCl einstellen auf 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen, autoklavieren
TE-Puffer pH 7,5	10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA

Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurden *A. nidulans*-Sporen in einer Petrischale, welche ca. 20 ml MM enthielt, inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gebildete Kahmhaut wurde abgenommen, zwischen Papiertüchern trocken gepresst und unter Zugabe von Flüssigstickstoff in einem Mörser verarbeitet. Das fein gemörserte Myzel wurde in ein Eppendorf Gefäß mit einem 1 ml Extraktionspuffer überführt, gut gevortext und 1,5 h bei 68 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dem fünfminütigen Abzentrifugieren bei 13000 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und 60 µl einer 8M Kalium-Acetat-Lösung zugegeben. Anschließend wurde alles für 5 min auf Eis inkubiert, um die Proteine zu fällen, zentrifugierte erneut 5 min bei 13000 rpm ab und überführte den Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß. Das gleiche Volumen Isopropanol zur Fällung der gDNA wurde zugegeben, bei 13000 rpm für 5 min abzentrifugiert und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Die bei Raumtemperatur getrocknete isolierte gDNA wurde in 50 – 100 µl TE-Puffer gelöst.

Tabelle 15: Lösungen für einen Southern Blot

Lösung	Zusammensetzung für 1l Lösung
0,25 M HCl	20,7 ml von 37% HCl
Denaturierung	87,6 g/l NaCl (1,5 M) 16 g/l NaOH (0,4 M)
Renaturierung	87,6 g/l NaCl (1,5 M) 44,4 g/l Tris-HCl (282 mM) 26,5 g/l Tris-Base (218 mM)
SSC (20 x)	876,5 g NaCl (3,0 M) 441,0 g Na-citrate*2H ₂ O (0,3 M) pH 7,0
Southern	500 ml 1M Na-phosphate Puffer (0,5 M); pH 7,0

Lösung	Zusammensetzung für 1l Lösung
Hybridisierungspuffer	70 g SDS (7 %) autoklavieren
1M Natriumphosphat Puffer	Lösung 1: 177,99 g/l Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O (1M) Lösung 2: 156,01 g/l NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O (1M) Lösung 1 in ein Becherglas füllen und mit Lösung 2 auffüllen bis ein pH von 7,0 erreicht ist.
20x SSPE	175,3 g/l NaCl (3 mM) 27,6 g/l Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O (227 mM) 7,4 g/l Na ₂ -EDTA*2H ₂ O (20 mM) pH 7,4 mit NaOH einstellen
DIG1 (1x)	11,61 g/l Maleinsäure (0,1M) 8,77 g/l NaCl (0,15 M) pH 7,5 mit 5M NaOH einstellen; autoklavieren
DIG Wash (1x)	0,3% (v/v) Tween-20 in DIG1 (3 ml Tween-20 in 997 ml DIG1) Frisch ansetzen!
DIG2 (1x)	1x Blocking Solution: 5 % Milchpulver in DIG1
DIG3 (1x)	5,84 g/l NaCl (0,1M) 10,17 g/l MgCl ₂ *6H ₂ O (0,05M) pH 9,5 mit Tris-HCl (pH 9,5) einstellen, autoklavieren
Antikörper-DIG2-Lösung	9,999 ml DIG3 1 µl DIG-Antikörper (gekoppelt an alkalische Phosphatase)
CDP-Star Lösung	20 µl CDP-Star (Roch, Mannheim) in 10 ml DIG3 (1:500)

Für den Southern Blot wurden 10 µg gDNA über Nacht mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Am nächsten Tag wurde die gDNA auf ein 0,8 %-iges Gel geladen und bei 100 V für ca. 2 h aufgetrennt. Nach dem Färben im Ethidiumbromid-Bad wurde der Marker mit Hilfe einer Pipettenspitze im Gel markiert. Das Gel wurde zuerst in 0,25 M HCl für 20 min auf einem Schüttler gewaschen, danach kurz in Wasser gespült und für 20 min auf einem Schüttler in Denaturierungslösung gewaschen. Nach kurzem Spülen in Wasser wurde das Gel mit Renaturierungslösung für 20 min auf einem Schüttler gewaschen. Der Blot wurde aufgebaut und über Nacht die DNA auf eine Nylonmembran geblotet. Um nach dem Abbau des Blottes die DNA dauerhaft auf der Nylonmembran zu fixieren, wurde die Membran mit 0,120 mJ UV bestrahlt. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte für 30 min in einem Hybridisierungsröhrchen mit 40 ml Southern Hybridisierungspuffer in dem Hybridisierungssofen HB-1000 (UVP Ltd, Cambridge) bei 65 °C. Die DIG-markierte Sonde wurde mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche (Mannheim) nach

Angaben des Herstellers hergestellt. Die DIG-markierte Sonde wurde bei 95 °C für 10 min denaturiert. Nach der Prähybridisierung wurde der Puffer entfernt und es erfolgte die Hybridisierung für 16 h bei 65 °C mit 15 ml Southern Hybridisierungspuffer und 30 µl DIG-markierte Sonde. Die Sonde wurde bei – 20 °C gelagert und konnte bei Bedarf erneut wiederverwendet werden. Die Membran wurde bei 65 °C für je 15 min zuerst mit 2 x SSPE mit 0,1 % SDS, danach mit 1 x SSPE mit 0,1 % SDS und zum Schluss mit 0,1 x SSPE mit 0,1 % SDS gewaschen. Die folgenden Schritte wurden bei 25 °C durchgeführt: Die 20 ml des Puffers DIG-Wash wurden für 5 min mit der Membran gewaschen. Nach Entfernung der gesamten Lösungsreste inkubierte die Membran für 30 min mit 25 ml der Blocking Solution DIG2. Für weitere 30 min wurde die Antikörper-DIG2-Lösung inkubiert und im Anschluss zweimal mit je 50 ml DIG-Wash gewaschen. Die Membran wurde für 5 min mit 40 ml DIG3 äquilibriert und danach mit 10 ml CDP-Star Lösung inkubiert. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit Hilfe des Chemi-Smart Chemilumineszenzsystems (Pqlab), um die Signale zu detektieren.

5.3.9 Isolierung von RNA aus *A. nidulans* Stämmen und quantitative Real-time PCR

Für die RNA-Isolierung wurden von jedem Stamm Sporen in einer Petrischale mit entsprechendem Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das gewachsene Myzel wurde abgenommen, trocken gepresst, in ein mit Glasperlen-befülltes Eppendorf Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren.

Für die Isolation der RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden der Wildtyp und die *osh*-Deletionsstämme über Nacht in Flüssigmedium bei 37 °C und 180 rpm angeimpft. Das Myzel wurde abfiltriert und auf Agarplatten mit Folie überführt. Nach 0, 6, 8, 12, und 24 h wurde das Myzel abgenommen, in mit Glasperlen-befüllte Eppendorf Gefäße überführt und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Das Myzel zum Zeitpunkt 0h wurde direkt nach dem Abfiltrieren in flüssigem Stickstoff Schock gefroren.

Die RNA-Isolation wurde für alle Myzelien gleich durchgeführt. Dazu wurde das Myzel mit 600 µl RLT-Puffer aus dem Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) versehen, gut gevortext, 5 min in einer Schwingmühle MM200 (Retsch, Haan) aufgeschlossen und 5 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Nach dem Transferieren des Überstandes in ein neues Eppendorf Gefäß erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 3 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, mit 500 µl 100 % Ethanol versehen und invertiert. Die Lösung wurde auf eine RNeasy spin Säule überführt, bei 10000 rpm und 15 s abzentrifugiert. Auf die Säule wurden 700 µl Puffer RW1 zugegeben und wie im Schritt zuvor abzentrifugiert. Im Anschluss wurden zweimal 500 µl RPE-Puffer zum Waschen auf die Säule pipettiert. Beim ersten Waschschrift wurde 15 s bei 10000 rpm abzentrifugiert und beim zweiten Waschschrift 2 min bei 10000 rpm. Anschließend wurde die Säule auf ein Eppendorf Gefäß gesetzt. Das Volumen von 30 µl RNase-freiem Wasser wurde direkt auf die Säule pipettiert und

zum Eluieren der RNA für 1 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Von dem Eluat wurden 5 µl für das spätere Agarosegel entnommen.

Um die noch vorhandene gDNA aus der RNA-Lösung zu entfernen, wurde das Eluat mit dem Ambion Turbo DNA Free Kit (Invitrogen) verdaut. Als Gesamtvolumen wurden 25 µl verwendet. 2,5 µl 10-fach TURBO DNase Puffer und 1 µl TURBO DNase wurden zur RNA gegeben und sanft gemischt. Die Inkubation fand bei 37 °C für 30 min statt. Der Ansatz wurde mit 2,85 µl DNase Inaktivierungslösung gut gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die Lösung ab und zu gemischt und bei 10000 rcf für 1,5 min abzentrifugiert. Nach dem Überführen der Lösung in ein neues Nuklease-freies Reaktionsgefäß wurden für ein Agarosegel 5 µl entnommen und der Rest der RNA bei - 80 °C eingefroren. Die RNA, die vor und nach dem DNase-Verdau abgenommen wurde, wurde auf ein 1,2 %-iges Agarosegel geladen, welches mit DEPC-H₂O-haltigem TAE-Puffer angesetzt wurde.

