

# **Actindynamik und -regulation 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  
**Anna Rebecca Bergs**  
aus  
Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2015



## Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Actindynamik und -regulation 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. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 17.05.2010, habe ich beachtet.

Karlsruhe, 07. Januar 2016

---

Anna Bergs

## Zusammenfassung

Filamentöse Pilze, wie *Aspergillus nidulans*, wachsen durch kontinuierliche Verlängerung ihrer Hyphenspitzen. Zur Realisierung dieser extremen Polarisation der Zelle sind viele Komponenten wichtig. Hierbei sind die Cytoskelett Komponenten Actin, Mikrotubuli und Septine entscheidende Bestandteile. Mikrotubuli spielen dabei eine Rolle im Langsteckentransport von sekretorischen Vesikeln, welche für die Exocytose und damit die Erweiterung von Plasmamembran und Zellwand notwendig sind. An der Hyphenspitze angelangt werden diese Vesikel höchstwahrscheinlich an Actinkabel übergeben, um mit Hilfe der Myosine zur Plasmamembran transportiert zu werden und schlussendlich in der Exocytose mit ihr zu verschmelzen. Das Zusammenwirken von Actin und Mikrotubuli ist demnach eine wichtige Komponente in der Etablierung und Aufrechterhaltung des polaren Wachstums. Die beiden Cytoskelettkomponente werden dabei durch den sogenannten Zellendmarker Komplex, welcher eine Rolle in der Polarisierung der Hyphen spielt und unter anderem aus den Proteinen TeaA, TeaC, TeaR und SepA besteht, verknüpft. TeaA wird mit Mikrotubuli Plusenden an die Plasmamembran transportiert und durch das prenylierte TeaR in ihr verankert. Durch eine indirekte Interaktion von TeaA, über TeaC, mit dem Formin SepA, werden die Actinkabel positioniert und polarisiert. Actinpatches spielen eine Rolle in der Endocytose, welche vornehmlich in einem subapikalen Ring stattfindet. Es wird postuliert, dass dieser Mechanismus ein zur Exocytose kompensatorisches Recycling darstellt. Actinkabel sind extrem schwierig zu visualisieren. Konjugate des Knollenblätterpilzgifts Phalloidin mit fluoreszenten Proteinen zeigten sich in der Vergangenheit in filamentösen Pilzen als unbrauchbar. Deshalb wurden in der jüngsten Vergangenheit Fusionsproteine aus Actinbindeproteinen und fluoreszenten Proteinen zur Visualisierung von Actinkabeln in filamentösen Pilzen verwendet. In *A. nidulans* konnten Actinkabel mit Hilfe des Tropomyosins TpmA bereits sichtbar gemacht werden. Über die Dynamik von Actinkabeln in filamentösen Pilzen, war bisher jedoch nur sehr wenig bekannt. Deshalb sollten im Zuge dieser Arbeit die Actinkabel durch Fusionsproteine von Tropomyosins TpmA oder dem Peptid Lifeact jeweils mit einem fluoreszierenden Protein fusioniert, visualisiert und deren Dynamik ermittelt werden. Darüber hinaus sollte die Beziehung zwischen dem Actincytoskelett und anderen Komponenten des polaren Wachstums, wie Mikrotubuli, Zellendmarkern, Septinen und der Calciumkonzentration untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Visualisierung von Mikrotubuli mit Hilfe hochauflösender Mikroskopie.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Dynamik der Actinkabel in *A. nidulans* mit Hilfe des Markers TpmA gezeigt werden. Bei den Untersuchungen zur Actindynamik zeigte sich, dass Actinkabel in *A. nidulans* mit Raten von etwa 0,6  $\mu\text{m/s}$  polymerisiert und depolymerisiert werden. Eine weitere Erkenntnis, die aus diesen Experimenten gezogen werden konnte, war,

dass Actinkabel etwa 9 Katastrophenereignisse pro Minute durchlaufen. Darüber hinaus konnte eine durchschnittliche Anzahl von drei Actinkabeln pro Hyphe ermittelt werden, deren Dynamiken voneinander unabhängig waren. Zusätzlich zeigte sich, dass die Expressionsstärke von Lifeact gravierende Auswirkungen auf die Organisation und die Dynamik des Actincytoskeletts hat. Des Weiteren konnte eine Wechselbeziehung zwischen Actin und Mikrotubuli, sowie dem Zellendmarker TeaA gezeigt werden. Es konnte beobachtet werden, dass die Polymerisation und Depolymerisation der Actin- und Mikrotubulicytoskelette kooperativ ist und der Ursprung der Actinkabel mit einer Akkumulation des Zellendmarkers TeaA co-lokalisiert. Im Zuge der Messung der Calciumkonzentration an der Hyphenspitze von *A. nidulans* konnten Calciumoszillationen beobachtet werden und diese, durch den Vergleich der Frequenzen der Calciumoszillationen, der Depolymerisation von Actinkabeln und des Erreichens von Mikrotubuli des Kortex, in einen möglichen Zusammenhang mit der Dynamik der Cytoskelette gestellt werden. Da Septine als Gerüst- und Barrierekomponente bekannt sind, konnte die Untersuchung des endocytotischen Actinrings und des Zellenmarkers TeaR in Septinmutanten zeigen, dass Septine eine Rolle in der korrekten Positionierung dieser Polaritätsfaktoren spielen. Diese Erkenntnisse sind ein weiterer Schritt zum vollständigen Verständnis des polaren Wachstums, sowohl in filamentösen Pilzen, aber auch übertragen auf beispielsweise neuronale Zellen im Menschen.

Experimente zur hochauflösenden Mikroskopie von Mikrotubuli zeigten, dass die meisten mit normalen, Epifluoreszenzmikroskopie, aufgenommenen Mikrotubuli Strukturen vermutlich Bündelungen mehrerer Mikrotubuli darstellen. Dies eröffnet neue Möglichkeiten der Untersuchung dieser Cytoskelett Komponente.

## Summary

Filamentous fungi, like *Aspergillus nidulans*, grow exclusively through apical tip extension. Many components are important to manage this extreme polarisation of the cell. Crucial components are among other things the cytoskeletal elements actin, microtubules and septins. Microtubules play a role in the long range transport of secretory vesicles, which are crucial for exocytosis and hence for the extension of the apical plasma membrane and cell wall. Once they have arrived at the tip they are thought to be handed over to the actin cables to be transported to the apical membrane and ultimately fuse with it in exocytosis. Therefore the interplay of the actin and microtubules is an important component in the establishment and maintenance of polar growth. The cytoskeletons are linked through the cell end marker complex, which is crucial for polar growth and consists among others of the proteins TeaA, TeaC, TeaR and SepA. TeaA is transported to the apical plasma membrane with the microtubule plus ends and anchored to it through the interaction with the prenylated TeaR. TeaA polarises and positions actin cables through an indirect interaction of TeaA with the formin SepA, which takes place through TeaC. Actin patches play a role in endocytosis, which is primarily taking place at a subapical ring. It was postulated that this mechanism is a compensatory recycling to the extensive exocytosis. Actin cables are extremely difficult to visualise. Phalloidin conjugated to fluorescent proteins showed to be inapplicable in filamentous fungi. Hence, fusions of actin binding proteins with fluorescent proteins were used for the visualisation of actin cables in filamentous fungi in the recent past. In *A. nidulans* actin cables have already been localised with the help of the tropomyosin TpmA. Until to date the dynamics of actin cables in filamentous fungi were mostly unknown. Therefore actin cables were visualised and their dynamics elucidated with the help of the tropomyosin TpmA and the peptide Lifeact in the thesis at hand. Furthermore the relation of actin with other components involved in polar growth as microtubules, cell end marker proteins, septins and the calcium concentration were investigated. Another goal was the visualisation of microtubules via super resolution microscopy techniques.

Here, the dynamics of actin cables in *A. nidulans* could be shown with the help of the marker TpmA. Analysis of the actin dynamics showed that actin cables are polymerised and depolymerised at a rate of approximately 0.6  $\mu\text{m/s}$  in *A. nidulans*. Another observation following these experiments was that actin cables encounter in about 9 catastrophe events per minute. Moreover a mean actin cable count of three cables per hyphae, of which the dynamics were independent, was observed. In addition it arose that the expression level of Lifeact has crucial effects on the organisation and dynamics of the actin cytoskeleton. Furthermore an interdependency of actin and microtubules as well as the cell end marker TeaA has been

elucidated. It has been observed that the polymerisation and depolymerisation of the actin and microtubule cytoskeletons cooperate and that the origin of the actin cables corresponds with the tip accumulation of the cell end marker TeaA. In the course of calcium concentration measurements at the hyphal tip of *A. nidulans* hyphae calcium oscillations were observed. These were put in a possible connection with the dynamics of the cytoskeletons through the comparison of the frequencies of the calcium oscillations, the depolymerisation of actin cables and the arrival of microtubules at the apical membrane. Due to the fact that septins are barrier and scaffold proteins, the investigation of the endocytotic actin ring and the cell end marker TeaA in septin mutants, elucidated a role for septins in the proper positioning of these polarity factors. These results are a further step to the full understanding of the polar growth in filamentous fungi and transferred maybe even human neuronal cells.

High resolution microscopy experiments of microtubules showed that most of the acquisitions made with normal epifluorescence microscopes presumably represent bundles of several microtubules. This opens new possibilities for investigations of this cytoskeletal component.

## Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende Publikationen angefertigt oder vorbereitet werden.

Bergs, A., Ishitsuka, Y., Nienhaus, G. U. und Takeshita, N., “Coordinated polymerization between actin cables and microtubules in polarized growth of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*”. mBio, eingereicht.\*

Ishitsuka, Y., Savage, N., Li, Y., Bergs, A., Grün, N., Kohler, D., Donnelly, R., Nienhaus, G. U., Fischer, R. und Takeshita, N., “Super-resolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth”. *Science Advances*, *in press*.\*

\* erste Seite im Anhang

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Polares Wachstum .....	1
1.2 Das Actin-Cytoskelett .....	3
1.4 Das Mikrotubuli Cytoskelett .....	13
1.5 Zellendmarker .....	17
1.6 Septine .....	19
1.7 Zielsetzung .....	24
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>2</b>
2.1 Lifeact stabilisiert Actinkabel .....	2
2.2 Tropomyosin TpmA als Marker für dynamische Actinkabel .....	10
2.3 Quantifizierung der Actindynamik in <i>Aspergillus nidulans</i> .....	21
2.4 Actin Lokalisierung während der Septierung .....	25
2.5 Co-Lokalisation von Actinkabel-Plusenden mit dem Zellendmarker TeaA .....	28
2.6 Zusammenhang der Dynamik des Actin- und des Mikrotubuli Cytoskeletts .....	29
2.7 Actinkabel im Mikrotubuli-Polymerase Deletionsstamm und unter Behandlung mit Benomyl ....	33
2.8 Ca <sup>2+</sup> Oszillationen visualisiert mit Hilfe von Cameleon .....	36
2.9 Der Actinring und der Zellendmarker TeaR in Septinmutanten .....	38
2.10 Super Resolution Mikroskopie von Mikrotubuli .....	42
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>47</b>
3.1 Markerproteine zur Visualisierung von Actin .....	48
3.2 Actin Organisation und Dynamik in <i>A. nidulans</i> .....	52
3.3 Kooperative Polymerisation von Actinkabeln und Mikrotubuli .....	57
3.4 Calciumoszillationen .....	62
3.5 Der Actinring und der Zellendmarker TeaR in Septinmutanten .....	63
3.6 <i>Photo Activated Light Microscopy</i> (PALM) von Mikrotubuli .....	65
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>66</b>
4.1 Chemikalien .....	66
4.2 Verwendete Organismen und Kultivierungen .....	66
4.3 Molekularbiologische Methoden .....	72
4.4 Mikroskopische Methoden .....	84
<b>5. Referenzen</b> .....	<b>91</b>
<b>6. Anhang</b> .....	<b>b</b>

# 1. Einleitung

Filamentöse Pilze sind eine ubiquitär verbreitete Lebensform, welche von großer ökologischer, agrarischer, medizinischer und biologischer Relevanz ist. Der Schlüssel zum Erfolg der filamentösen Pilze liegt in der evolutionären Entwicklung ihrer stark polarisierten und vornehmlich an der Spitze wachsenden Hyphen, welche es ihnen als nicht bewegliche, heterotrophe Organismen ermöglicht weite Lebensräume zu erschließen (Read, 2006). Viele der in der aktuellen Forschung verwendeten eukaryotischen Modellorganismen, wie *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Ashbya gossypii* und *Ustilago maydis* gehören zu den filamentösen Pilzen. Das Cytoskelett spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Morphogenese von Pilzen (Berepiki *et al.*, 2011, Lichius *et al.*, 2011). Es wird aus drei Hauptpolymeren gebildet, welche namentlich filamentöses Actin (F-Actin), Mikrotubuli (MT) und Septine sind. Im Folgenden werden diese kurz angesprochen und in Beziehung miteinander gestellt, detailliertere Abhandlungen über die einzelnen Cytoskelett Komponente folgen in weiteren Abschnitten der Einleitung.

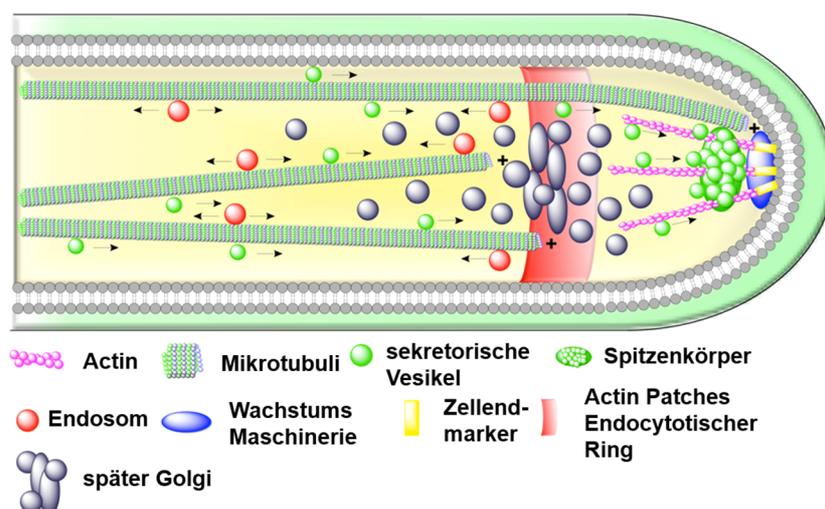
## 1.1 Polares Wachstum

Sowohl Actin als auch Mikrotubuli sind entscheidend für das Wachstum der Hyphen. Sie haben unterschiedliche aber überlappende Aufgaben im polaren Wachstum (Harris *et al.*, 2005, Lichius *et al.*, 2011). Neben Actinkabeln sind die Mikrotubuli und ihre korrespondierenden Motor-Proteine in die kontinuierliche Sekretion von Vesikeln, welche essentiell für die Erweiterung der Zellwand und Plasmamembran sind, involviert (Takeshita *et al.*, 2014, Egan *et al.*, 2012, Steinberg, 2011). Mikrotubuli spielen hierbei eine Rolle im Langstreckentransport sekretorischer Vesikel, bis diese an der Spitze an Actinkabel übergeben und zur Plasmamembran transportiert werden, um dort schlussendlich mit ihr zu verschmelzen (Howard, 1981, McGoldrick *et al.*, 1995). Während des apikalen Spitzenwachstums stehen Exocytose und Endocytose in einer ständigen Balance, um sowohl die effektive Membranerweiterung als auch das Recycling von wichtigen, durch die Exocytose diffundierenden, Komponenten zu gewährleisten (Penalva, 2010, Shaw *et al.*, 2011).

Mikrotubuli sind zusätzlich für die Verteilung der Nuclei und anderen Organellen verantwortlich und fungieren als Schienen für den Transport von Endosomen und anderen Vesikeln (Horio & Oakley, 2005). Obwohl die Abhängigkeit von den Mikrotubuli und Actin-Cytosketten in verschiedenen Pilzen unterschiedlich ist, unterliegt der Vesikeltransport zur Plasmamembran an der Spitze wahrscheinlich der Kooperation von Actin und Mikrotubuli assoziierten Motoren (Schuster *et al.*, 2012, Taheri-Talesh *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2011). Deshalb ist das Zusammenspiel beider Cytoskette essentiell für die Initiation und

Aufrechterhaltung von polarem Wachstum (Li & Gundersen, 2008, Chang & Peter, 2003, Basu & Chang, 2007). Die sogenannten Zellendmarker, welche zuerst in der Spalthefe entdeckt wurden, verknüpfen Actin und Mikrotubuli und agieren als Polaritätsmarker an der Hyphenspitze von *A. nidulans* (Fischer *et al.*, 2008, Takeshita *et al.*, 2014). Einer der Zellendmarker, TeaA, wird mit den wachsenden Plusenden der Mikrotubuli zur Hyphenspitze transportiert (Takeshita *et al.*, 2008). An der Spitze angelangt, interagiert TeaA mit TeaR, welches als prenyliertes Protein in der Membran verankert ist (Takeshita *et al.*, 2008). Infolgedessen wird der Zellendmarker Komplex, bestehend aus TeaA, TeaC, TeaR, SepA und weiteren assoziierten Proteinen, in der Plasmamembran verankert (Takeshita *et al.*, 2008). Durch die Interaktion von TeaA mit TeaC, welches wiederum mit dem Formin SepA interagiert, werden die Actinkabel positioniert (Higashitsuji *et al.*, 2009). Als Formin polymerisiert SepA Actinkabel, welche für die Exocytose und das polare Wachstum benötigt werden und positioniert diese somit an der Hyphenspitze (Goode & Eck, 2007, Sharpless & Harris, 2002). Die Verteilung der Zellendmarker, Cytoskelette und Organellen kann der schematischen Abbildung 1.1 entnommen werden.

Septine spielen zusätzliche eine wichtige Rolle im polaren Wachstum, da sie an distinkten Stellen der Plasmamembran lokalisieren und dort als Gerüstkomponente und Barrieren fungieren. Diese Funktionen sind essentiell für die Assemblierung bestimmter Proteinkomplexe, wie dem kontraktilen Actomyosinring, welcher für die Septenbildung und die Cytokinese wichtig ist und aus Actin und Myosin II besteht, dem Polarisomkomplex, der einen Multiproteinkomplex darstellt und für die richtige Positionierung von Actinfilamenten wichtig ist, oder dem Exocystkomplex, ebenfalls ein Multiproteinkomplex, der das Verankern sekretorischer Vesikel an der Plasmamembran an Stellen der Exocytose und des apikalen Wachstums ermöglicht (Barral *et al.*, 2000, Dobbelaere & Barral, 2004, Orlando *et al.*, 2011).



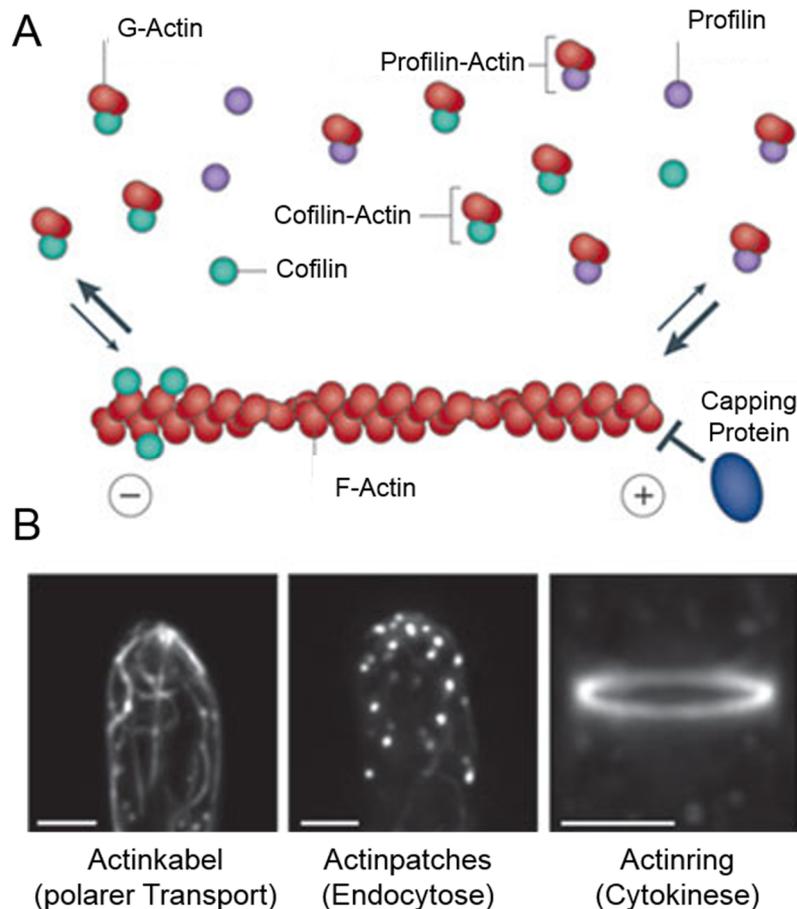
**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer *A. nidulans* Hyphenspitze.** Die Abbildung zeigt die Verteilung der Organellen, Cytoskelette und Polaritätsfaktoren, basierend auf der Lokalisation von Fluoreszenz-markierten Proteinen. Abgeändert nach (Takeshita *et al.*, 2014).

## 1.2 Das Actin-Cytoskelett

Das Actin-Cytoskelett spielt eine zentrale Rolle in der Zellmorphologie eukaryotischer Zellen (Dominguez & Holmes, 2011). Actinfilamente (F-Actin), welche aus linearen Polymeren von G-Actin (globuläres Actin) Untereinheiten zusammengesetzt sind, generieren Kräfte gegenüber der Plasmamembran (PM) und fungieren als Schienen für die Bewegung der Myosin Motorproteine. Die dynamische Natur des Actin-Cytoskeletts, welche durch Zyklen der Polymerisation und Depolymerisation zwischen G- und F-Actin zum Tragen kommt, spielt in vielen verschiedenen Prozessen, darunter auch Zellmotilität, Cytokinese, Sekretion und der Kontrolle der Zellmorphologie, eine wichtige Rolle (Michelot & Drubin, 2011).

Actinfilamente sind aus drei Kernstrukturen aufgebaut: einem doppelsträngigen Actinpolymer, zwei durchgängigen Tropomyosin Filamenten, welche entlang der Seiten des Actins lokalisieren und dem Troponinkomplex. Der Troponinkomplex besteht aus Troponin T, Troponin I und Troponin C, welche an jedem Tropomyosin Dimer lokalisieren (Lehman & Craig, 2008). In Antwort auf einen  $\text{Ca}^{2+}$  Impuls verändert der Troponinkomplex die Position des Tropomyosin Polymers, um die Interaktion von Myosin und Actin zu erleichtern (Lehman & Craig, 2008).

In filamentösen Pilzen existieren drei F-Actin Strukturen höherer Ordnung. Diese sind Actinringe, -patches und kabel (Berepiki *et al.*, 2011). Actinringe haben zusammen mit Myosin-II eine Funktion in der Septierung (Taheri-Talesh *et al.*, 2012, Delgado-Alvarez *et al.*, 2010). Actinpatches sind punkartige Strukturen, die in der Peripherie der Zelle lokalisieren. An ihnen lokalisiert die Endocytose Maschinerie (Araujo-Bazan *et al.*, 2008, Upadhyay & Shaw, 2008). Die vorherrschende Lokalisierung dieser Patches in subapikalen Regionen lässt auf einen räumlichen Zusammenhang zwischen apikaler Exocytose und subapikaler kompensatorischer Endocytose schließen (Penalva, 2010), welche zusätzlich zum endocytotischen Recycling an der Hyphenspitze stattfindet (Shaw *et al.*, 2011). Actinkabel bestehen aus linearen Bündeln kurzer Actinfilamente, die wiederum von Forminen gebildet werden. Diese Kabel befinden sich an der Hyphenspitze und ihnen wird eine Funktion als Schienen für den Myosin-V-abhängigen Vesikeltransport an die Hyphenspitze nachgesagt (Taheri-Talesh *et al.*, 2008, Taheri-Talesh *et al.*, 2012, Berepiki *et al.*, 2011). Der Abbildung 1.2 können die drei Actin Strukturen höherer Ordnung entnommen werden.



**Abbildung 1.2: Actin Strukturen in filamentösen Pilzen.** **A:** F-Actin ist ein asymmetrisches Polymer. Innerhalb eines Filaments bindet das Plusende einer G-Actin Untereinheit an das Minusende einer benachbarten Untereinheit. Zwei Filamente bilden ein helikales Mikrofilament. Das Plusende des Mikrofilaments wächst schnell und an ihm werden Untereinheiten angehängt. Das Minusende wächst nur sehr langsam und an ihm werden vornehmlich Untereinheiten abgetrennt. Drei wichtige Actin Binde Proteine, welche die Dynamik des Mikrofilaments beeinflussen sind Cofilin (disassembliert F-Actin), Profilin (bindet G-Actin) und Capping Protein (bindet an das Plusende von Filamenten und verhindert deren Disassemblierung). **B:** F-Actin bildet drei Strukturen höherer Ordnung mit unterschiedlichen funktionellen Rollen aus. Actinkabel, welche für den polaren Transport wichtig sind. Actinpatches, welche die Endocytose vermitteln. Actinringe, die kontraktile Strukturen darstellen, welche an der Cytokinese beteiligt sind. Maßstabsbalken 2  $\mu\text{m}$ . Abgeändert nach (Berepiki et al., 2011).