Für die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) wurde das SensiFast SYBR und Fluorescein One Step Kit (Bioline) und das iCycler iQ Detektionssystem (Bio-Rad) verwendet. Für die 25 µl Reaktion wurden 10 µM Primer, 100 ng RNA, 0,25 µl Reverse Transkriptase und 0,5 µl RNase Inhibitor eingesetzt. Als Haushaltsgen wurde das Histon H2B und für die Analyse der Ergebnisse die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Es wurden je drei technische und biologische Replikate benutzt.

5.3.10 Bestimmung der Biomasse und der Ergosterolkonzentration

Tabelle 16: Lösungen zur Ergosterolisolierung

Lösung	Zusammensetzung für 100 ml Lösung
Methanol-Ethanol Lösung (3:2)	60 ml Methanol 40 ml Ethanol
25 % alkoholische Kaliumhydroxid Lösung	25 g Kaliumhydroxid auf 100 ml mit Methanol-Ethanol Lösung auffüllen
n-Pentan	n-Pentan für HPLC gebrauchsfertig

Zur Bestimmung der Biomasse und Messung der Ergosterolkonzentration wurden für den Wildtyp-Stamm TN02A3 und die Deletionsstämme *oshA-E* 50 ml Flüssigmedium angeimpft. Jeder Stamm wurde im MM mit Glukose und entsprechenden Auxotrophiemarkern mit $2,5 \cdot 10^5$ Sporen pro 50 ml Medium inokuliert und für 20 Stunden mit 180 rpm bei 37 °C inkubiert. Die Myzelien wurden durch Abfiltrieren geerntet und anschließend gewaschen. Für die Biomassenbestimmung wurden die Myzelien für einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet um anschließend das Trockengewicht mit einer Feinwaage zu bestimmen. Die Myzelien für die Ergosterolisolation wurden mit Papiertüchern trocken gepresst und die anschließende Isolierung wurde wie von der Arbeitsgruppe Rodriguez-Tudela (Alcazar-Fuoli et al., 2008) beschrieben durchgeführt. Mit einer Feinwaage wurde das Trockengewicht der

Myzelien in 15 ml Falcons bestimmt und die Differenz des vorher gewogenen Falcones ermittelt, welches das semi-Trockengehalt des Myzels ergab. Eine 25 % alkoholische Kaliumhydroxid-Lösung (3:2 Methanol:Ethanol) wurde in die Falcons gegeben, um das Myzel zu trocknen, und durch vortexen gemischt. Nach einer einstündigen Inkubation im Wasserbad bei 85 °C wurde 1 ml steriles H₂O und 3 ml Pentan, welches die Isolierung von Fettsäuren ermöglicht, zugegeben und kräftig für 3 min gevortext. Durch das Vortexen entstanden zwei Schichten, wovon die obere Pentan-Schicht die isolierten Fettsäuren enthielt. Diese obere Schicht wurde in ein sauberes Glasfläschchen (4 ml) gegeben und unter dem Abzug das Pentan verdampft. Die in dem Fläschchen zurück gebliebenen Fettsäuren wurden in 1 ml Methanol durch kräftiges Vortexen aufgenommen und anschließend durch einen Polytetrafluoroethylen- (PTFE) Filter (0,45 µm Porengröße; Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG) filtriert. Die Messung des Ergosterols erfolgte mit einer Flexar LC HPLC (Perkin Elmer, Rodgau) und der dazugehörigen Chromera Software. Das Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*)-System beinhaltet einen manuellen Injektor (20 µl), eine FXBP-Pumpe-2, eine *Brownlee analytical* C18 Säule (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) und einen PDA UHLC UV-Licht-Detektor. Das filtrierte Fettsäure-Methanol-Gemisch wurde mit einer Durchflussrate von 1 ml/min etabliert. Der UV-Licht-Detektor zeichnete die Peak-Höhe und Peak-Größe bei einer bestimmten Wellenlänge auf, welche über das Chomera Programm angezeigt wurde. Zur Bestimmung des Ergosterolgehalts in den Mutanten bzw. im Wildtyp wurde zuerst ein Standard (150 µl) mit einer bestimmten Ergosterolkonzentration geladen. Die Messung erfolgte anhand einer Wellenlänge von 282 nm und einem Peak, welcher in mAU/min (*milli absorption units per minute*) angegeben wurde. Im Anschluss wurden die Isolate (je 150 µl) gemessen. Die Bestimmung der Ergosterolkonzentration der Isolate erfolgte über ihre Peakfläche und die Peakfläche des Standards mit seiner bestimmten Ergosterolkonzentration. Zusätzlich wurde Konzentration pro Gramm Pilz-Trockengewicht (semi-Trockengewicht) ermittelt.

5.4 Methoden zur Bestimmung der Sporenanzahl sowie Wachstum- und ergosterolassoziierte Wirkstoff-Assays von *A. nidulans* Stämmen

5.4.1 Bestimmung der Sporenanzahl

Um die Sporenanzahl bestimmen zu können, wurden von den *A. nidulans* Stämmen TN02A3 und den Deletionsstämmen *oshA-E* Sporensuspensionen hergestellt. Ausgezählt wurden die Sporen mit einer Helber-Zählkammer.

Zum einen wurden aus der Sporensuspension die Sporen mit einer Sporendichte von $2,5 \cdot 10^5$ Sporen in 5 ml Topagar (0,8 %) inokuliert. Der Topagar wurde auf MM Platten

mit entsprechenden Auxotrophiemarkern überführt, mit Flüssigmedium überschichtet und im Dunkeln für 20 h inkubiert (Purschwitz *et al.*, 2008). Anschließend wurde das Medium vorsichtig entfernt (Purschwitz *et al.*, 2008) und für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden mit Hilfe einer 1 ml Pipettenspitze je 3 Agarblöckchen von verschiedenen Stellen der Agarplatte ausgestanzt und jeweils in ein Eppi mit einer 1 ml Lösung aus H₂O und Tween 20 (1 %) überführt. Nach 30 sec vortexen wurden die Eppis 10 min bei 50°C auf einem Heizblock schüttelnd inkubiert, um die Sporen gleichmäßig vom Agar abzulösen. Die Sporenanzahl wurde nach nochmaligem 30 sec Vortexen über das Auszählen in einer Helber-Zählkammer bestimmt und die Sporenanzahl pro cm² bestimmt.

Zum Anderen wurden die Sporensuspensionen mit der gleichen Sporendichte in 50 ml Flüssigmedium inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Myzel wurde für die Biomassenbestimmung und die Ergosterolisolation verwendet.

Des Weiteren wurden 10 µl der Sporensuspensionen mit einer Sporendichte von $2,5 \cdot 10^5$ Sporen pro 100 µl für wachstums- und ergosterolassozierte Wirkstoff-Assays verwendet.

5.4.2 Verschiedene Wachstums-Assays

Zur Untersuchung des Wachstums der Deletionsstämme *oshA-E* und des Wildtyp-Stammes TN02A3 dienten Wachstums-Assays mit unterschiedlichen Medien und verschiedenen Temperaturen.

Das Wachstumsverhalten des Wildtyp Stammes und der *osh*-Deletionsstämme in Abhängigkeit von Calcofluor White (CFW) wurden auf MM mit Glukose und unterschiedlichen CFW-Konzentrationen (0 µM – 100 µM) analysiert. Die Stammlösung von CFW enthielt eine Konzentration von 1 mg CFW in 1 ml H₂O. Je 10 µl einer Sporensuspension mit der Sporendichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen wurden auf die entsprechenden Platten punktinokuliert und für 3 Tage bei 37 °C inkubiert.

Um den Einfluss der Deletionen der Osh-Transporter auf mögliche Membrantransporter an den Hyphenspitzen zu testen, wurde das Wachstum auf verschiedenen MM Agarplatten untersucht. Diese Platten wurden mit verschiedenen Kohlenstoff (C)- und Stickstoff (N)- Quellen versehen. Als C-Quellen dienten Glukose, Glycerin, Threonin, Arabinose, Fructose, Galaktose, Glycerin, Lactose, Maltose, Saccharose und Inositol. Die verwendeten N-Quellen waren Ammoniumnitrat, Ammoniumtatrat, Urea, Natriumacetat und Natriumnitrat. Ammoniumactetat wurde sowohl als C- als auch als N-Quelle verwendet. Auf die Platten wurden je 10 µl einer Sporensuspension mit der Sporendichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen punktinokuliert. Eine Inkubation der Platten erfolgte für 3 Tage bei 37 °C.

Verschiedene Temperaturen dienten der Stress-Induktion, unter denen das Wachstumsverhalten der Deletionsstämme *oshA-E* und des Wildtyp-Stammes untersucht werden sollten. Es wurden je 10 µl einer Sporensuspension mit einer

Sporendichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen auf die Platten punktinokuliert und bei 28 °C, 37 °C und 42 °C für 3 Tage inkubiert.

Das Wachstum der GFP-Osh-Stämme und des Wildtyps wurden auf Glukose, Glycerin und Threonin auf die Funktionalität des *alcA*-Promotors hin überprüft. Dazu wurden MM Platten mit diesen drei unterschiedlichen C-Quellen angefertigt und 10 µl einer Sporensuspension mit $2,5 \cdot 10^4$ Sporen auf die Platte gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C für 3 Tage.

Diese verschiedenen Wachstum-Assays wurden für alle Testbedingung und alle Stämme jeweils dreimal durchgeführt sowie jeweils den Durchmesser der Kolonie bestimmt.

5.4.3 Behandlung mit ergosterolassozierten Wirkstoffen

Die Sensitivität der *A. nidulans osh*-Deletionsstämmen und des Wildtyp Stammes wurde mit verschiedenen ergosterolassozierten Wirkstoffen getestet.

Für die Behandlung mit Voriconazol (Sigma) wurden Petrischalen mit entsprechendem MM, den entsprechenden Auxotrophiemarkern und Voriconazol Konzentrationen von 0,1 – 1 µM verwendet. Auf die Platten wurden je 10 µl einer Sporensuspension mit der Sporendichte von $2,5 \cdot 10^5$ Sporen pro 100 µl punktinokuliert. Die Platten wurden für eine Woche bei 37 °C inkubiert und die Durchmesser der Kolonien täglich zur gleichen Zeit gemessen.

Die *A. nidulans* Stämme wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit den Wirkstoffen AmphoterinB (AmB; Roth), Filipin (Sigma) und Methyl-β-cyclodextrin (MβCD; Sigma) untersucht. AmB und Filipin wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und Stocklösungen von 10 und 100 mM angesetzt. In ddH₂O wurde MβCD gelöst und eine 100 mM Stocklösung angesetzt. Als Redox-Indikator wurde Resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide; Riedel-de Haën, Seelze) in einer Endkonzentration von 100 µM (Mania *et al.*, 2010) eingesetzt. In jedes Well der Mikrotiterplatte wurde 200 µl MM mit entsprechenden Auxotrophiemarkern, 100 µM Resazurin sowie $2,5 \cdot 10^4$ Sporen jedes Stammes gegeben. Zusätzlich wurden verschiedenen Konzentrationen der Antimykotika hinzu gegeben. AmB und Filipin wurden in einer Endkonzentration von 0,5 – 200 µM eingesetzt sowie MβCD von 0,5 – 10 mM. Die Platten wurden stehend bei 37 °C bis zu 48 h inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Bilder der Platten aufgenommen.

AmB	WT	$\Delta oshB$	$\Delta oshC$	$\Delta oshD$	$\Delta oshE$		MBCD	WT	$\Delta oshB$	$\Delta oshC$	$\Delta oshD$	$\Delta oshE$	
μM	1	2	3	4	5	line	mM	8	9	10	11	12	line
0						A	0						A
0,5						B	0,5						B
1						C	1						C
10						D	2						D
20						E	4						E
50						F	6						F
100						G	8						G
200						H	10						H

Abbildung 72: Schematische Darstellung eines Pipettierschemas einer Mikrotiterplatte mit verschiedenen Konzentrationen von AmB (AmphotericinB) und MBCD (Methyl- β -cyclodextrin). Die unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen wurden von oben nach unten und die Stämme von links nach rechts pipettiert.

5.5 Mikroskopische Methoden und Färbelösungen

Auf Deckgläschen wurden *A. nidulans* Keimlinge in einer Petrischale mit 500 μl MM mit 2 %-iger Glukose und entsprechenden Auxotrophiemarkern über Nacht bei 28°C angezogen. Stämme, die das zu untersuchende Gen unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor exprimierten, wurden in Mikroskopiemedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern und 2 % Glycerin, 2 % Glukose oder 2 % Threonin mikroskopiert. Die Deckgläschen wurden mit den Hyphen nach unten auf Objektträger gelegt, mit Immersionsöl beschichtet und mikroskopiert.

Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Zeiss Imager.Z1 und der AxioCam MRM Kamera unter Verwendung eines 63-er Immersionsöl-Objektivs durchgeführt. Das DIC-Verfahren (*Differential Interference Contrast*) wurde für die Hellfeld-Aufnahmen unter Verwendung des 5-er, 10-er Objektivs bzw. des 63-er Immersionsöl-Objektivs verwendet. Alle Bilder wurden über die Software AxioVision oder Zen aufgenommen. Als Lichtquelle dienten die HBO103 Quecksilber-Dampflampe (Osram) oder HXP120 (Zeiss). Die Kymographen oder Bildausschnitte zur Vergrößerung wurden mit der Software ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012) angefertigt.

Die Hyphen wurden mit unterschiedlichen Färbelösungen angefärbt. Für die Filipin-Färbung wurde 1 μg / ml Filipin verwendet und für die Dauer von 5 min gefärbt. Bei der Zellwandfärbung mit Calcofluor White wurden 5 μl der Lösung verwendet. Der verwendete Filter hatte eine Wellenlänge von 353 nm für die Anregung und 465 nm für die Emission.

Zellkerne wurden durch die Verwendung eines Tropfens DAPI Lösung (4,6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt und für die Dauer von 5 min inkubiert. DAPI interkaliert in die AT-reichen Regionen der DNA.

Zur Färbung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wurde 1 µl des ER-Tracker™ Red zu den Zellen auf die Deckgläschen geben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend in MM mit entsprechenden Markern gewaschen und mikroskopiert.

Zur Färbung der Vakuolen wurde der CellTracker™ Blue CMAC verwendet. Diese Färbelösung kann frei durch Membranen diffundieren und wird in der Zelle zu einem zellundurchlässigen Reaktionsprodukt umgewandelt (Sebastia *et al.*, 2003). Es wurde 1 µl der Färbelösung zu den Hyphen auf das Deckgläschen gegeben und bei RT für 20 inkubiert. Das Deckgläschen wurde in Medium gewaschen und mikroskopiert.

Hyphen der *osh*-Deletionsstämmen und des Wildtyps, welche für die Behandlung mit Voriconazole mikroskopiert wurden, wurden in MM mit 2 % Glukose, den entsprechenden Auxotrophiemarkern und 0,1 µM Voriconazol angezogen.

Die *osh*-Deletionsstämmen wurden zur Untersuchung der Hyphen Morphologie auf Platten mikroskopiert. Dafür wurden MM Platten mit 2 % Glukose und entsprechenden Auxotrophiemarkern verwendet. Das Medium wurde dünn gegossen. Die Sporen des zu mikroskopierenden Stammes wurden durch das Picken mit einem Zahnstocher aufgenommen und auf die Platte durch Hineinstecken übertragen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht oder für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Platten mikroskopisch untersucht.

Tabelle 17: Färbe-Stocklösung für *A. nidulans*

Lösung	Zusammensetzung für 1 ml
Calcofluor White M2R (CFW)	1 mg CFW in 1 ml H ₂ O
Filipin	10 mg Filipin in 1 ml DMSO oder H ₂ O
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium mit DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole), (Vector Laboratories, USA)	Konzentration: 1,5 µg / ml
ER-Tracker™ Red ((BODIPY® TR Glibenclamide) (Invitrogen)	1 mM ER-Tracker in DMSO
CellTracker™ Blue CMAC (Life Technologies, Darmstadt)	10 mM CMAC in DMSO

6 Literaturverzeichnis

Abenza, J. F., Galindo, A., Pantazopoulou, A., Gil, C., de los Rios, V. & Penalva, 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.

Adams, T. H., Boylan, M. T. & Timberlake, W. E. (1988). brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**, 353-362.

Akhmanova, A. & Hoogenraad, C. C. (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 47-54.

Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Garcia-Effron, G., Lopez, J. F., Grimalt, J. O., Cuenca-Estrella, J. M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2008). Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* **73**, 339-347.

Alcazar-Fuoli, L. & Mellado, E. (2012). Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Front Microbiol* **3**, 439.

Alfaro, G., Johansen, J., Dighe, S. A., Duamel, G., Kozminski, K. G. & Beh, C. T. (2011). The sterol-binding protein Kes1/Osh4p is a regulator of polarized exocytosis. *Traffic* **12**, 1521-1536.

Alvarez, F. J., Douglas, L. M. & Konopka, J. B. (2007). Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. *Eukaryot Cell* **6**, 755-763.

Amako, Y., Sarkeshik, A., Hotta, H., Yates, J., 3rd & Siddiqui, A. (2009). Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* **83**, 9237-9246.

Anantharaman, V. & Aravind, L. (2002). The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol* **3**, research0023.

Anderson, T. M., Clay, M. C., Cioffi, A. G. & other authors (2014). Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol* **10**, 400-406.

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.

Archer, D. B., Connerton, I. F. & MacKenzie, D. A. (2008). Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **111**, 99-147.

Arnold, T. M., Dotson, E., Sarosi, G. A. & Hage, C. A. (2010). Traditional and emerging antifungal therapies. *Proc Am Thorac Soc* **7**, 222-228.

Auweter, S. D., Yu, H. B., Arena, E. T., Guttman, J. A. & Finlay, B. B. (2012). Oxysterol-binding protein (OSBP) enhances replication of intracellular *Salmonella* and

binds the *Salmonella* SPI-2 effector SseL via its N-terminus. *Microbes Infect* **14**, 148-154.

Bagnat, M. & Simons, K. (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14183-14188.

Banerji, S., Ngo, M., Lane, C. F., Robinson, C. A., Minogue, S. & Ridgway, N. D. (2010). Oxysterol binding protein-dependent activation of sphingomyelin synthesis in the golgi apparatus requires phosphatidylinositol 4-kinase IIalpha. *Mol Biol Cell* **21**, 4141-4150.

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.

Baumann, N. A., Sullivan, D. P., Ohvo-Rekila, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., Beh, C. T. & Menon, A. K. (2005). Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry* **44**, 5816-5826.