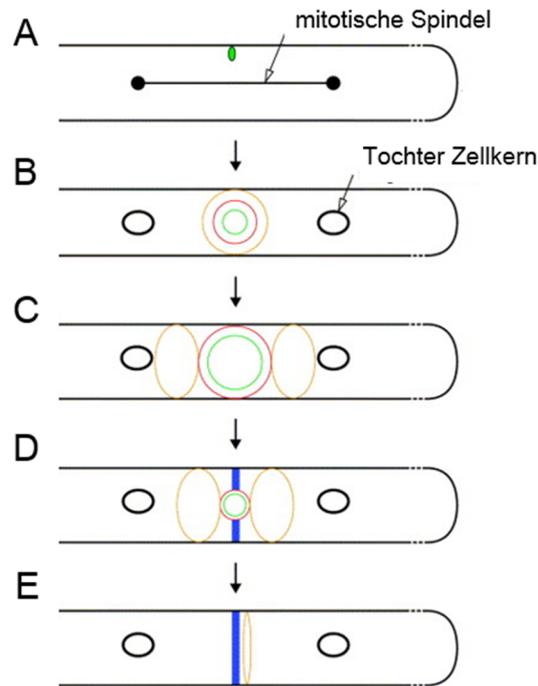
### 1.2.1 Der Actinring und die Septierung

Der Actinring ist ein wichtiger Bestandteil der Cytokinese Maschinerie in Pilzen. Er besteht aus Actin, Myosin-II und anderen mit der Cytokinese assoziierten Proteinen. Der Actinring ist ein Kraft ausübender Ring, welcher mit der Plasmamembran verbunden ist (Pollard, 2010). Die Verschiebung der Actinfilamente durch Myosin-II führt zur Kontraktion des Rings, was die Membraneinstülpung und die Zellwandsynthese dirigiert. Die Nutzung eines kontraktilen Rings ist ein sehr alter Mechanismus, der in Pilzen, Tieren und Protisten vorkommt (Pollard, 2010). Die Cytokinese in Pilzen scheint derer in tierischen Zellen zu ähneln, da in der Septierungszone einiger Pilze (Hunsley & Gooday, 1974, Hoch & Howard, 1980, Raudaskoski, 1970), *A. nidulans* eingeschlossen (Momany & Hamer, 1997), ein zusammenschnürender Actinring beobachtet wurde. In *A. nidulans* formt sich der Ring vor Sichtbarkeit des Septums

und schnürt sich schlussendlich zeitgleich mit der Deposition von Material für die Septenwand ein. Sowohl die Bildung als auch die Kontraktion des Actinrings sind von der Anwesenheit intakter Mikrotubuli abhängig.

Bevor *A. nidulans* Hyphen nicht eine bestimmte Größe erreicht haben, wird kein Septum gebildet (Wolkow *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, durchläuft *A. nidulans* in dieser Zeit jedoch einige Runden der Kernteilung ohne Cytokinese. Nachdem eine ausreichende Größe erreicht ist, wird die Septierung durch die Fertigstellung der darauffolgenden Runde der Mitose angeregt. Danach wird jede parasynchrone Runde der Mitose in der Hyphenspitze von einer Welle der Septierung in der basalen Region begleitet (Harris, 2001). Nach der Fertigstellung der Mitose formt das Septin AspB einen einzelnen Ring, der mit dem Actinring in der Septierungszone überlappt. Zeitgleich mit der Kontraktion des Actinrings und der Deposition von Material für die Septenwand, teilt sich AspB in zwei Ringe, welche das neue Septum flankieren. Letztendlich bleibt der Ring an der apikalen Seite bestehen und der basale Ring wird abgebaut (Momany *et al.*, 2001). Ähnlich wie die *S. cerevisiae* Septine, könnte AspB helfen die intrinsische Polarität von *A. nidulans* Hyphen durch die Lokalisierung spezifischer Zellzyklusregulatoren und/oder morphologischen Erkennungszeichen (*landmarks*), zu propagieren (Chant *et al.*, 1995, Longtine *et al.*, 2000).

Einige Formine von Metazoen und Pilzen spielen wesentliche Rollen in der Organisation des Actin-Cytoskeletts an der Stelle der Cytokinese (Wasserman, 1998). Nach der Mitose ist das Formin SepA notwendig, um den Actinring in Septierungszonen zu assemblieren (Harris *et al.*, 1997). SepA erscheint zunächst als ein kortikaler Punkt an der zukünftigen Septierungszone (Sharpless & Harris, 2002). Danach formt es einen Ring, der mit dem Actinring co-lokalisiert und schlussendlich kontrahiert, wenn Material für die Septumwand deponiert wird. SepA-Ringe erfordern die Anwesenheit eines intakten Actinrings für ihre Assemblierung. Ähnlich bedarf der Aufbau des AspB-Rings ebenfalls der Integrität des Actin-Cytoskeletts und funktionalem SepA (Momany *et al.*, 2001). Abbildung 1.3 kann der schematische Ablauf der Septierung in *A. nidulans* entnommen werden.

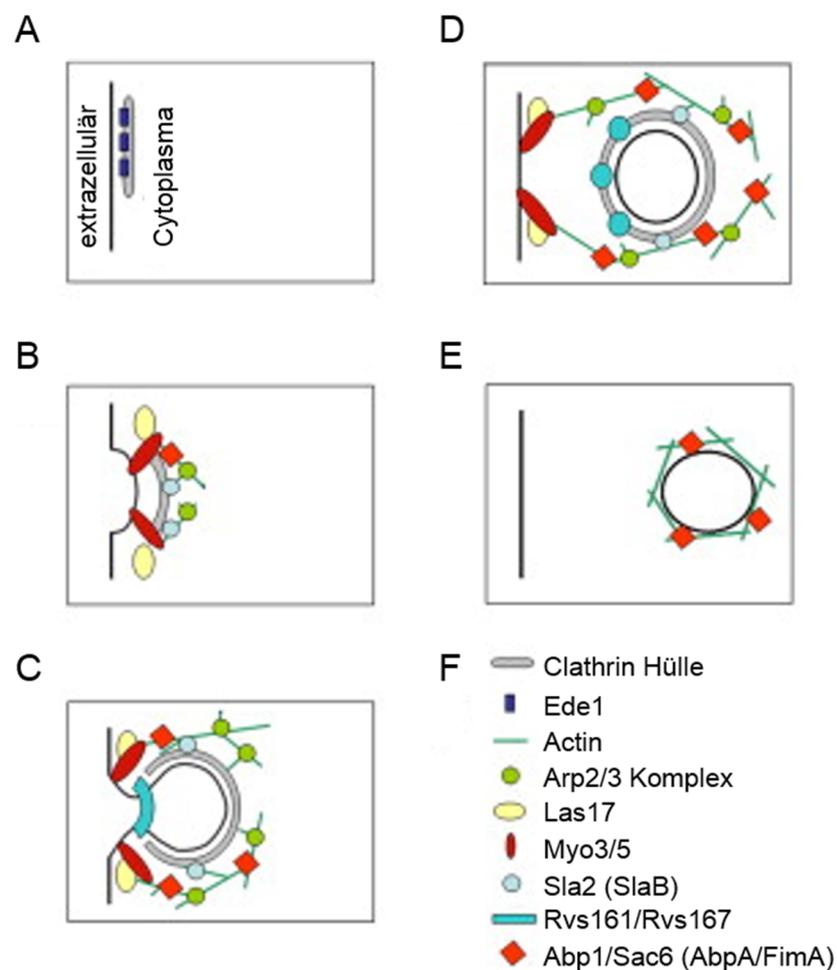


**Abbildung 1.3: Schematisches Modell der Septierung in *A. nidulans*.** **A:** In Antwort auf Signale von der mitotischen Spindel, lokalisiert SepA als ein kortikaler Punkt (grün) an der Septierungsstelle. Obwohl hier nicht gezeigt, könnten Patches aus Actin und/oder dem Septin AspB mit SepA co-lokalisieren. **B:** Das Septenband, das aus co-lokalisierenden Actin- (rot), AspB (orange) und SepA (grün) Ringen besteht, assembliert. Die Tochter Zellkerne haben die Mitose abgeschlossen. **C:** Der AspB Ring teilt sich in zwei Ringe, welche die Actin und SepA Ringe flankieren. Die Teilung des AspB Rings triggert möglicherweise die Einschnürung des Actinrings. **D:** Die Actin und SepA Ringe kontrahieren, während Septenwandmaterial (blau) deponiert wird. **E:** Nach der Fertigstellung der Septierung verschwinden die Actin, SepA und basalen AspB Ringe, wohingegen der apikale AspB Ring bestehen bleibt. Abgeändert nach (Harris, 2001).

## 1.2.2 Actinpatches und Endocytose

Die Endocytose ist der Prozess mit Hilfe dessen eukaryotische Zellen Plasmamembran Lipide und assoziierte Proteine innerhalb von Vesikeln internalisieren. Diese Vesikel fusionieren daraufhin mit dem endosomalen System. Die darauf folgende Sortierung in verschiedene endosomale Domänen entscheidet, ob die Fracht des Vesikels in die Plasmamembran zurück recycelt, zum Golgi transportiert oder dem endocytotischen Signalweg in das Lumen der Vakuolen folgt und daraufhin degradiert wird (Penalva, 2010). Der molekulare Mechanismus der Endocytose in der Bäckerhefe ist in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt. Dieser läuft im Groben etwa wie folgt ab. Das Hüllprotein Clathrin und der Adapter Ede1 gehören zu den ersten Proteinen, welche am Ort der Endocytose eintreffen (Newpher & Lemmon, 2006, Toshima *et al.*, 2006) (Abb. 1.4 A). Als nächstes findet sich der Arp2/3 Komplex Aktivator Las17 ein. Der Arp2/3 Komplex vermittelt anschließend die Assemblierung des Actin Netzwerks (Kaksonen *et al.*, 2003). Während Ede1 abwandert, akkumuliert Sla2, ein weiteres Hüllprotein, an der entstehenden Endocytose Stelle (Kaksonen *et al.*, 2003) (Abb. 1.4 B). Als nächstes werden die Motorproteine Myo3 und Myo5 zum sich aufbauenden Actinpatch rekrutiert (Sun *et al.*, 2006). Eine Verbindung zwischen der Hülle und dem Actin Netzwerk

könnte durch Sla2 hergestellt werden (Kaksonen *et al.*, 2003, Newpher & Lemmon, 2006). Die Actin-Bindeproteine Abp1 und Sac6 (Fimbrin) sind für die Dynamik des Actin Netzwerkes wichtig (Kaksonen *et al.*, 2005). Die von Myo3/5 generierten Kräfte stülpen die Membran am Actinpatch ein (Sun *et al.*, 2006). Die Amphiphysine, Rvs161 und Rvs167, werden für die Abschnürung der eingestülpten Membran und für den Aufbau des eingebetteten endocytotischen Vesikels benötigt (Kaksonen *et al.*, 2005) (Abbildung 1.4 C und D). Schlussendlich löst sich die Hülle auf und das endocytotische Vesikel wird internalisiert. Daraufhin wird es weitertransportiert, um mit den *early endosomes* (EEs) zu fusionieren (Abb. 1.4 E).



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Endocytose in *S. cerevisiae*.** Die Komponenten und Mechanismen werden im Text beschrieben. Homologe aus *A. nidulans* sind in Klammern hinter den *S. cerevisiae* Proteinen in (F) angegeben. Abgeändert nach (Shaw *et al.*, 2011).

Neben dem exzessiven Transport von Vesikeln und der daraus resultierenden Exocytose ist auch die Endocytose extrem wichtig für das polare Hyphenwachstum. Der kontinuierliche Einbau neuer Proteine und Lipide am Apex impliziert, dass ein Mechanismus existieren muss, welcher sicherstellt, dass überflüssige Membranproteine und Proteine der Exocytose

Maschinerie effizient recycelt werden. Obwohl Endocytose auch an anderen Stellen der Zelle stattfinden kann, findet man die Maschinerie für die endocytotische Internalisierung vornehmlich an der Hyphenspitze, wo sie einen subapikalen Ring formt. Die räumliche Nähe dieses Rings zu der apikalen Region, zu welcher sekretorische Vesikel transportiert werden, lässt die Beseitigung überschüssiger Proteine und Lipide, welche die Plasmamembran zusammen mit den Vesikeln erreichen, zu (Abenza *et al.*, 2009, Araujo-Bazan *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2008, Taheri-Talesh *et al.*, 2008, Upadhyay & Shaw, 2008, Zekert & Fischer, 2009). Schnelles endocytotisches Recycling kann so die Polarität aufrechterhalten (Abenza *et al.*, 2009, Taheri-Talesh *et al.*, 2008, Valdez-Taubas & Pelham, 2003). Es scheint plausibel, dass dieser Mechanismus dazu in der Lage ist eines oder mehrere der Proteine, welche als Positionsmarker der Polarität fungieren zu polarisieren und dadurch die Aufrechterhaltung der Polarität zu vermitteln. Die polarisierte Sekretion liegt dem polaren Wachstum zugrunde und spiegelt die Polarisierung des Mikrotubuli Cytoskeletts wider. Nach dem Transport zur Spitze über Mikrotubuli, jedoch vor der Fusion mit der Membran, akkumulieren sekretorische Vesikel in einer Struktur, die Spitzenkörper (SPK) genannt wird (Grove & Bracker, 1970, Harris *et al.*, 2005). Der Spitzenkörper ist eine, in filamentösen Pilzen einzigartige, spezialisierte Struktur, welche die Hyphenform und die Wachstumsrichtung der Hyphe beeinflusst (Riquelme & Sanchez-Leon, 2014, Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995). Seine exakte Komposition und Organisation ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch ist das Actin-Cytoskelett für seine Organisation erforderlich (Sanchez-Leon *et al.*, 2011). In den geläufigen Modellen stellt der SPK jenen Ort dar, an dem der Vesikeltransport vom Langstreckentransport über Mikrotubuli zum Kurzstreckentransport über Actinkabel zur apikalen Plasmamembran wechselt (Harris *et al.*, 2005). Dadurch werden die Vesikel effizient über Actinfilamente zur Spitze transportiert und können so in der Exocytose mit der Plasmamembran fusionieren.