Beh, C. T., Cool, L., Phillips, J. & Rine, J. (2001). Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues. *Genetics* **157**, 1117-1140.

Beh, C. T. & Rine, J. (2004). A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution. *J Cell Sci* **117**, 2983-2996.

Beh, C. T., McMaster, C. R., Kozminski, K. G. & Menon, A. K. (2012). A detour for yeast oxysterol binding proteins. *J Biol Chem* **287**, 11481-11488.

Bennett, W. F., MacCallum, J. L., Hinner, M. J., Marrink, S. J. & Tieleman, D. P. (2009). Molecular view of cholesterol flip-flop and chemical potential in different membrane environments. *J Am Chem Soc* **131**, 12714-12720.

Berepiki, A., Lichius, A. & Read, N. D. (2011). Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol* **9**, 876-887.

Blosser, S. J. & Cramer, R. A. (2012). SREBP-dependent triazole susceptibility in *Aspergillus fumigatus* is mediated through direct transcriptional regulation of erg11A (*cyp51A*). *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 248-257.

Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., Zimmerman, C. R. & Timberlake, W. E. (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**, 3113-3118.

Bühler, N., Hagiwara, D. & Takeshita, N. (2015). Functional Analysis of Sterol Transporter Orthologues in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **14**, 908-921.

- Buied, A., Moore, C. B., Denning, D. W. & Bowyer, P. (2013).** High-level expression of *cyp51B* in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Antimicrob Chemother* **68**, 512-514.
- Carafoli, E. (2012).** The interplay of mitochondria with calcium: an historical appraisal. *Cell Calcium* **52**, 1-8.
- Chang, C. L., Hsieh, T. S., Yang, T. T., Rothberg, K. G., Azizoglu, D. B., Volk, E., Liao, J. C. & Liou, J. (2013).** Feedback regulation of receptor-induced Ca²⁺ signaling mediated by E-Syt1 and Nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Rep* **5**, 813-825.
- Chang, Y. C. & Timberlake, W. E. (1993).** Identification of *Aspergillus* *brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics* **133**, 29-38.
- Charman, M., Colbourne, T. R., Pietrangelo, A., Kreplak, L. & Ridgway, N. D. (2014).** Oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 (ORP4) is essential for cell proliferation and survival. *J Biol Chem* **289**, 15705-15717.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M. & Thevelein, J. M. (2014).** Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 254-299.
- de Brito, O. M. & Scorrano, L. (2008).** Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605-610.
- De Matteis, M. A. & Rega, L. R. (2015).** Endoplasmic reticulum-Golgi complex membrane contact sites. *Curr Opin Cell Biol* **35**, 43-50.
- de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastre, B., Bourguet, W., Antonny, B. & Drin, G. (2011).** Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J Cell Biol* **195**, 965-978.
- Diallinas, G. (2014).** Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Front Pharmacol* **5**, 207.
- Drabikowski, W., Lagwinska, E. & Sarzala, M. G. (1973).** Filipin as a fluorescent probe for the location of cholesterol in the membranes of fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **291**, 61-70.
- Du, X., Kumar, J., Ferguson, C. & other authors (2011).** A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J Cell Biol* **192**, 121-135.
- 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.

- Elbaz, Y. & Schuldiner, M. (2011).** Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites. *Trends Biochem Sci* **36**, 616-623.
- Evans, R. M. (1994).** Intermediate filaments and lipoprotein cholesterol. *Trends Cell Biol* **4**, 149-151.
- Fairn, G. D., Curwin, A. J., Stefan, C. J. & McMaster, C. R. (2007).** The oxysterol binding protein Kes1p regulates Golgi apparatus phosphatidylinositol-4-phosphate function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15352-15357.
- Fang, W., Yu, X., Wang, B., Zhou, H., Ouyang, H., Ming, J. & Jin, C. (2009).** Characterization of the *Aspergillus fumigatus* phosphomannose isomerase Pmi1 and its impact on cell wall synthesis and morphogenesis. *Microbiology* **155**, 3281-3293.
- Fischer, R. & Timberlake, W. E. (1995).** *Aspergillus nidulans* apsA (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein necessary for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol* **128**, 485-498.
- Fischer, R. & Braus, G. (2006).** Genomsequenz von Schimmelpilzen bringt Sex ans Licht. *BioSpektrum* **12**, 270-271.
- Fischer, R., Zekert, N. & Takeshita, N. (2008).** Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68**, 813-826.
- Gimpl, G. & Gehrig-Burger, K. (2007).** Cholesterol reporter molecules. *Biosci Rep* **27**, 335-358.
- Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O. & other authors (2013).** PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* **153**, 1494-1509.
- Goni, F. M. (2014).** The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1467-1476.
- Gurunathan, S., Marash, M., Weinberger, A. & Gerst, J. E. (2002).** t-SNARE phosphorylation regulates endocytosis in yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 1594-1607.
- Hambrock, A., Loffler-Walz, C. & Quast, U. (2002).** Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *Br J Pharmacol* **136**, 995-1004.
- Head, B. P., Patel, H. H. & Insel, P. A. (2014).** Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 532-545.
- Heald, R. & Nogales, E. (2002).** Microtubule dynamics. *J Cell Sci* **115**, 3-4.
- Heath, I. B. & Geitmann, A. (2000).** Cell biology of plant and fungal tip growth--getting to the point. *Plant Cell* **12**, 1513-1517.

- Helle, S. C., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A. H. & Kornmann, B. (2013).** Organization and function of membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 2526-2541.
- Herman, P., Vecer, J., Opekarova, M., Vesela, P., Jancikova, I., Zahumensky, J. & Malinsky, J. (2015).** Depolarization affects the lateral microdomain structure of yeast plasma membrane. *FEBS J* **282**, 419-434.
- Hernandez-Rodriguez, Y., Hastings, S. & Momany, M. (2012).** The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot Cell* **11**, 311-323.
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N. & Fischer, R. (2009).** The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **8**, 957-967.
- Hill, T. W., Loprete, D. M., Momany, M. & other authors (2006).** Isolation of cell wall mutants in *Aspergillus nidulans* by screening for hypersensitivity to Calcofluor White. *Mycologia* **98**, 399-409.
- Hohmann-Marriott, M. F., Uchida, M., van de Meene, A. M., Garret, M., Hjelm, B. E., Kokoori, S. & Roberson, R. W. (2006).** Application of electron tomography to fungal ultrastructure studies. *New Phytol* **172**, 208-220.
- Holthuis, J. C., Nichols, B. J., Dhruvakumar, S. & Pelham, H. R. (1998).** Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *EMBO J* **17**, 113-126.
- Holthuis, J. C. & Levine, T. P. (2005).** Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 209-220.
- Holthuis, J. C. & Menon, A. K. (2014).** Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* **510**, 48-57.
- Hynynen, R., Suchanek, M., Spandl, J., Back, N., Thiele, C. & Olkkonen, V. M. (2009).** OSBP-related protein 2 is a sterol receptor on lipid droplets that regulates the metabolism of neutral lipids. *J Lipid Res* **50**, 1305-1315.
- Ikonen, E. (2008).** Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 125-138.
- Im, Y. J., Raychaudhuri, S., Prinz, W. A. & Hurley, J. H. (2005).** Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature* **437**, 154-158.
- Johansen, J., Ramanathan, V. & Beh, C. T. (2012).** Vesicle trafficking from a lipid perspective: Lipid regulation of exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Logist* **2**, 151-160.
- Johansson, M., Bocher, V., Lehto, M., Chinetti, G., Kuismanen, E., Ehnholm, C., Staels, B. & Olkkonen, V. M. (2003).** The two variants of oxysterol binding protein-

related protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct. *Mol Biol Cell* **14**, 903-915.

Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpaa, K., Cover, T. L. & Olkkonen, V. M. (2005). The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* **16**, 5480-5492.

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 betalll spectrin. *J Cell Biol* **176**, 459-471.

Kajiwara, K., Ikeda, A., Aguilera-Romero, A., Castillon, G. A., Kagiwada, S., Hanada, K., Riezman, H., Muniz, M. & Funato, K. (2014). Osh proteins regulate COPII-mediated vesicular transport of ceramide from the endoplasmic reticulum in budding yeast. *J Cell Sci* **127**, 376-387.

Kempf, C., Bathe, F. & Fischer, R. (2013). Evidence that two Pcl-like cyclins control Cdk9 activity during cell differentiation in *Aspergillus nidulans* asexual development. *Eukaryot Cell* **12**, 23-36.

Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S. & Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **325**, 477-481.

Kornmann, B., Osman, C. & Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14151-14156.

Kozminski, K. G., Alfaro, G., Dighe, S. & Beh, C. T. (2006). Homologues of oxysterol-binding proteins affect Cdc42p- and Rho1p-mediated cell polarization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* **7**, 1224-1242.

Kvam, E. & Goldfarb, D. S. (2004). Nvj1p is the outer-nuclear-membrane receptor for oxysterol-binding protein homolog Osh1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **117**, 4959-4968.

Ladinsky, M. S., Mastronarde, D. N., McIntosh, J. R., Howell, K. E. & Staehelin, L. A. (1999). Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* **144**, 1135-1149.

Ladinsky, M. S., Wu, C. C., McIntosh, S., McIntosh, J. R. & Howell, K. E. (2002). Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments. *Mol Biol Cell* **13**, 2810-2825.

Lagace, T. A., Byers, D. M., Cook, H. W. & Ridgway, N. D. (1997). Altered regulation of cholesterol and cholesteryl ester synthesis in Chinese-hamster ovary cells overexpressing the oxysterol-binding protein is dependent on the pleckstrin homology domain. *Biochem J* **326 (Pt 1)**, 205-213.

Lahiri, S., Chao, J. T., Tavassoli, S., Wong, A. K., Choudhary, V., Young, B. P., Loewen, C. J. & Prinz, W. A. (2014). A conserved endoplasmic reticulum membrane

protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol* **12**, e1001969.

Lahiri, S., Toulmay, A. & Prinz, W. A. (2015). Membrane contact sites, gateways for lipid homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 82-87.

Lehto, M., Laitinen, S., Chinetti, G., Johansson, M., Ehnholm, C., Staels, B., Ikonen, E. & Olkkonen, V. M. (2001). The OSBP-related protein family in humans. *J Lipid Res* **42**, 1203-1213.

Lehto, M., Tienari, J., Lehtonen, S., Lehtonen, E. & Olkkonen, V. M. (2004). Subfamily III of mammalian oxysterol-binding protein (OSBP) homologues: the expression and intracellular localization of ORP3, ORP6, and ORP7. *Cell Tissue Res* **315**, 39-57.

Lehto, M., Hynynen, R., Karjalainen, K., Kuismanen, E., Hyvarinen, K. & Olkkonen, V. M. (2005). Targeting of OSBP-related protein 3 (ORP3) to endoplasmic reticulum and plasma membrane is controlled by multiple determinants. *Exp Cell Res* **310**, 445-462.

Lehto, M., Mayranpaa, M. I., Pellinen, T., Ihalmo, P., Lehtonen, S., Kovanen, P. T., Groop, P. H., Ivaska, J. & Olkkonen, V. M. (2008). The R-Ras interaction partner ORP3 regulates cell adhesion. *J Cell Sci* **121**, 695-705.

Lelievre, L., Groh, M., Angebault, C., Maherault, A. C., Didier, E. & Bougnoux, M. E. (2013). Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Med Mal Infect* **43**, 139-145.

Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 739-750.

Levine, T. (2004). Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends Cell Biol* **14**, 483-490.

Levine, T. & Loewen, C. (2006). Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 371-378.

Levine, T. P. & Munro, S. (1998). The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. *Curr Biol* **8**, 729-739.

Levine, T. P. & Munro, S. (2001). Dual targeting of Osh1p, a yeast homologue of oxysterol-binding protein, to both the Golgi and the nucleus-vacuole junction. *Mol Biol Cell* **12**, 1633-1644.

Li, X., Rivas, M. P., Fang, M., Marchena, J., Mehrotra, B., Chaudhary, A., Feng, L., Prestwich, G. D. & Bankaitis, V. A. (2002). Analysis of oxysterol binding protein homologue Kes1p function in regulation of Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol* **157**, 63-77.

- Lichius, A., Berepiki, A. & Read, N. D. (2011).** Form follows function -- the versatile fungal cytoskeleton. *Fungal Biol* **115**, 518-540.
- Ling, Y., Hayano, S. & Novick, P. (2014).** Osh4p is needed to reduce the level of phosphatidylinositol-4-phosphate on secretory vesicles as they mature. *Mol Biol Cell* **25**, 3389-3400.
- Lingwood, D. & Simons, K. (2010).** Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50.
- Loewen, C. J., Roy, A. & Levine, T. P. (2003).** A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J* **22**, 2025-2035.
- Maeda, H. & Ishida, N. (1967).** Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J Biochem* **62**, 276-278.
- Maeda, K., Anand, K., Chiapparino, A., Kumar, A., Poletto, M., Kaksonen, M. & Gavin, A. C. (2013).** Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature* **501**, 257-261.
- Mania, D., Hilpert, K., Ruden, S., Fischer, R. & Takeshita, N. (2010).** Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 7102-7108.
- Markina-Inarrairaegui, A., Pantazopoulou, A., Espeso, E. A. & Penalva, M. A. (2013).** The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis. *PLoS One* **8**, e67154.
- Martin, S. W. & Konopka, J. B. (2004).** Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**, 675-684.
- Mast, N., Zheng, W., Stout, C. D. & Pikuleva, I. A. (2013).** Antifungal Azoles: Structural Insights into Undesired Tight Binding to Cholesterol-Metabolizing CYP46A1. *Mol Pharmacol* **84**, 86-94.
- Maxfield, F. R. (2002).** Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 483-487.
- Mellado, E., Diaz-Guerra, T. M., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2001).** Identification of two different 14- α sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* **39**, 2431-2438.
- Mellado, E., Garcia-Effron, G., Buitrago, M. J., Alcazar-Fuoli, L., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2005).** Targeted gene disruption of the 14- α sterol demethylase (*cyp51A*) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2536-2538.
- Mesmin, B. & Maxfield, F. R. (2009).** Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 636-645.

- Mesmin, B., Antonny, B. & Drin, G. (2013a).** Insights into the mechanisms of sterol transport between organelles. *Cell Mol Life Sci* **70**, 3405-3421.
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G. & Antonny, B. (2013b).** A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* **155**, 830-843.
- Mohammadi, A., Perry, R. J., Storey, M. K., Cook, H. W., Byers, D. M. & Ridgway, N. D. (2001).** Golgi localization and phosphorylation of oxysterol binding protein in Niemann-Pick C and U18666A-treated cells. *J Lipid Res* **42**, 1062-1071.
- Moser von Filseck, J., Mesmin, B., Bigay, J., Antonny, B. & Drin, G. (2014).** Building lipid 'PIPelines' throughout the cell by ORP/Osh proteins. *Biochem Soc Trans* **42**, 1465-1470.
- Moser von Filseck, J., Copic, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C. L., Bourguet, W. & Drin, G. (2015a).** INTRACELLULAR TRANSPORT. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* **349**, 432-436.
- Moser von Filseck, J., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B. & Drin, G. (2015b).** A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat Commun* **6**, 6671.
- Mousley, C. J., Yuan, P., Gaur, N. A. & other authors (2012).** A sterol-binding protein integrates endosomal lipid metabolism with TOR signaling and nitrogen sensing. *Cell* **148**, 702-715.
- Muller, J. M., Shorter, J., Newman, R., Deinhardt, K., Sagiv, Y., Elazar, Z., Warren, G. & Shima, D. T. (2002).** Sequential SNARE disassembly and GATE-16-GOS-28 complex assembly mediated by distinct NSF activities drives Golgi membrane fusion. *J Cell Biol* **157**, 1161-1173.
- 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.
- Neumann, A., Baginski, M., Winczewski, S. & Czub, J. (2013).** The effect of sterols on amphotericin B self-aggregation in a lipid bilayer as revealed by free energy simulations. *Biophys J* **104**, 1485-1494.
- Ngo, M. & Ridgway, N. D. (2009).** Oxysterol binding protein-related Protein 9 (ORP9) is a cholesterol transfer protein that regulates Golgi structure and function. *Mol Biol Cell* **20**, 1388-1399.
- Ngo, M. H., Colbourne, T. R. & Ridgway, N. D. (2010).** Functional implications of sterol transport by the oxysterol-binding protein gene family. *Biochem J* **429**, 13-24.
- Nichols, C. B., Fraser, J. A. & Heitman, J. (2004).** PAK kinases Ste20 and Pak1 govern cell polarity at different stages of mating in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* **15**, 4476-4489.

- Nishimura, T., Uchida, Y., Yachi, R., Kudlyk, T., Lupashin, V., Inoue, T., Taguchi, T. & Arai, H. (2013).** Oxysterol-binding protein (OSBP) is required for the perinuclear localization of intra-Golgi v-SNAREs. *Mol Biol Cell* **24**, 3534-3544.
- Nissila, E., Ohsaki, Y., Weber-Boyvat, M., Perttola, J., Ikonen, E. & Olkkonen, V. M. (2012).** ORP10, a cholesterol binding protein associated with microtubules, regulates apolipoprotein B-100 secretion. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1472-1484.
- Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. (1998).** Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199-203.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. (2000).** Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**, 5421-5426.
- Oakley, B. R., Rinehart, J. E., Mitchell, B. L., Oakley, C. E., Carmona, C., Gray, G. L. & May, G. S. (1987).** Cloning, mapping and molecular analysis of the pyrG (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **61**, 385-399.
- Oakley, B. R., Oakley, C. E., Yoon, Y. & Jung, M. K. (1990).** Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **61**, 1289-1301.
- Olkkonen, V. M., Beaslas, O. & Nissila, E. (2012).** Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules* **2**, 76-103.
- Olkkonen, V. M. (2013).** OSBP-related proteins: liganding by glycerophospholipids opens new insight into their function. *Molecules* **18**, 13666-13679.
- Olkkonen, V. M. & Li, S. (2013).** Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. *Prog Lipid Res* **52**, 529-538.
- Osmani, A. H., May, G. S. & Osmani, S. A. (1999).** The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem* **274**, 23565-23569.
- Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wolfl, S. & Johnston, M. (1996).** Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12428-12432.
- Pantazopoulou, A. & Penalva, M. A. (2009).** Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell* **20**, 4335-4347.
- Papanikou, E. & Glick, B. S. (2014).** Golgi compartmentation and identity. *Curr Opin Cell Biol* **29**, 74-81.