F-Actin dominiert in Hyphenspitzen (Araujo-Bazan *et al.*, 2008, Taheri-Talesh *et al.*, 2008, Upadhyay & Shaw, 2008, Harispe *et al.*, 2008, Harris *et al.*, 1994). Actinpatches sind Akkumulationen aus F-Actin und einer Vielzahl von Proteinen, welche an der Endocytose in pilzlichen Zellen beteiligt sind (Kübler & Riezman, 1993, Mulholland *et al.*, 1994, Robertson *et al.*, 2009). In Hyphen sind endocytotische Actinpatches stark polarisiert, hingegen während der kurzen Phase des isotropen Wachstums sind sie willkürlich in der Zelle verteilt. Doch sobald die Polarität der Zelle etabliert ist, lokalisieren sie in einem subapikalen Ring. Actinpatches werden zunächst an der Membran assembliert. Nach der Einstülpung und Abschnürung gehen Actin und andere Komponente, welche endocytotische Vesikel umhüllen, nach und nach verloren, während die Vesikel zu endosomalen Kompartimenten transportiert werden (Huckaba *et al.*, 2004). In wachsenden Regionen der Hyphe wird die Endocytose als kompensatorischer Mechanismus für die exzessive Exocytose angesehen und vermutlich hilft sie dabei Rezeptoren und andere Membranproteine zu recyceln (Penalva, 2010, Steinberg,

2007, Shaw *et al.*, 2011). Weil die endocytotische Internalisierung von F-Actin gelenkt wird (Kaksonen *et al.*, 2005), ist die vorherrschende Lokalisierung von Actinpatches an der Spitze, zumindest teilweise, für die Polarisierung von F-Actin verantwortlich. Eine Möglichkeit wäre, dass *A. nidulans* die Endocytose nutzt, um die dynamische Lokalisierung von Zellendmarkern aufrecht zu erhalten (Upadhyay & Shaw, 2008).

In *S. cerevisiae* findet Endocytose Actin-abhängig an zwei verschiedenen kortikalen Strukturen statt, welche sich in ihrer Motilität und Proteinzusammensetzung unterscheiden. Zum einen an Actinpatches, welche motile Strukturen mit einer wechselnden Proteinzusammensetzung darstellen. An ihnen findet die Clathrin-abhängige Endocytose statt, welche einen geordneten Signalweg darstellt, in dem verschiedene Proteinmodule sequentielle Rollen während der Membraneinstülpung und der Vesikelabschnürung spielen (Kaksonen *et al.*, 2005, Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003, Huckaba *et al.*, 2004, Newpher & Lemmon, 2006, Newpher *et al.*, 2005, Sun *et al.*, 2006). Zum anderen Eisosomen, welche weniger gut untersucht und statisch sind (Walther *et al.*, 2006). Die beiden Signalwege haben vermutlich einige Proteinkomponenten gemeinsam, jedoch dominiert der Eisosomsignalweg in der Mutterzelle und der Actinpatchsignalweg in der Knospe (Walther *et al.*, 2006).

Abp1 (*Actin binding protein 1*) aus Hefe ist wahrscheinlich ein negativer Regulator für die Arp2/3 vermittelte Actin Assemblierung (Sun *et al.*, 2006, D'Agostino & Goode, 2005) und bindet an Actinfilamente (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003, Drubin *et al.*, 1988, Quintero-Monzon *et al.*, 2005). Abp1 ist ein guter Marker für Endocytose, weil es nicht mit Actinkabeln assoziiert und ausschließlich an Actinpatches bindet (Huckaba *et al.*, 2004, Drubin *et al.*, 1988). AbpA ist das Homolog zu Abp1 in *A. nidulans* (Araujo-Bazan *et al.*, 2008). Dieses lokalisiert an kortikalen, punktförmigen Strukturen, welche subapikal unterhalb des extremen Apex zu finden sind (Araujo-Bazan *et al.*, 2008). Im Zuge dieser Arbeit wurde AbpA als Marker für den subapikalen Endocytotischen Actinring verwendet.

### 1.2.3 Formine

Formine sind von Pilzen bis hin zu Menschen konservierte Proteine, die Actinfilamente nukleieren und von C-terminalen FH1 (*formin homology*) und FH2 Domänen charakterisiert werden. Die FH2 Domäne vermittelt die Actinfilament Assemblierung durch ihre prozessive Bindung an das Plusende des Filaments, dabei verhindert sie die Bindung von *capping* Proteinen und ermöglicht die Elongation (Kovar *et al.*, 2003, Kovar *et al.*, 2005, Moseley *et al.*, 2004, Pruyne *et al.*, 2002, Zigmond *et al.*, 2003). Die FH1 Domäne enthält Bindestellen für Profilin-Actin Komplexe. Die Interaktion zwischen Profilin und der FH1 Domäne ist für die Rekrutierung von Actin Monomeren an diese Stelle notwendig (Evangelista *et al.*, 2002, Kovar *et al.*, 2003, Kovar *et al.*, 2005, Pruyne *et al.*, 2002, Moseley *et al.*, 2004). *A. nidulans* und *N.*

*crassa* besitzen je nur ein einziges Formin, die Hefen *Saccharomyces pombe* und *S. cerevisiae* hingegen beherbergen mehrere Formine, welche die Actin Assemblierung an distinkten Orten in der Zelle katalysieren (Kovar *et al.*, 2011, Buttery *et al.*, 2007). In *A. nidulans* und *N. crassa* sind die Formine, SepA und BNI-1, an den Hyphenspitzen konzentriert und lokalisieren in einem Mondsichel-förmigen Areal am äußersten Apex und in einem Punkt dahinter, welcher mit dem Spitzenkörper co-lokalisiert (Harris *et al.*, 1997, Sharpless & Harris, 2002, Justa-Schuch *et al.*, 2010). Zusätzlich lokalisieren sie an den Septen, wo sie die Bildung des Actinrings katalysieren (Lichius *et al.*, 2012, Sharpless & Harris, 2002). Die SepA Lokalisation am Apex und den Septen ist dynamisch. Am Apex korreliert sie mit der Wachstumsrichtung (Sharpless & Harris, 2002). In *A. nidulans* wird SepA durch den Zellendmarkerkomplex an der Spitze positioniert und gewährleistet dadurch eine polare Assemblierung der Actinkabel.

#### 1.2.4 Actinkabel und assoziierte Motoren

Actinkabel sind Bündel aus von Formin nukleiertem F-Actin, das durch Tropomyosin und Fimbrin vernetzt wird (Evangelista *et al.*, 2002, Moseley & Goode, 2006, Pruyne *et al.*, 2002). In filamentösen Pilzen stellen Actinkabel das Schienennetzwerk für den Transport zahlreicher Moleküle, so auch sekretorischer Vesikel, Actinpatches, Peroxisomen, Golgi Äquivalente, Mitochondrien, Vakuolen und Endosomen dar (Berepiki *et al.*, 2010, Motegi *et al.*, 2001, Pantazopoulou & Penalva, 2009, Fehrenbacher *et al.*, 2003, Rida *et al.*, 2006, Rossanese *et al.*, 2001, Suelmann & Fischer, 2000, Upadhyay & Shaw, 2008, Steinberg, 2007). Der zielgerichtete Transport von Molekülen wird durch die Myosin-V-abhängige Translokation entlang eines Actinkabels oder durch die Befestigung an wachsenden Actinkabeln erreicht (Fehrenbacher *et al.*, 2003). Myosine sind eine große Familie diverser Mechanoenzyme, die sobald sie mit Actinfilamenten interagieren, Energie von der ATP Hydrolyse in mechanische Kraft umwandeln (Hasson & Mooseker, 1995). In *S. cerevisiae* sind drei Myosin Familien, Myosin-I, Myosin-II und Myosin-V, konserviert. Das Myosin-V Myo2 transportiert Vesikel und andere Organellen, wie den Golgi, Mitochondrien, Vakuolen und Peroxisomen (Pruyne *et al.*, 2004). Manche mRNA Moleküle werden von einem anderen Myosin-V, Myo4, transportiert (Shepard *et al.*, 2003). Myosin-I Proteine agieren während der Endocytose und sind in die Actinpatch Formation involviert (Kim & Flavell, 2008). Myosin-II Motoren sind in die Cytokinese involviert und helfen dabei während des Schrumpfens des Actomyosinrings (Pollard, 2010).

Der Organellentransport in *S. cerevisiae* ist gänzlich von Actin abhängig (Mishra *et al.*, 2014), hingegen spielen in filamentösen Pilzen sowohl das Actin als auch das Mikrotubuli Cytoskelett eine Rolle in diesem Prozess (Fuchs *et al.*, 2002, Fuchs *et al.*, 2005, Suelmann & Fischer, 2000). In der Bäckerhefe sind Actinkabel in sich nicht-teilenden Zellen zufällig verteilt,

wohingegen sie während des polaren Wachstums in der späten G1 bis zur M Phase entlang der Mutter-Knospen-Achse orientiert sind (Moseley & Goode, 2006). Actinkabel spielen in diesem Organismus in der polarisierten Lokalisation von Actinpatches und der mitotischen Spindel eine Rolle, sowie im Transport von sekretorischen Vesikeln und mRNAs (Moseley & Goode, 2006). In Interphase Zellen der Spaltheefe, *S. pombe*, sind Actinpatches an den wachsenden Enden der Zelle lokalisiert, während Actinkabel sich über die Länge der Zelle erstrecken. Hier sind Actinkabel in den intrazellulären Transport von Molekülen involviert (Mishra *et al.*, 2014). Eine Vielzahl an Actin Binde Proteinen (ABPs) ist in die Regulation des Actin-Cytoskeletts involviert. Eines dieser ABPs ist Tropomyosin. Obwohl einige Marker für die Visualisierung von Actinkabeln zur Verfügung stehen, blieb die exakte Organisation und Dynamik von Actinkabeln bisher schwer zugänglich.

### 1.2.5 Marker für das Actin-Cytoskelett

Actinkabel sind generell sehr schwierig zu visualisieren. In eukaryotischen Zellen wurde zu diesem Zweck häufig Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes (Wieland, 1979), welches an Actinfilamente bindet, konjugiert mit Fluoreszenzmarkern, genutzt. Auch in der Bäckerhefe (Amberg, 1998), der Spaltheefe (Pelham & Chang, 2001) und *Ashbya gossypii* (Walther & Wendland, 2004) wurde dieser Marker verwendet. In den meisten filamentösen Pilzen, so auch in *Aspergillus nidulans*, funktioniert die Anfärbung des Actin-Cytoskeletts mit Phalloidin-Konjugaten jedoch nicht (Brent Heath *et al.*, 2003). Für die Anfärbung von Actinfilamenten in filamentösen Pilzen wurden daher spezifische Marker, wie Lifeact und Tropomyosin (TPM), entwickelt (Delgado-Alvarez *et al.*, 2010, Taheri-Talesh *et al.*, 2008, Berepiki *et al.*, 2010).

Tropomyosine sind konservierte Actinfilament bindende Proteine, welche die Interaktion von Actin und Myosin in Antwort auf  $Ca^{2+}$  regulieren (Gunning *et al.*, 2005). Tropomyosine wurden bereits in *A. nidulans* und *N. crassa* als Marker für Actinkabel verwendet (Pearson *et al.*, 2004, Evangelista *et al.*, 2002). Jedes Actinfilament des Cytoskeletts beinhaltet ein Homopolymer aus Tropomyosin Homodimeren, was in einem Tropomyosin Filament entlang der gesamten Länge des Actinfilaments resultiert (Gunning *et al.*, 2015). Die meisten Pilze sind in der Lage verschiedene Tropomyosin Isoforme zu exprimieren. Diese stammen entweder von unterschiedlichen Genprodukten, oder post-translationalen Modifikationen (Gunning *et al.*, 2015). Die kooperative Interaktion des Tropomyosin Filaments mit einem Actinfilament ist essentiell für die Funktion von Tropomyosin. Über diese Interaktion werden die Wechselbeziehungen mit anderen Actin Bindeproteinen, wie Myosin oder Cofilin, sowie die biophysikalischen und dynamischen Eigenschaften des Actinfilaments reguliert (Bryce *et al.*, 2003). Dadurch sind verschiedene Tropomyosine in der Lage Actinfilamenten unterschiedliche physikalische Eigenschaften zu vermitteln und bestimmen demzufolge deren Mobilität einer Zelle. Für die Zelle ist es äußerst wichtig die richtige Tropomyosin Isoform zu einem

Actinfilament zur rechten Zeit und am rechten Ort zu rekrutieren (Bach *et al.*, 2009). *A. nidulans* und *S. pombe* besitzen jeweils nur ein einziges Tropomyosin (TpmA, beziehungsweise Cdc8) (Pearson *et al.*, 2004, Johnson *et al.*, 2014). In *S. pombe* existiert Cdc8 in zwei Formen. Zum einen N-terminal acetyliert, zum anderen nicht acetyliert, wobei die acetylierte Form vornehmlich vorkommt und mit Actinfilamenten, welche in den Actomyosinring während der Mitose eingebaut werden und nicht acetyliertes Cdc8 mit den dynamischeren Actinfilamenten während der Interphase assoziiert (Skoumpla *et al.*, 2007, Coulton *et al.*, 2010).