- Pearson, C. L., Xu, K., Sharpless, K. E. & Harris, S. D. (2004).** MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **15**, 3658-3672.
- Perry, R. J. & Ridgway, N. D. (2006).** Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol Biol Cell* **17**, 2604-2616.
- Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S. D., Zellnig, G., Perktold, A. & Daum, G. (2001).** A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem* **268**, 2351-2361.
- Pike, L. J. (2006).** Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* **47**, 1597-1598.
- Pinar, M., Pantazopoulou, A., Arst, H. N., Jr. & Penalva, M. A. (2013).** Acute inactivation of the *Aspergillus nidulans* Golgi membrane fusion machinery: correlation of apical extension arrest and tip swelling with cisternal disorganization. *Mol Microbiol* **89**, 228-248.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E. A., Atoui, A., Calvo, A. M. & Fischer, R. (2008).** Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**, 255-259.
- Rajendran, L. & Simons, K. (2005).** Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**, 1099-1102.
- Raychaudhuri, S., Im, Y. J., Hurley, J. H. & Prinz, W. A. (2006).** Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J Cell Biol* **173**, 107-119.
- Raychaudhuri, S. & Prinz, W. A. (2010).** The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 157-177.
- Ridgway, N. D., Dawson, P. A., Ho, Y. K., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1992).** Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J Cell Biol* **116**, 307-319.
- Ridgway, N. D. (2010).** Oxysterol-binding proteins. *Subcell Biochem* **51**, 159-182.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S. & other authors (2011).** Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha -- a model cell for polarized growth. *Fungal Biol* **115**, 446-474.
- Riquelme, M. (2013).** Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* **67**, 587-609.
- Riquelme, M. & Sanchez-Leon, E. (2014).** The Spitzenkorper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr Opin Microbiol* **20**, 27-33.

- 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.
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M. & Goldfarb, D. S. (2003).** Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 129-141.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W. & Neefjes, J. (2009).** Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* **185**, 1209-1225.
- Samantaray, S., Neubauer, M., Helmschrott, C. & Wagener, J. (2013).** Role of the guanine nucleotide exchange factor Rom2 in cell wall integrity maintenance of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **12**, 288-298.
- Sarria, A. J., Panini, S. R. & Evans, R. M. (1992).** A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *J Biol Chem* **267**, 19455-19463.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E. & other authors (2012).** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.
- 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.
- Schuck, S. & Simons, K. (2004).** Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* **117**, 5955-5964.
- Schultzhaus, Z., Yan, H. & Shaw, B. D. (2015).** *Aspergillus nidulans* flippase DnfA is cargo of the endocytic collar and plays complementary roles in growth and phosphatidylserine asymmetry with another flippase, DnfB. *Mol Microbiol*.
- Schulz, T. A. & Prinz, W. A. (2007).** Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 769-780.
- Schulz, T. A., Choi, M. G., Raychaudhuri, S., Mears, J. A., Ghirlando, R., Hinshaw, J. E. & Prinz, W. A. (2009).** Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. *J Cell Biol* **187**, 889-903.
- Sebastia, J., Cristofol, R., Martin, M., Rodriguez-Farre, E. & Sanfeliu, C. (2003).** Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. *Cytometry A* **51**, 16-25.
- Shapiro, R. S., Robbins, N. & Cowen, L. E. (2011).** Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 213-267.
- Sievers, N., Krüger, M. & Fischer, R. (1997).** Kreuzung von *Aspergillus nidulans*. *Biologie in unserer Zeit* **6**, 383-388.

- Simons, K. & Toomre, D. (2000).** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39.
- Spiliotis, E. T. & Gladfelter, A. S. (2012).** Spatial guidance of cell asymmetry: septin GTPases show the way. *Traffic* **13**, 195-203.
- Stefan, C. J., Manford, A. G., Baird, D., Yamada-Hanff, J., Mao, Y. & Emr, S. D. (2011).** Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell* **144**, 389-401.
- Steinberg, G. (2007).** Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytol* **174**, 721-733.
- Steinberg, G. (2011).** Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition. *Curr Opin Microbiol* **14**, 660-667.
- Steinberg, G. (2014).** Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **20**, 10-18.
- Stuermer, C. A. (2010).** The reggie/flotillin connection to growth. *Trends Cell Biol* **20**, 6-13.
- Suelmann, R., Sievers, N., Galetzka, D., Robertson, L., Timberlake, W. E. & Fischer, R. (1998).** Increased nuclear traffic chaos in hyphae of *Aspergillus nidulans*: molecular characterization of *apsB* and in vivo observation of nuclear behaviour. *Mol Microbiol* **30**, 831-842.
- Sun, X., Zhu, J., Bao, L., Hu, C., Jin, C., Harris, S. D., Liu, H. & Li, S. (2013).** PyrG is required for maintaining stable cellular uracil level and normal sporulation pattern under excess uracil stress in *Aspergillus nidulans*. *Sci China Life Sci* **56**, 467-475.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006).** Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**, 3111-3120.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazan, L., Dou, X., Espeso, E. A., Penalva, M. A., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2008).** The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**, 1439-1449.
- Taheri-Talesh, N., Xiong, Y. & Oakley, B. R. (2012).** The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**, e31218.
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. & Fischer, R. (2008).** Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**, 339-351.
- Takeshita, N. & Fischer, R. (2011).** On the role of microtubules, cell end markers, and septal microtubule organizing centres on site selection for polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol* **115**, 506-517.

- Takeshita, N., Diallinas, G. & Fischer, R. (2012).** The role of flotillin FloA and stomatin StoA in the maintenance of apical sterol-rich membrane domains and polarity in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **83**, 1136-1152.
- Takeshita, N., Manck, R., Grun, N., de Vega, S. H. & Fischer, R. (2014).** Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol* **20**, 34-41.
- Teixeira, K. I., Araujo, P. V., Sinisterra, R. D. & Cortes, M. E. (2012).** Chlorhexidine: beta-cyclodextrin inhibits yeast growth by extraction of ergosterol. *Braz J Microbiol* **43**, 810-818.
- Tizzard, A. C., Bergsma, J. H. & Lloyd-Jones, G. (2006).** A resazurin-based biosensor for organic pollutants. *Biosens Bioelectron* **22**, 759-763.
- Tong, J., Yang, H., Eom, S. H. & Im, Y. J. (2013).** Structure of Osh3 reveals a conserved mode of phosphoinositide binding in oxysterol-binding proteins. *Structure* **21**, 1203-1213.
- Toulmay, A. & Prinz, W. A. (2011).** Lipid transfer and signaling at organelle contact sites: the tip of the iceberg. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 458-463.
- Valiante, V., Heinekamp, T., Jain, R., Hartl, A. & Brakhage, A. A. (2008).** The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genet Biol* **45**, 618-627.
- Valiante, V., Jain, R., Heinekamp, T. & Brakhage, A. A. (2009).** The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **46**, 909-918.
- Valiante, V., Macheleidt, J., Foge, M. & Brakhage, A. A. (2015).** The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol* **6**, 325.
- Valitova, J., Sulkarnayeva, A., Kotlova, E., Ponomareva, A., Mukhitova, F. K., Murtazina, L., Ryzhkina, I., Beckett, R. & Minibayeva, F. (2014).** Sterol binding by methyl-beta-cyclodextrin and nystatin--comparative analysis of biochemical and physiological consequences for plants. *FEBS J* **281**, 2051-2060.
- Van Leeuwen, M. R., Golovina, E. A. & Dijksterhuis, J. (2009).** The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*. *J Appl Microbiol* **106**, 1908-1918.
- 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.
- Vermeulen, E., Lagrou, K. & Verweij, P. E. (2013).** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Curr Opin Infect Dis* **26**, 493-500.

- Vihervaara, T., Jansen, M., Uronen, R. L., Ohsaki, Y., Ikonen, E. & Olkkonen, V. M. (2011).** Cytoplasmic oxysterol-binding proteins: sterol sensors or transporters? *Chem Phys Lipids* **164**, 443-450.
- Wachtler, V., Rajagopalan, S. & Balasubramanian, M. K. (2003).** Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**, 867-874.
- Wagener, J., Echtenacher, B., Rohde, M., Kotz, A., Krappmann, S., Heesemann, J. & Ebel, F. (2008).** The putative alpha-1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryot Cell* **7**, 1661-1673.
- Wang, C., JeBailey, L. & Ridgway, N. D. (2002).** Oxysterol-binding-protein (OSBP)-related protein 4 binds 25-hydroxycholesterol and interacts with vimentin intermediate filaments. *Biochem J* **361**, 461-472.
- Wang, P., Zhang, Y., Li, H., Chieu, H. K., Munn, A. L. & Yang, H. (2005a).** AAA ATPases regulate membrane association of yeast oxysterol binding proteins and sterol metabolism. *EMBO J* **24**, 2989-2999.
- Wang, P. Y., Weng, J. & Anderson, R. G. (2005b).** OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science* **307**, 1472-1476.
- Wang, P. Y., Weng, J., Lee, S. & Anderson, R. G. (2008).** The N terminus controls sterol binding while the C terminus regulates the scaffolding function of OSBP. *J Biol Chem* **283**, 8034-8045.
- Weber-Boyvat, M., Kentala, H., Peranen, J. & Olkkonen, V. M. (2014).** Ligand-dependent localization and function of ORP-VAP complexes at membrane contact sites. *Cell Mol Life Sci*.
- Weber-Boyvat, M., Kentala, H., Lilja, J. & other authors (2015).** OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. *Exp Cell Res* **331**, 278-291.
- Wegner, A. (1976).** Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* **108**, 139-150.
- Wideman, J. G., Gawryluk, R. M., Gray, M. W. & Dacks, J. B. (2013).** The ancient and widespread nature of the ER-mitochondria encounter structure. *Mol Biol Evol* **30**, 2044-2049.
- Willger, S. D., Puttikamonkul, S., Kim, K. H. & other authors (2008).** A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* **4**, e1000200.
- Wyles, J. P. & Ridgway, N. D. (2004).** VAMP-associated protein-A regulates partitioning of oxysterol-binding protein-related protein-9 between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Exp Cell Res* **297**, 533-547.

- Wyles, J. P., Perry, R. J. & Ridgway, N. D. (2007).** Characterization of the sterol-binding domain of oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 reveals a novel role in vimentin organization. *Exp Cell Res* **313**, 1426-1437.
- Xiang, X. & Plamann, M. (2003).** Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **6**, 628-633.
- Yamamoto, A. & Hiraoka, Y. (2003).** Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *J Cell Sci* **116**, 4501-4512.
- Yan, D., Mayranpaa, M. I., Wong, J. & other authors (2008).** OSBP-related protein 8 (ORP8) suppresses ABCA1 expression and cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem* **283**, 332-340.
- Yu, J. H. (2010).** Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* **38**, 229-237.
- 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.
- Zhong, W., Zhou, Y., Li, S., Zhou, T., Ma, H., Wei, K., Li, H., Olkkonen, V. M. & Yan, D. (2011).** OSBP-related protein 7 interacts with GATE-16 and negatively regulates GS28 protein stability. *Exp Cell Res* **317**, 2353-2363.
- Zhou, T., Li, S., Zhong, W. & other authors (2011).** OSBP-related protein 8 (ORP8) regulates plasma and liver tissue lipid levels and interacts with the nucleoporin Nup62. *PLoS One* **6**, e21078.
- Zhou, Y., Li, S., Mayranpaa, M. I., Zhong, W., Back, N., Yan, D. & Olkkonen, V. M. (2010).** OSBP-related protein 11 (ORP11) dimerizes with ORP9 and localizes at the Golgi-late endosome interface. *Exp Cell Res* **316**, 3304-3316.
- Ziolkowska, N. E., Christiano, R. & Walther, T. C. (2012).** Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol* **22**, 151-158.

Internetquellen

EMBL-EBI 2015 InterProScann: (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>); Stand 28. August 2012

Stanford University, Stanford, CA 94305. Hefe Datenbank (<http://www.yeastgenome.org/>)

National Center for Biotechnology Information: BLAST http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) Revised: November 18, 2009.

Thermo Fisher Scientific Inc.: Glibenclamid BODIPY@TR (<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/E34250>); Stand 30. Mai 2015

Thermo Fisher Scientific Inc.: pJet1.2 (<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K1231>); Stand: 30. Mai 2015

7 Anhang

7.1 Zusatz zur Arbeit

7.1.1 Keine Wachstumsbeeinträchtigung von $\Delta oshA-E$ durch verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffquellen

In Membranen sitzen die unterschiedlichsten Systeme für die Aufnahme von Molekülen, so zum Beispiel Transporter- oder Carriersysteme (Conrad *et al.*, 2014; Diallinas, 2014). Nährstoffe versorgen die Zelle unter anderem mit Energie (Conrad *et al.*, 2014) und so wird von den meisten Eukaryoten Glukose als Kohlenstoff und Energiequelle bevorzugt (Ozcan *et al.*, 1996). Stickstoffbausteine wie Ammoniak oder Glutamat werden als Vorläufer für Aminosäuren favorisiert (Conrad *et al.*, 2014). In diesem Abschnitt der Arbeit sollte ein Wachstumsdefekt der *osh*-Deletionsstämmen durch eine veränderte Kohlen- oder Stickstoffaufnahme über die Membran untersucht werden.

Es wurde für den Wildtyp und die Deletionsstämmen *oshA-E* jeweils eine Sporensuspension mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen pro 10 μ l auf MM Agarplatten mit entsprechenden Auxotrophiemarkern und verschiedenen Kohlenstoff- bzw. Stickstoff-Quellen angeimpft. Die Platten wurden bei 37 °C für drei Tage inkubiert.

Der Wildtyp wies bis auf Ammoniumacetat und Maltose auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen grün gefärbte Sporen auf. Die Deletionsstämmen *oshB-E* wiesen dagegen bei allen Kohlenstoffquellen, mit Ausnahme von Ammoniumacetat, braun gefärbte Sporen auf (Abbildung 73). Auf Glukose, Fruktose, Saccharose und Inositol wies die Sporenfärbung von $\Delta oshA$ eine grün-bräunliche Färbung auf. Die Koloniegröße war bei $\Delta oshB$, $\Delta oshC$ und $\Delta oshD$ bei allen Kohlenstoffquellen kleiner als beim Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass die Kohlenstoff-Transporter in der Membran durch die Deletionen nicht beeinträchtigt sind.

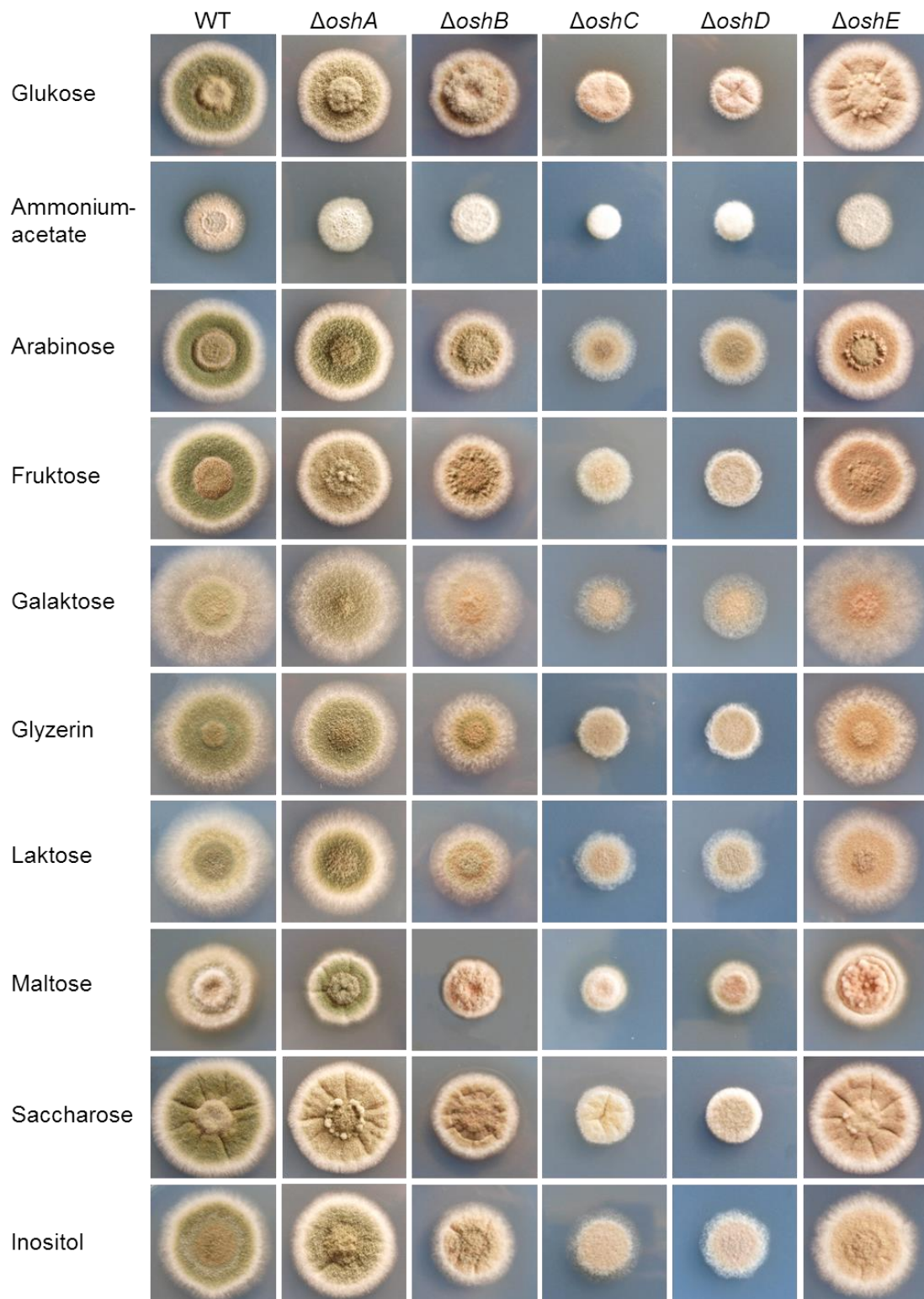


Abbildung 73: Wachstums der Deletionsstämme *oshA-E* und des Wildtyps auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Von links nach rechts die Stämme und von oben nach unten sind die verschiedenen Kohlenstoffquellen aufgelistet. Die Platten wurden mit einer 10 μ l Sporensuspension von einer Dichte mit $2,5 \cdot 10^4$ Sporen angeimpft und für drei Tage bei 37 °C inkubiert.