In *S. cerevisiae* bindet Abp140p an kortikale Actinpatches und Actinkabel (Asakura & Tanaka, 1998). Lifeact besteht aus den 17 N-terminalen Aminosäuren von Abp140p. Es konnte gezeigt werden, dass diese ausreichend sind um *in vitro* und in Hefezellen an Actin zu binden und es zu visualisieren (Riedl *et al.*, 2008).

In *N. crassa* konnte sowohl für Lifeact als auch für TPM1 eine Co-Lokalisierung mit dem Spitzenkörper gezeigt werden. Zusätzlich färben diese Marker in *N. crassa* lange Actinfilamente und Patches in der Zone der Endocytose sowie in distalen Bereichen der Hyphen an (Delgado-Alvarez *et al.*, 2010, Berepiki *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beide Actin Marker vor der Septierung in Actinringen lokalisieren (Delgado-Alvarez *et al.*, 2010). Es ist möglich mit Lifeact in *N. crassa* komplexe Actin Strukturen während der Etablierung und Aufrechterhaltung des polaren Wachstums zu visualisieren (Berepiki *et al.*, 2010). Diese Strukturen zeigten zudem retrograde Bewegungen, welche mit dem polaren Wachstum einhergehen (Berepiki *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass sich die F-Actin Lokalisation in vollentwickelten *N. crassa* Hyphen von derer in Keimschläuchen unterscheidet. Während F-Actin in ausgewachsenen Hyphen in einem konzentrierten Punkt an der Hyphenspitze lokalisiert, kann ein dichtes Netzwerk von Actinkabeln in Keimschläuchen beobachtet werden (Berepiki *et al.*, 2010). Eine Fusion des *A. nidulans* Tropomyosins TpmA mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) wurde bereits zur Visualisierung von Actinkabeln in *A. nidulans* verwendet. Dieses Fusionsprotein konnte Actin effektiv im SPK nachweisen und zeigte gelegentlich lange Actinkabel an der Hyphenspitze. Es ist nicht in kortikalen Actinpatches vorhanden, jedoch kann ein Actinring an Septen detektiert werden (Taheri-Talesh *et al.*, 2008, Pearson *et al.*, 2004). Mit Hilfe dieser Actin Marker wurden Actinkabel zwar visualisiert, jedoch hat eine Quantifizierung der Actindynamik in filamentösen Pilzen bisher nicht stattgefunden.

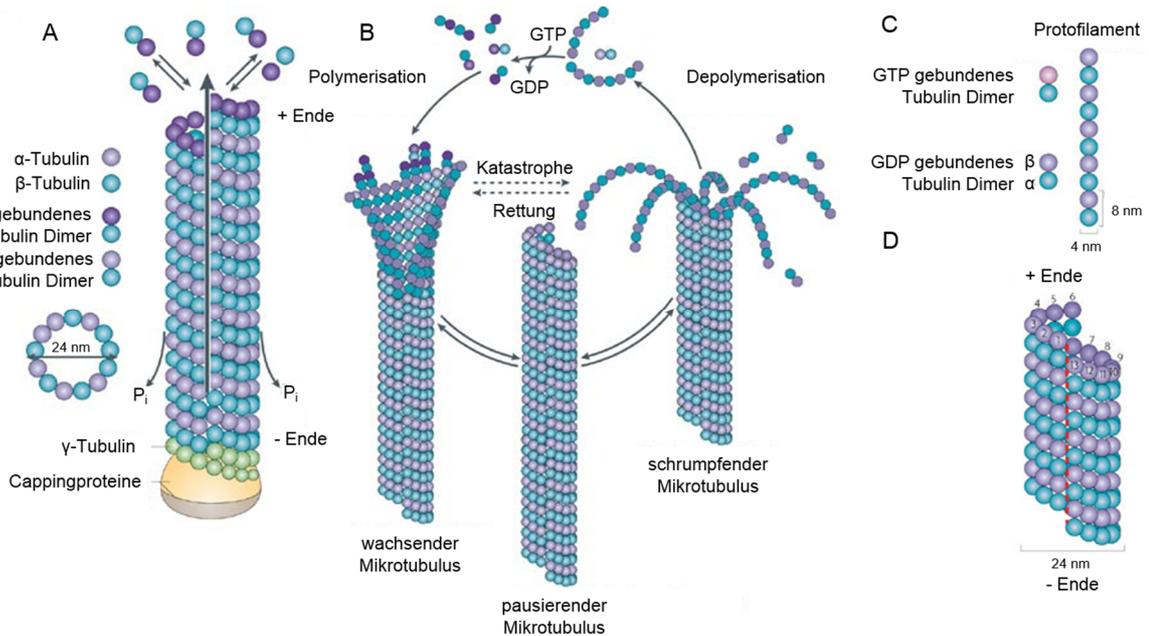
Eine weitere Möglichkeit Actin zu untersuchen ist die Verwendung von sogenannten *Nanobodies*. Dies sind spezifische Antikörper, welche in Kamelen vorkommen. Sie besitzen nur eine schwere Kette und sind dadurch um ein vielfaches kleiner als herkömmliche Antikörper (Muyldermans *et al.*, 1994, Muyldermans *et al.*, 2001). Dadurch entsteht die Möglichkeit sie innerhalb der Zelle und zusätzlich an ein Fluorophor gekoppelt, zu exprimieren (Rocchetti *et al.*, 2014). Sie sind, sogar unter schwierigen Bedingungen, wie hohen

Temperaturen oder denaturierenden Konditionen, sehr gut löslich und äußerst stabil. Nanobodies weisen eine konvexe Konformation auf (Muyldermans *et al.*, 2001, Desmyterl *et al.*, 1996), die es ihnen erlaubt an ansonsten unzugänglichen Stellen oder Proteine zu binden. In *A. thaliana* konnte mit Hilfe eines solchen Nanobodies, welcher an GFP fusioniert wurde, die Dynamik des Actincytoskeletts *in vivo* gezeigt werden. Es wurden sowohl dickere Bündel als auch feinere Actinfilamente angefärbt, was ein kompletteres Bild des Actincytoskeletts, als jenes durch Anfärbung mit fluoreszenten ABPs, darstellt (Rocchetti *et al.*, 2014). Zusätzlich wäre es möglich das an GFP gekoppelte *actA* Gen unter einem induzierbaren Promotor in *A. nidulans* einzubringen. Durch eine ektopische Integration und die Wahl geeigneter Expressionsbedingungen könnten auch durch diesen Ansatz neue Erkenntnisse gewonnen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung eines *leaky stop codons* (Freitag *et al.*, 2012, Stiebler *et al.*, 2014) zusammen mit einer ektopischen Integration des *gfp-actA* Fusions-Gens. Dies hätte ebenfalls eine sehr geringe Expression zur Folge, die möglicherweise keine so starke Hinderung zur Folge hätte.

## 1.4 Das Mikrotubuli Cytoskelett

Mikrotubuli sind hohle Röhren, die aus einem Netz von  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin Heterodimeren aufgebaut sind. Sie haben einen äußeren Durchmesser von 25 nm und einen Hohlraum von 17 nm im Innenraum der Röhre (Hawkins *et al.*, 2010). Es gibt viele verschiedene Theorien, wie die Assemblierung der Mikrotubuli von statten geht, die zwei geläufigsten sind das Matrizen- und das Protofilamentmodell. Im Matrizenmodell bilden dreizehn  $\gamma$ -Tubuline eine ringförmige Basisstruktur, an der  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Heterodimere binden und Mikrotubuli polymerisieren (Zheng *et al.*, 1995, Oakley *et al.*, 1990). Wohingegen das Protofilamentmodell besagt, dass  $\gamma$ -Tubulin eine kurze Helix mit kurzen Filamenten ausbildet, an der sich die Heterodimere ausrichten und Protofilamente bilden. Dreizehn dieser Protofilamente binden lateral aneinander, sodass eine Plattenstruktur entsteht, welche sich dann wiederum zu einer Röhre formt (Meurer-Grob *et al.*, 2001, Hirose & Amos, 2007, Erickson & Stoffler, 1996). Mikrotubuli wachsen und schrumpfen *in vitro* in einer tretmühlenartigen Art und Weise, hingegen *in vivo* sind die Minusenden sehr stabil und die Plusenden sehr dynamisch. An den Plusenden können  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Heterodimere hinzugefügt oder weggenommen werden, was in einem Wechsel zwischen Wachstum und Schrumpfen der Mikrotubuli Filamente resultiert (Desai & Mitchison, 1997, Mitchison & Kirschner, 1984, Fischer *et al.*, 2008). Die Elongationsrate der Mikrotubuli hängt von der Konzentration der  $\alpha$ - $\beta$ -Dimere in der Zelle ab. Beide Tubulinuntereinheiten enthalten eine GTP Bindestelle, die Bindestelle der  $\alpha$ -Untereinheit ist stabil, jedoch die der  $\beta$ -Untereinheit ist in der Lage Hydrolyse zu betreiben, wodurch eine Mikrotubuli-Katastrophe eintritt (Heald & Nogales, 2002, Nogales *et al.*, 1998).

Das Mikrotubuli Cytoskelett ist in eukaryotischen Zellen für viele dynamische Prozesse verantwortlich. Darunter auch Chromosom Segregation, Organellentransport und der Transport von Proteinen (Basu & Chang, 2007). Diese vielfältigen Funktionen sind nicht nur der inhärenten dynamischen Instabilität, sondern auch der Assoziation von Mikrotubuli mit verschiedenen molekularen Motoren, wie Kinesin oder Dynein, zuzuschreiben.



**Abbildung 1.5: Schema der Mikrotubuli Assemblierung.** **A:** Mikrotubuli sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulinen aufgebaut. Diese binden einander und formen so Heterodimere. Jene Heterodimere formen wiederum polare Protofilamente, die dadurch entstehen, dass Heterodimere einander binden. Ein Mikrotubulus besteht dabei aus 13 aneinander gereihten Protofilamenten, die eine hohle Röhre mit ca. 24 nm Durchmesser bilden. Hierdurch entsteht ein sogenannter Saum (Pfeil bzw. rote gestrichelte Linie in D). Laut dem Matrizenmodell dient  $\gamma$ -Tubulin als Matritze für die Assemblierung des Filaments. Cappingproteine stabilisieren das langsam wachsende Minusende, am Plusende werden Tubulin-Heterodimere angefügt. **B:** Sobald ein neues Dimer am Plusende angefügt wird, wird das Dimer hydrolysiert. Das Plusende hat normalerweise ein Minimum an GTP gebundenen Dimeren, welche das Filament stabilisieren. Gehen diese verloren, Depolymerisiert das Protofilament schnell. **C:** Mikrotubuli werden aus stabilen  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimeren aufgebaut, welche sich zu Protofilamenten zusammenfügen. **D:** *in vivo* wird der zylindrische, helikale Mikrotubulus aus 13 solcher Protofilamente aufgebaut. Abgeändert nach (Akhmanova & Steinmetz, 2008, Conde & Caceres, 2009).

Das Genom von *A. nidulans* beherbergt zwei  $\alpha$ -Tubulin Gene (*tubA*, *tubB*), zwei  $\beta$ -Tubulin Gene (*benA*, *tubC*) und ein  $\gamma$ -Tubulin Gen (*mipA*) (Morris *et al.*, 1979, Sheir-Neiss *et al.*, 1978, Oakley, 2004). *tubA* kodiert für das bedeutendste vegetative  $\alpha$ -Tubulin Protein, wohingegen *tubB* vornehmlich während der sexuellen Entwicklung exprimiert wird (Kirk & Morris, 1993). Das *benA* Gen kodiert für zwei  $\beta$ -Tubulin Polypeptide und wird vorrangig zu *tubC* exprimiert (Sheir-Neiss *et al.*, 1978, Sheir-Neiss *et al.*, 1976). Das Produkt des *tubC* Gens hat eine spezialisierte, aber nicht essentielle, Rolle in der Konidiosporenbildung (May *et al.*, 1985, Weatherbee *et al.*, 1985).  $\gamma$ -Tubulin spielt eine essentielle Rolle in der Mikrotubuli Organisation und determiniert dabei sowohl den Ort als auch die Polarisierung des Mikrotubuli Ursprungs.

Zudem hat es wichtige Aufgaben in der Mitose (Oakley *et al.*, 1990, Oakley, 1992) und ist ein bedeutender Bestandteil der MTOCs (*Microtubule Organizing Centers*), wo es die Basis für den  $\gamma$ -Tubulin Ring Komplex ( $\gamma$ -TURC) bildet, welcher ein Gerüst für die Assemblierung der Mikrotubuli darstellt (Horio *et al.*, 1991, Joshi *et al.*, 1992, Liang *et al.*, 1996, Martin *et al.*, 1997, Stearns *et al.*, 1991). In *A. nidulans* gibt es zwei verschiedene MTOCs, Spindelpolkkörper (SPBs, *spindle pole bodys*) und sMTOCs (*septal MTOCs*), welche für die Bildung und Aufrechterhaltung von cytoplasmatischen Mikrotubuli zuständig sind (Veith *et al.*, 2005).

Es gibt eine Reihe von Proteinen, welche mit Mikrotubuli interagieren und diese dadurch regulieren. Eine Klasse sind die *Plus end tracking proteins* (+TIPs). Sie assoziieren mit und binden an wachsende Mikrotubuli Plusenden, dadurch regulieren sie die Dynamik der Mikrotubuli und sind sehr wichtig für die Interaktionen zwischen Kortex und Mikrotubuli (Akhmanova & Hoogenraad, 2005, Xiang, 2006). In *S. pombe* unterstützen solche Interaktionen die Signalweitergabe von Polaritätsinformationen zum Zell Kortex (Nelson, 2003). In *S. cerevisiae* hingegen ist eine solche Interaktion des Kortex mit +TIPs für die Positionierung der mitotischen Spindel verantwortlich. In Mitosezellen der Bäckerhefe leitet das +TIP Kar9 einen SPB in die Knospe. Dies geschieht durch die Verknüpfung von astralen Mikrotubuli mit dem Actin-Cytoskelett durch die Interaktion von Kar9 mit Myo2 (Yin *et al.*, 2000, Hwang *et al.*, 2003). In Säugetieren lokalisiert der Tumor-Suppressor *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), welcher ein funktionales Homolog zu Kar9 ist, an Mikrotubuli Plusenden und reguliert die Organisation des Mikrotubuli Cytoskeletts (McCartney & Näthke, 2008, Gundersen, 2002). Zusätzlich interagiert APC direkt mit dem Formin mDia und stimuliert dadurch die Actin Assemblierung (Okada *et al.*, 2010). MigA ist das in *A. nidulans* konservierte funktionale Homolog zu Kar9. Es lokalisiert an Mikrotubuli Plusenden und interagiert mit dem Myosin-V MyoE. Die Deletionsmutante von *migA* zeigt einen Defekt in der Mikrotubuli Konvergenz an der Hyphenspitze. Dies könnte auf einen Defekt in der Mikrotubuli Führung hindeuten (Manck *et al.*, 2015). MigA könnte, ähnlich wie APC, in die Regulation der Mikrotubuli-abhängigen Actinkabel Assemblierung involviert sein. Dies würde bedeuten, dass MigA einen Adapter zwischen dem Actin und dem Mikrotubuli Cytoskelett darstellt.

Eine weitere Klasse von Proteinen, die mit Mikrotubuli interagieren, sind die MAPs (*Microtubule Associated Proteins*). Sie dekorieren das Filament und kontrollieren dadurch die Aktivität von Mikrotubuli assoziierten Motorproteinen (Baas *et al.*, 1994, Baas & Qiang, 2005, Cassimeris & Spittle, 2001). Eines der MAPs wurde in *Xaenopus laevis* entdeckt und daher XMAP215 genannt (Gard & Kirschner, 1987). Ähnliche Proteine können in Eukaryoten von Pflanzen bis hin zum Menschen gefunden und mittlerweile in die Dis1/XMAP215 Familie eingeteilt werden (Ohkura *et al.*, 2001). Diese Proteine assoziieren und stabilisieren alle Mikrotubuli (Kinoshita *et al.*, 2002). AlpA, ein DIS/XMAP215 Protein aus *A. nidulans* lokalisiert an den SPBs und Mikrotubuli Plusenden. Es agiert als Mikrotubuli Polymerase und fügt dem

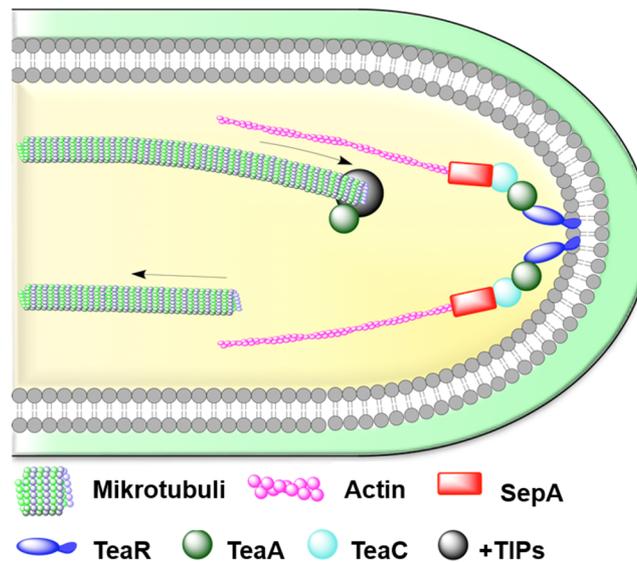
wachsenden Plusende Tubulin-Dimere zu (Brouhard *et al.*, 2008, Takeshita *et al.*, 2013). In der *alpA* Deletionsmutante ist die Anzahl der Mikrotubuli-Bündel stark reduziert, so konnten nur ein oder zwei dicke Bündel pro Kompartiment beobachtet werden (Enke *et al.*, 2007). Ebenso ist die Dynamik der Mikrotubuli stark eingeschränkt (Takeshita *et al.*, 2013).

Zusätzlich zu den +TIPs und den MAPs assoziieren spezifische molekulare Motoren mit Mikrotubuli. Es sind drei Typen von molekularen Motoren bekannt. Myosine, die Actinfilamente binden, Dynein und Kinesin, welche sich entlang von Mikrotubuli bewegen. Diese Motoren transportieren eine Vielzahl an Molekülen wie membranöse Organellen, Proteinkomplexe und mRNA. Zusätzlich haben sie Aufgaben in der Zelllokomotion und -division. In filamentösen Pilzen sind Motorproteine für das polare Wachstum, die Organisation und die Dynamik der Cytoskelette (Schliwa, 2006) essentiell. Um ihre Aufgaben in der Zelle auszuführen, besitzen Motorproteine spezialisierte Strukturen. Eine Region des Proteins bindet an Filamente (Actin oder Mikrotubuli), hydrolysiert ATP und übt Kraft auf das Filament aus. Andere Regionen außerhalb der Motordomäne sind für die Ausübung der verschiedenen zellulären Aufgaben, wie die Bindung an Moleküle für den Transport oder das Verankern für die Kraftausübung, zuständig. Molekulare Motoren koordinieren die ATP-Hydrolyse mit der Bindung an sowie der Bewegung entlang eines Filaments und konvertieren dadurch chemische Energie direkt in mechanische Arbeit. Der Mikrotubuli assoziierte Motor Dynein besteht aus einem großen Proteinkomplex. Cytoplasmatisches Dynein hat vielfältige Aufgaben in der Wanderung von Nuclei und dem Organellentransport in Pilzen (Xiang & Fischer, 2004, Yamamoto & Hiraoka, 2003). Pilze haben ein einziges cytoplasmatisches Dynein (Yamamoto & Hiraoka, 2003). In filamentösen Pilzen vermittelt Dynein den Organellen- und Vesikeltransport (Xiang & Plamann, 2003). Kinesine sind Mikrotubuli stimulierte ATPasen, welche sich meist in Richtung der Mikrotubuli Plusenden bewegen (Hirokawa, 1998). Die Anzahl von Kinesinen in Pilzen reicht von sechs in *S. cerevisiae*, über neun in *S. pombe*, zehn in *N. crassa* bis hin zu elf in *A. nidulans* (Rischitor *et al.*, 2004, Schoch *et al.*, 2003). Das Kinesin-1 oder konventionelle Kinesin, KinA, aus *A. nidulans* spielt eine wichtige Rolle im filamentösen Wachstum, sowie dem Transport von Vesikeln und der Positionierung von Nuclei (Requena *et al.*, 2001). Die Aktivität dieser Kinesine ist für die Exocytose notwendig und somit auch für das schnelle Hyphenwachstum (Seiler *et al.*, 1997, Requena *et al.*, 2001). KipA, das Kinesin-7 aus *A. nidulans*, transportiert Proteine zum Mikrotubuli Plusende (Konzack *et al.*, 2005, Takeshita *et al.*, 2008). Mitglieder der Kinesin-8 Familie spielen verschiedene Rollen. Das *A. nidulans* Kinesin-8 KipB bekleidet Aufgaben in der Mikrotubuli Depolymerisierung und Spindelpositionierung während der synchronisierten Mitose (Rischitor *et al.*, 2004). Die meisten Kinesine der Kinesin-3 Familie sind im Gegensatz zu den übrigen Kinesinen monomere Motoren (Okada & Hirokawa, 1999, Okada & Hirokawa, 2000). In *A. nidulans* wurden zwei Vertreter der Kinesin-3 Familie identifiziert, UncA und UncB. UncA lokalisiert

entlang von einem spezifischen Mikrotubuli-Bündel in der Hyphenseite und ist in den Transport von Endosomen und anderen Vesikeln involviert (Zekert & Fischer, 2009).

## 1.5 Zellendmarker

Ein allgemeingültiges Modell für das polare Wachstum in filamentösen Pilzen basiert auf der Idee, dass positionelle Marker, die sogenannten Zellendmarker, die intrinsische Asymmetrie beeinflussen, welche eine Polaritätsachse generiert (Pruyne & Bretscher, 2000, Chang & Peter, 2003). Die Zellendmarker fungieren als Initiationspunkt für die lokalisierte Assemblierung weiterer Proteine und somit als eine Schlüsselkomponente in der Reorganisation des Cytoskeletts. In *S. pombe* wird der Komplex aus den Polaritätsfaktoren Tea1 und Tea4 mit den Mikrotubuli Plusenden mit Hilfe eines +TIPs Komplexes, der das Kinesin Tea2 beinhaltet, zur Zellspitze transportiert. Nachdem der Tea1-Tea4-Komplex durch Mod5 in der Membran verankert wird, rekrutiert er den Polarisomkomplex. Dieser beinhaltet das Formin For3 und seine Aktivatoren (Martin *et al.*, 2005, Martin *et al.*, 2007, Rincón *et al.*, 2009). Sobald For3 aktiviert ist, beginnt es die schnelle und prozessive Assemblierung von Actinfilamenten. *A. nidulans* besitzt Homologe zu den Zellendmarkerproteinen Tea1, Tea2 und Mod5 aus *S. pombe*, diese wurden TeaA, KipA und TeaR genannt (Konzack *et al.*, 2005, Takeshita *et al.*, 2008). Deletionsmutanten der jeweiligen Gene zeigen Defekte in der Aufrechterhaltung der Polarität. Diese führen zu einem kurvigen (im Falle von  $\Delta kipA$  oder  $\Delta teaR$ ) oder zickzack (im Falle von  $\Delta teaA$ ) Phänotyp. Die Lokalisierung von TeaA und TeaR an der Hyphenseite ist voneinander abhängig. Der Transport von TeaA an den Kortex der Hyphenseite wird von wachsenden Mikrotubuli bewerkstelligt (Takeshita & Fischer, 2011). Durch die Interaktion mit dem prenylierten TeaR wird es dann in der Plasmamembran verankert (Takeshita *et al.*, 2008). Zusammen mit TeaC mobilisiert TeaA das Formin SepA zur Wachstumszone (Martin *et al.*, 2005). Dieser Mechanismus der Übergabe von Positionsinformationen von den Mikrotubuli an das Actin-Cytoskelett ist konserviert. Er wird für die Aufrechterhaltung der Polarität und den Erhalt der Wachstumsrichtung benötigt (Higashitsuji *et al.*, 2009).



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung einer *A. nidulans* Hyphenspitze mit der Lokalisierung der Zellendmarker und des Cytoskeletts.** Für Details siehe Text. (Zur Verfügung gestellt von Raphael Manck).