Die Deletionsstämme *oshA-E* und der Wildtyp wurden auf Medien mit verschiedenen Stickstoffquellen auf Wachstumsdefekte hin analysiert (Abbildung 74). Als Negativkontrolle wurde ein Medium verwendet, das außer Uridin und Uracil keinen zusätzlichen Stickstoff enthielt (-N₂). Der Wildtyp konnte noch grüne Sporen bilden, wohingegen die *osh*-Deletionsstämme schwache bis keine grün gefärbte Sporen aufwiesen. Bei den Deletionsmutanten *oshC* und *oshD* wurden auf allen stickstoffhaltigen Medien kleine weiß-bräunliche und kompaktere Kolonien als beim Wildtyp beobachtet. Die Sporenfärbung der Deletionsmutanten *oshA*, *oshB* und *oshE* zeigten mehr oder weniger die gleiche grüne Färbung wie der Wildtyp auf. Eine Beeinträchtigung des Wachstums der *osh*-Deletionsstämme auf stickstoffhaltigem Medium konnte nicht beobachtet werden.

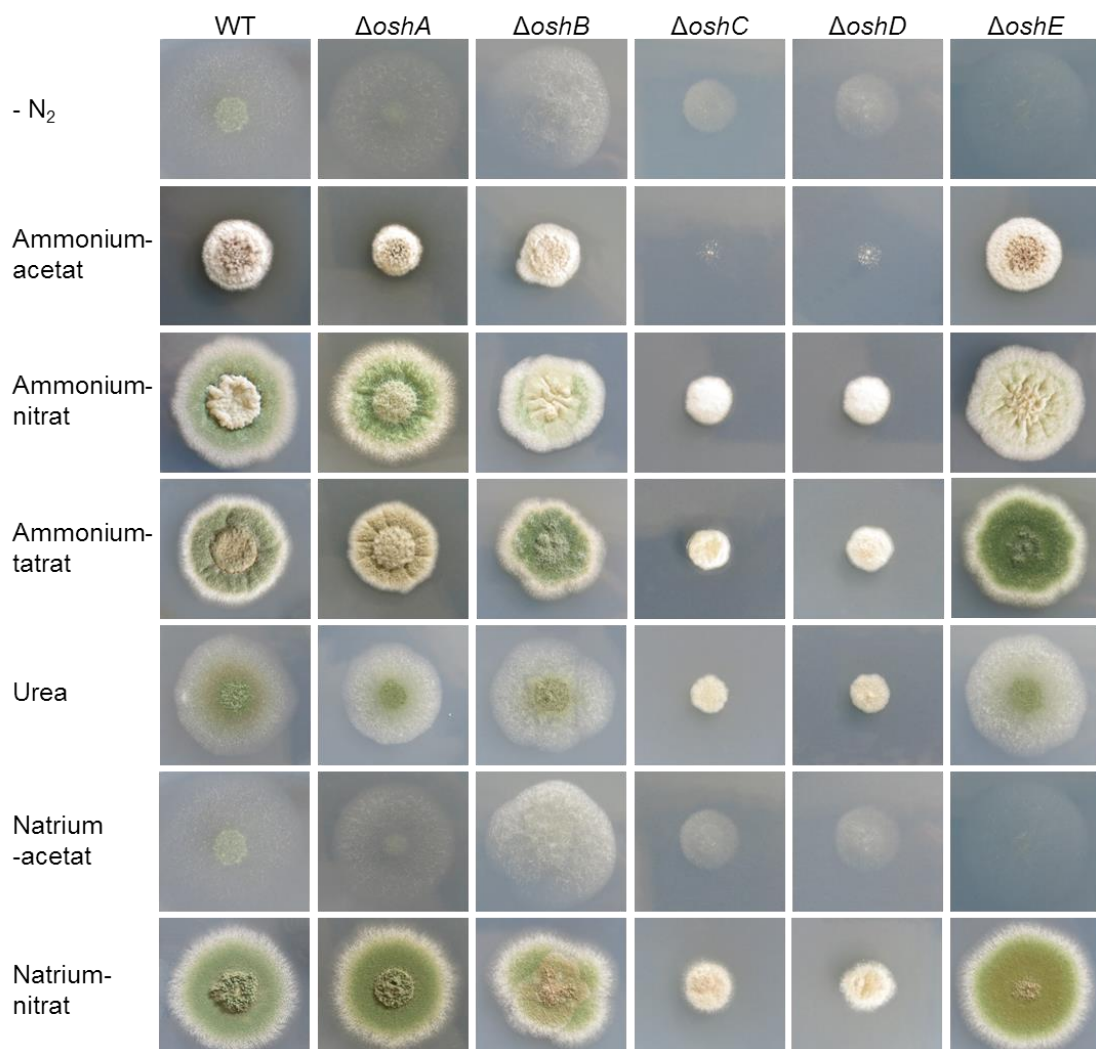


Abbildung 74: Wachstums der Deletionsstämme *oshA-E* und des Wildtyps auf verschiedenen Stickstoffquellen. Die Negativkontrolle (-N₂) enthielt nur Uridin und Uracil als Auxotrophiemarker, jedoch keine weiteren zusätzlichen Stickstoffquellen. Von oben nach unten sind die verschiedenen Stickstoffquellen und von links nach rechts die Stämme aufgelistet. Die Platten wurden mit einer 10 μ l Sporensuspension mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^4$ Sporen punktinokuliert und für drei Tage bei 37 °C inkubiert.

Abkürzungsverzeichnis

AmB	Amphotericin B
alcA(p)	Promotor der Alkoholdehydrogenase
CFW	Calcofluor White
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
M β CD	Methyl- β -cyclodextrin
MM	Minimal Medium
MCS	Membran-Kontaktbereich (<i>membrane contact site</i>)
NVJ	<i>nucleus-vacuole junction</i>
OSBP	oxysterolbinde Protein (<i>oxysterol-binding protein</i>)
ORP	oxysterolbinde Protein (OSBP)-verwandtes Protein (<i>oxysterol-binding protein-related protein</i>)
Osh	homologes oxysterolbinde Protein (<i>OSBP homologue protein</i>)
PM	Plasmamembran
paba	p-Aminobenzoensäure
PI	Phosphoinositol
PI4P	Phosphoinositol-4-phosphat
VCZ	Voriconazol

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Bühler, N., Hagiwara, D. & Takeshita, N. (2015). Functional Analysis of Sterol Transporter Orthologues in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **14**, 908-921.

Konferenzen

- | | |
|-------------------|--|
| 03/2014 | 12th European Conference on Fungal Genetics, Seville, Spain (Poster)
Functional analysis of sterol transporter in the filamentous fungus <i>Aspergillus nidulans</i> |
| 09/2013 – 10/2013 | XI International Fungal Biology Conference, Karlsruhe |
| 03/2013 | 27th Fungal Genetics Conference, Asilomar Conference Center, Pacific Grove (CA), USA (Poster)
Functional analysis of sterol transporter in the filamentous fungus <i>Aspergillus nidulans</i> |
| 09/2011 | Botanikertagung 2011, Berlin (Poster) |

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Fischer für seine fachliche Unterstützung sowie für die Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Als nächstes danke ich Prof. Dr. Jörg Kämper für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Bei Dr. Norio Takeshita bedanke ich mich für die Möglichkeit, dass ich bei ihm die Thesis mit diesem interessanten Thema schreiben konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Anna, Maren, Elke, Nathalie, Raphael, Caro, Ruben, Stephanie Heupel und allen, die ich hier vergessen habe zu erwähnen, sowohl für ihre Unterstützung als auch für ihre Hilfe und den Austausch des Fachwissens.

Bei Anna möchte ich mich auf diesem Wege persönlich für die tollen drei Jahre, die Korrektur dieser Arbeit, ihre Motivationsversuche während der letzten Tage dieser Arbeit sowie für alles, was wir zusammen erlebt und durchgemacht haben, bedanken.

Maren danke ich für ihre leckeren Muffins & Co, für ihr offenes Ohr, die Korrektur dieser Arbeit, die Motivationsversuche und für ihre restliche Unterstützung.

Elke danke ich für ihr tolles Wesen und ihre Hilfe, wo es nur ging.

Den Arbeitsgruppen Requena und Kämper danke ich für die gute Atmosphäre.

Fabienne, Tamara und Aline danke ich für jegliche Hilfe, wenn es um Verwaltungsangelegenheiten ging.

Ich danke auch ehemaligen Doktoranden wie Kristin, Julian oder Stefan, die unser Institut mittlerweile verlassen haben, für die lustige Zeit und die Gespräche zwischendurch.

Maya danke ich für ihre Freundschaft, die Korrektur dieser Arbeit, die Telefonate, ihr offenes Ohr und für die tollen Zeiten am See.

Marlene und Olga danke ich für ihre Freundschaft, die lustige Zeit und fürs Zuhören.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern Fritz und Margret, meiner Schwester Ramona und ihrem Mann Urs, meinen Freunden und Nachbarn, die mich die ganze Zeit in jeder Hinsicht unterstützen und für viele lustige abwechslungsreiche Stunden sorgten.

Meiner verstorbenen Oma Emma möchte ich diese Arbeit widmen und ihr auf diesem Wege für die tolle Zeit die wir zusammen hatten, für Ihr großartiges freundliches Wesen und das meine Oma war danke sagen.

Der größte Dank gilt meinem Freund Michael, der mich all die Jahre und vor allem die letzten Monate und Tage sehr unterstützt hat und immer für mich da ist. Danke, dass es Dich in meinem Leben gibt.