Zellendmarker sind schon sehr früh in der Entwicklung in die Etablierung der Polarität involviert. So ist TeaA wichtig für die Selektion der Stelle, an welcher eine Spore auskeimt (Takeshita & Fischer, 2011). Zusätzlich hat der Zellendmarker TeaA eine Rolle in der Konvergenz der Mikrotubuli. Mikrotubuli elongieren in *A. nidulans* in Richtung der Hyphenspitze und konvergieren in der apikalen Region. Die zentrale Position von TeaA an der Spitze co-lokalisiert mit dem Punkt, in dem die Mikrotubuli Plusenden konvergieren. In Abwesenheit von TeaA berühren Mikrotubuli die Membran oft außerhalb des Zentrums des Apex (Takeshita *et al.*, 2013). Eine funktionale Verbindung zwischen TeaA und der Mikrotubuli Polymerase AlpA ist für die Regulation des Mikrotubuli Wachstums an der Spitze von Nöten (Takeshita *et al.*, 2013). *A. nidulans* TeaA ist in die Konvergenz der Mikrotubuli an der Spitze involviert, was spezifische Interaktionen der Mikrotubuli mit dem Kortex vermuten lässt. Eine mögliche Interaktion wäre die zwischen TeaA und AlpA (Takeshita *et al.*, 2013). AlpA fördert das Mikrotubuli Wachstum an den Plusenden, bis diese die Hyphenspitze erreichen. Dort blockiert TeaA die AlpA Aktivität und induziert die Mikrotubuli Katastrophe. Die Wechselbeziehung von TeaA und Mikrotubuli könnte als positiver *feedback loop* agieren und TeaA am Apex konzentrieren. Diese Konzentration könnte dann wiederum eine fokussierte Vesikelsekretion zur Folge haben, was schlussendlich die Organisation des Spitzenkörpers begünstigen würde (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995, Riquelme *et al.*, 2014). Eine schematische Darstellung der Lokalisierung der Zellendmarker und der Elemente des Cytoskeletts kann der Abbildung 1.6 entnommen werden.

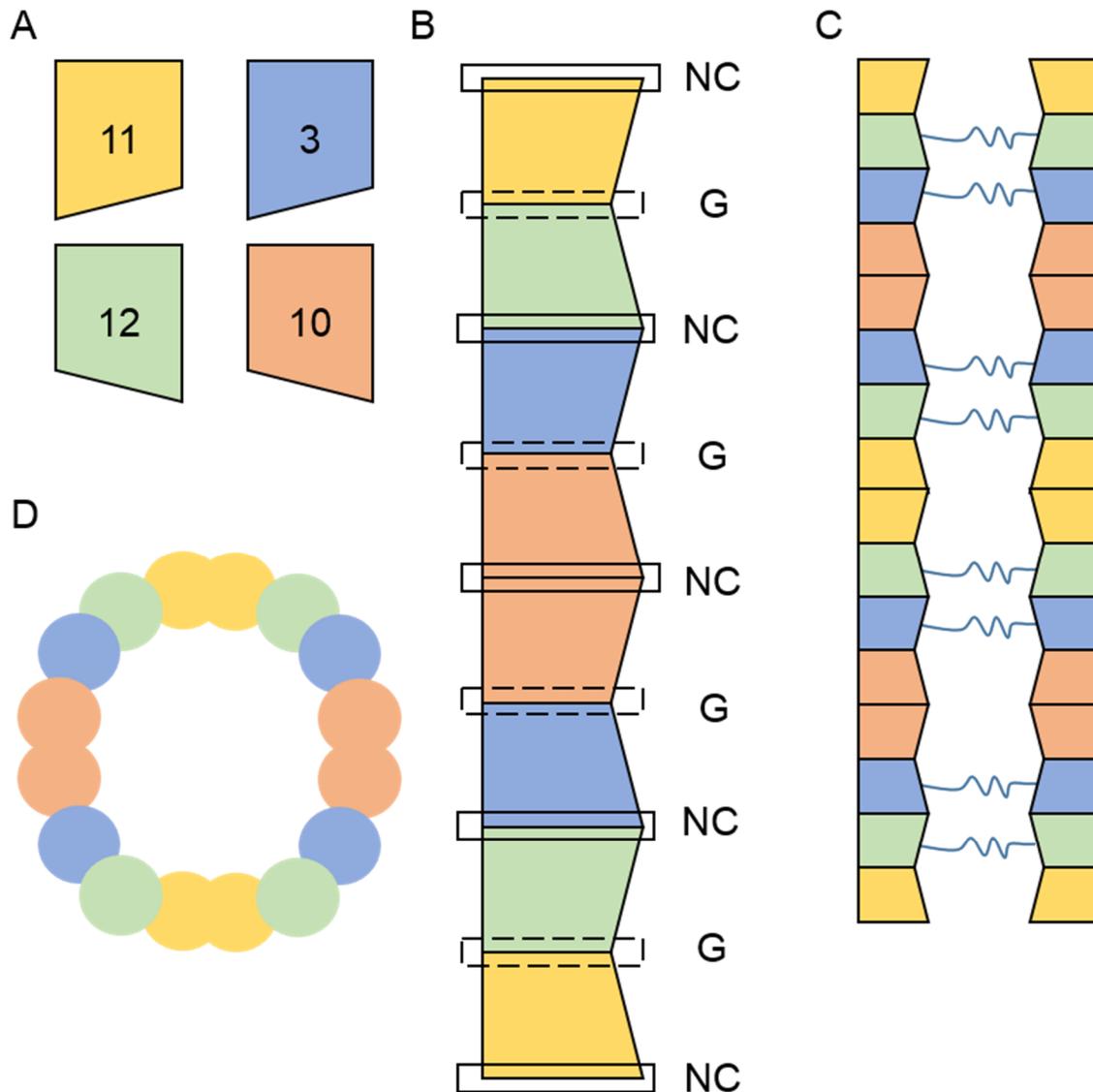
## 1.6 Septine

Septine sind Schlüsselkomponenten des Cytoskeletts und übernehmen ebenso wichtige Rollen, wie Actin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Mostowy & Cossart, 2012, Spiliotis & Gladfelter, 2012, Weirich *et al.*, 2008). Sie können aus folgenden Gründen als Komponente des Cytoskeletts angesehen werden: 1. Sie bilden nicht polare, heteropolymere Strukturen höherer Ordnung innerhalb der Zelle aus. Die Formation solcher Strukturen ist entscheidend für ihre Funktionen als Barriere und Gerüst. 2. Septinstrukturen haben keine katalytische Funktion, sie unterteilen die Zelle und unterstützen deren Architektur. 3. Die Deletion von einem oder mehreren Septinen ist häufig letal, was ihre Funktion in der Aufrechterhaltung normaler Zellfunktionen unterstreicht (Barral *et al.*, 2000, Gladfelter *et al.*, 2001, Momany *et al.*, 2001, Hartwell, 1971). Septinproteine sind sehr homolog und besitzen alle ein *P-Loop* Nucleotid-Bindemotiv (Longtine *et al.*, 1996).

Septine bilden Heteropolymere, welche sich dann in Strukturen höherer Ordnung zusammenfügen. Diese lokalisieren meist am Kortex, wo sie als Diffusionsbarrieren und als Gerüst zur Reorientierung des Actin-Cytoskeletts fungieren, sowie Proteine in bestimmten subzellulären Domänen zurückhalten. Sie gelten außerdem als die biologisch aktive Form der Septinproteine (Bertin *et al.*, 2008, McMurray *et al.*, 2011, Sirajuddin *et al.*, 2007). Septine spielen eine wesentliche Rolle in Entwicklungsprozessen unter anderem auch in der Etablierung der Zellpolarität, der Cytokinese, dem Vesikeltransport und der Zellarchitektur (Weirich *et al.*, 2008, Spiliotis & Gladfelter, 2012, Mostowy & Cossart, 2012). Störungen der Septine sind mit der Pathogenität von Pilzen und einer Vielzahl von Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs und Alzheimer, verbunden (Mostowy & Cossart, 2012). Auch in Säugern gewährleisten Septine das korrekte Wachstum, Zellmigration, Vesikel Transport und Zellteilung (Kinoshita *et al.*, 2002, Spiliotis *et al.*, 2005, Surka *et al.*, 2002, Xie *et al.*, 1999). Septine werden in fünf phylogenetische Gruppen eingeteilt. Dabei enthält Gruppe fünf nur Orthologe aus filamentösen Pilzen (Pan *et al.*, 2007).

In *S. cerevisiae* existieren sieben Septinproteine. Fünf der sieben *S. cerevisiae* Septine gehören zum Kernkomplex, die anderen beiden, SPR3 und SPR28, werden nur während der Sporulation exprimiert (De Virgilio *et al.*, 1996, Fares *et al.*, 1996). Die Septinproteine Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12, lokalisieren in Hefe an der Knospungszone. Dort bilden sie 10 nm dicke Filamente zwischen der Mutter und der Knospe und beschränken sowie organisieren Zelldivisionsproteine in der Knospungszone (Longtine *et al.*, 1996, Oh & Bi, 2011, Gladfelter *et al.*, 2001). Studien über die Septine des Kernkomplexes (Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 oder deren Orthologe) in Pilzen und Tieren zeigten, dass Septinmonomere über zwei verschiedene Verbindungen, die G- und NC-Verbindungen, verfügen, um Heteropolymere zu bilden (Bertin *et al.*, 2008, McMurray *et al.*, 2011, Sirajuddin *et al.*, 2007). Nur bestimmte

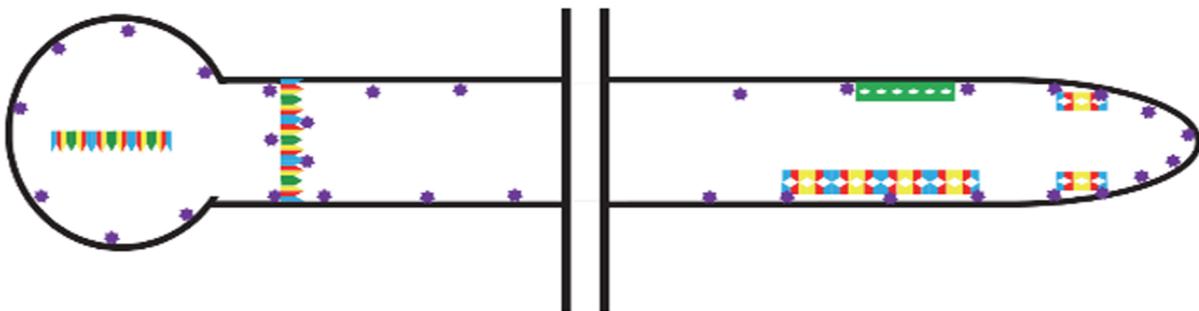
Septine können miteinander interagieren. Innerhalb eines Heteropolymers interagieren Septine entweder mit sich selbst oder einem Septin aus einer anderen Gruppe (Sellin *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2012b). In *S. cerevisiae* wird die vorherrschende Heterooctamerketten von den Kernkomplex-Septinen in der Anordnung Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 gebildet (Bertin *et al.*, 2008). Die zentralen Cdc10 Monomere dimerisieren über ihre NC-Schnittstellen und interagieren mit den benachbarten Cdc3-Monomeren über ihre G-Schnittstelle. Das terminale Cdc11 interagiert mit sich selbst mit Hilfe der NC-Schnittstelle und verknüpft so die Septinketten zu Filamenten. Wenn das Cdc11-Septin von Shs1, einem Septin das nicht zum Kernkomplex gehört, substituiert wird, assoziieren die Heterooctamere lateral miteinander und dadurch entsteht ein Ring anstatt linearen Filamenten (Garcia *et al.*, 2011). Wenn bestimmte Septinuntereinheiten deletiert werden, können neue Kombinationen entstehen, welche die Bildung von Heteropolymeren und Strukturen höherer Ordnung aufrecht erhalten (McMurray *et al.*, 2011). Septine sind in Hefe an der Lokalisierung des Formins Bnr1, dem Formin, welches Actinkabel am cytokinetischen Ring bildet, beteiligt (Pruyne *et al.*, 2004). Das Septin-Bindeprotein Bni5 ist für die Rekrutierung von Myo1 zur Knospungseinschnürung in der Bäckerhefe verantwortlich (Fang *et al.*, 2010). Myo1, welches für die Actinring Kontraktion während der Cytokinese verantwortlich ist, lokalisiert dabei in der Mitte des Septin Rings in der Knospungseinschnürung (Bi *et al.*, 1998, Lippincott & Li, 1998). Auch in Säugern bilden Septine Filamente aus, welche mit den Actin und Mikrotubuli Cytoskeletonen colokalisieren und diese zu organisieren scheinen (Kinoshita *et al.*, 2002, Surka *et al.*, 2002, Spiliotis & Nelson, 2006). Die Interaktion der Septine mit der Plasmamembran bestimmt viele ihrer Funktionen. Septine grenzen Bereiche der PM ab und sind Gerüstproteine für die Assemblierung von Proteinkomplexen, wie dem Polarisom oder dem cytokinetischen Actinring (Barral *et al.*, 2000, Dobbelaere & Barral, 2004, Orlando *et al.*, 2011). Der Ring an der Knospungseinschnürung fungiert als Diffusionsbarriere für Proteine des Polarisoms in der Knospe. Während der Cytokinese bildet der Septinring das Gerüst für den Aufbau des cytokinetischen Actinrings und agiert als Diffusionsbarriere, um diffusionsfähige Exocyst- und Polarisomproteine an der Teilungs Stelle zu halten (Orlando *et al.*, 2011, Barral *et al.*, 2000, Dobbelaere & Barral, 2004). Abbildung 1.7 zeigt eine schematische Darstellung der Septin Monomere, Heteropolymere und Strukturen höherer Ordnung in Hefe.



**Abbildung 1.7 Schematische Abbildung der Septinuntereinheiten, -ketten, -filamente und -strukturen höherer Ordnung.** **A:** Septin Gruppen in *S. cerevisiae* 1 (orange, Cdc10), 2 (blau, Cdc3), 3 (gelb, Cdc11) und 4 (grün, Cdc12). Die individuellen Untereinheiten sind mit den korrespondierenden Nummern der *S. cerevisiae* Proteine markiert. **B:** Heterooctamer aus den Septinuntereinheiten. Die unterschiedlichen Septine interagieren entweder über die G- (gestrichelter Kasten) oder NC- (durchgezogener Kasten) Schnittstelle mit benachbarten Monomeren. **C:** Heterooctamere bilden durch *coiled coil* Anhänge der Cdc3 und Cdc12 Monomere Filamente aus. **D:** Heterooctamere assemblieren in Strukturen höherer Ordnung, welche als Barrieren und Gerüste fungieren. Modifiziert nach (Bertin et al., 2008, Berepiki, 2013).

*A. nidulans* besitzt vier Septinproteine, welche homolog zu Kernkomplex-Septinen Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 aus *S. cerevisiae* sind, namentlich AspA, AspB, AspC und AspD und ein weiteres Septin, welches kein Homolog in *S. cerevisiae* besitzt, welches AspE heißt (Momany *et al.*, 2001). AspA, AspB, AspC und AspD lokalisieren als Septinringe, an Septen, als dicke Stäbe und dünnere Filamente in anderen Bereichen der Zelle (Lindsey *et al.*, 2010, Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2012). AspE lokalisiert in kortikalen Punkten und an Septen durch die Entwicklung von *A. nidulans* hinweg und kann im Unterschied zu den anderen Septinen nicht in Konidiophoren beobachtet werden (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014). Alle fünf *A.*

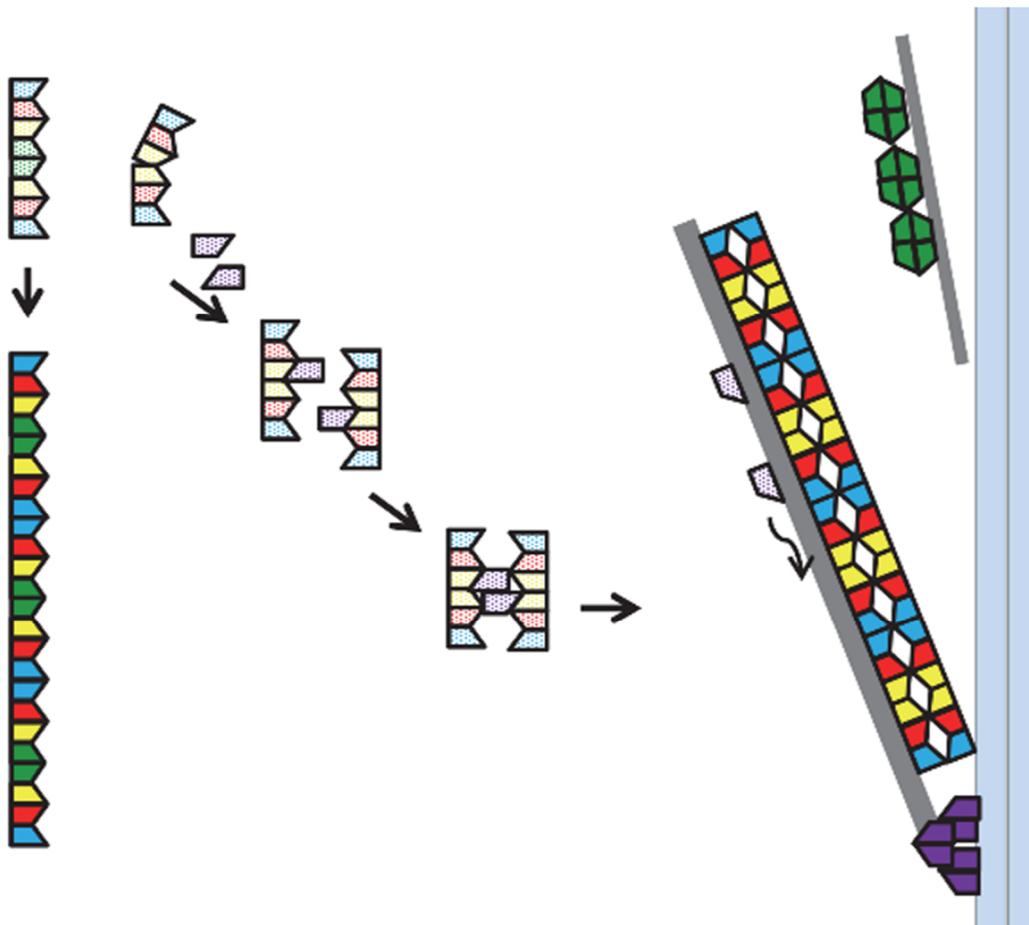
*nidulans* Septine, werden während der vegetativen und asexuellen Entwicklung exprimiert, wobei AspB die höchste Expression aufweist (Momany *et al.*, 2001). In Deletionsmutanten der Septine *aspA* und *aspC*, sowie in Doppeldeletionen dieser Gene, entwickeln sich die Keimschläuche verfrüht. Ebenso werden mehr Keimschläuche und Verzweigungen gebildet. Zusätzlich ist die Konidiosporen Bildung und die Septierung reduziert (Lindsey *et al.*, 2010). AspA und AspC lokalisieren in dormanten Sporen, sich entwickelnden Keimschläuchen sowie Verzweigungen, Septen und in den Konidiosporenschichten. Dabei lokalisieren sie als Punkte, Ringe, Kränze und Filamente. AspA lokalisiert in  $\Delta aspC$  Zellen abnormal und AspC misslokalisiert in  $\Delta aspA$  Zellen. AspA und AspC interagieren auf Genebene und haben ähnliche Funktionen in der Bildung von Keimschläuchen sowie Verzweigungen, in der Septierung und der Konidiosporenbildung. AspA und AspC beeinflussen die Anzahl der Auskeimungen und Verzweigungen, sowie deren Muster (Lindsey *et al.*, 2010). AspE benötigt die Kernkomplex-Septine, außer AspD, für seine normale Lokalisation und die Lokalisation dieser Septine benötigt AspE (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014). AspE ist kein Bestandteil der Septin Heteropolymere und substituiert keines der Kernkomplex-Septine in einem alternativen Heteropolymer (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014). Abbildung 1.8 zeigt die schematische Lokalisation von Septinstrukturen innerhalb einer *A. nidulans* Hyphe.



**Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Lokalisation von Septinstrukturen in einer *A. nidulans* Hyphe.** Lokalisierung von Septinstrukturen in basalen (links) und apikalen (rechts) Regionen der Hyphe. Heterooctamere bilden AspE-unabhängige Strukturen höherer Ordnung. Diese beinhalten Stäbe in einzelligen und isotropen Stadien, sowie Septenringe in multizellulären Stadien. Heterohexamere bilden AspE-abhängige Strukturen höherer Ordnung. Diese schließen kortikale Stäbe, kortikale Kränze und Kappen an sich bildenden Verzweigungen und Hyphenspitzen in multizellulären Stadien ein. Blau: AspA, Rot: AspC, Gelb: AspB, Grün: AspD und Lila: AspE. Modifiziert nach (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014).

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich eine Hypothese für die Bildung von Heteropolymeren, welche besagt, dass mindestens zwei Klassen von Septin Heteropolymeren während der vegetativen Entwicklung von *A. nidulans* co-existieren, wobei die eine alle vier Kernkomplex-Septine beinhaltet und die andere ohne AspD gebildet wird (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014). Es wird postuliert, dass die erste Klasse Heterooctamere bildet, wohingegen die zweite Klasse Heterohexamere formt. Das putative Heterooctamer assembliert Strukturen höherer Ordnung unabhängig von AspE, diese werden als Punkte und Stäbe in isotropen und

einzelligen Stadien und als Septenringe in multizellulären Stadien beobachtet. Das putative Hexamer scheint AspE zur Assemblierung von Strukturen höherer Ordnung zu benötigen. Diese können als kortikale Stäbe, Kragen und Kappen in sich entwickelnden Verzweigungen und an Hyphenspitzen in multizellulären Stadien gesehen werden. Ein denkbarer Mechanismus zur Ermöglichung der Bildung Strukturen höherer Ordnung der Hexamere durch AspE könnte durch eine transiente Assoziation von AspE- mit AspB-Monomeren innerhalb des Hexamers bestehen. Diese kurzzeitige Interaktion würde zu einer Änderung oder Stabilisierung der Konformation führen, die dann wiederum den Aufbau von Strukturen höherer Ordnung erleichtern würde (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014). Dieses Modell wird dadurch gestützt, dass in  $\Delta aspA$ ,  $\Delta aspB$  und  $\Delta aspC$  Mutanten starke Störungen in der frühen Entwicklung mit dem Auftreten von zusätzlichen Keimschläuchen und Verzweigungen beobachtet werden (Lindsey *et al.*, 2010, Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2012), jedoch in der  $\Delta aspD$  Mutante dieser Phänotyp nicht auftritt (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014). Die postulierten Strukturen höherer Ordnung, welche AspE zur Assemblierung benötigen, scheinen für die eigene Lokalisation von AspE benötigt zu werden. Dies kann mit zwei Szenarien erklärt werden. Entweder diese Strukturen fungieren als Plattformen für die Assemblierung von AspE-abhängig gebildeten Strukturen höherer Ordnung, oder sie stabilisieren Mikrotubuli oder Mikrofilamente, auf welchen AspE sich assemblieren oder zu seinem kortikalen Bestimmungsort transportiert werden muss (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014). Interaktionen von Mikrotubuli und Mikrofilamenten mit Septinen sind in vielen Organismen bekannt (Spiliotis & Gladfelter, 2012). Möglicherweise kann AspD Mikrotubuli und Mikrofilamente, unabhängig von diesem Komplex, stabilisieren oder ist Teil eines anderen Komplexes (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014). Abbildung 1.9 zeigt die schematische Assemblierung der Septin Monomere in Polymere und Strukturen höherer Ordnung.



**Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Assemblierung von Septinmonomeren in Heteropolymere und Strukturen höherer Ordnung.** Septinmonomere formen spontan zwei Arten von Heteropolymeren (in hellen Farben). Die postulierten Heterooctamere beinhalten alle vier Kernkomplex Septine (AspA, AspB, AspC und AspD). In den postulierten Heterohexameren fehlt AspD. Heterooctamere assemblieren unabhängig von AspE in Strukturen höherer Ordnung, wohingegen Heterohexamere auf AspE angewiesen sind, um Strukturen höherer Ordnung auszubilden. AspE interagiert kurzzeitig mit den Heterohexameren via AspB und ermöglicht somit die Assemblierung in Strukturen höherer Ordnung. Diese stabilisieren die Elemente des Cytoskeletts, welche für den Transport von AspE zur Plasmamembran notwendig sind. Dort assembliert AspE in kortikalen Strukturen höherer Ordnung. AspD bildet ebenfalls kortikale Strukturen höherer Ordnung aus. Wobei es möglicherweise Teil eines Komplexes mit nicht-Septinen ist. Helle Farben zeigen Septine innerhalb der individuellen Heteropolymere. Dunkle Farben zeigen Septine innerhalb Strukturen höherer Ordnung. Der Hellblaue Doppelstrich zeigt die Plasmamembran an. Graue Striche zeigen Elemente des Cytoskeletts. Blau: AspA, Rot: AspC, Gelb: AspB, Grün: AspD und Lila: AspE. Modifiziert nach (Hernandez-Rodriguez et al., 2014).

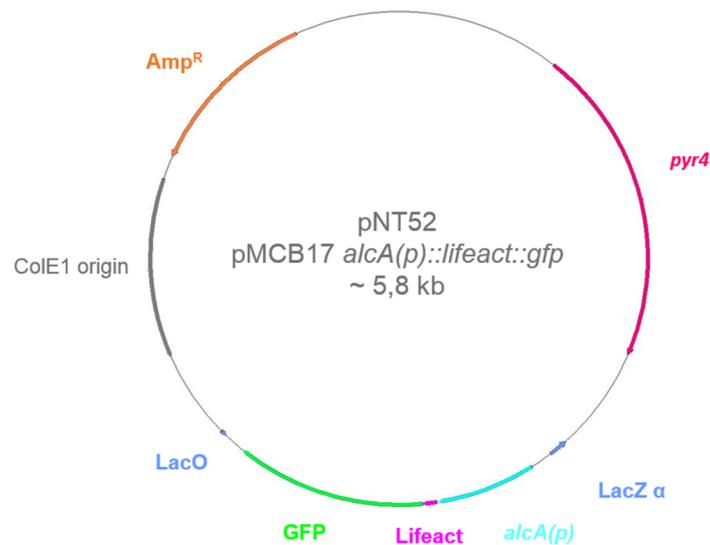
## 1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Actindynamik in *Aspergillus nidulans* zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten geeignete Actin Marker getestet, beziehungsweise etabliert werden. Zusätzlich sollte der Zusammenhang zwischen dem Actin-Cytoskelett und anderen Komponenten des polaren Wachstums, wie Zellendmarkern, Mikrotubuli, Calciumkonzentration und Septinen untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es Mikrotubuli mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopie Methoden zu visualisieren.

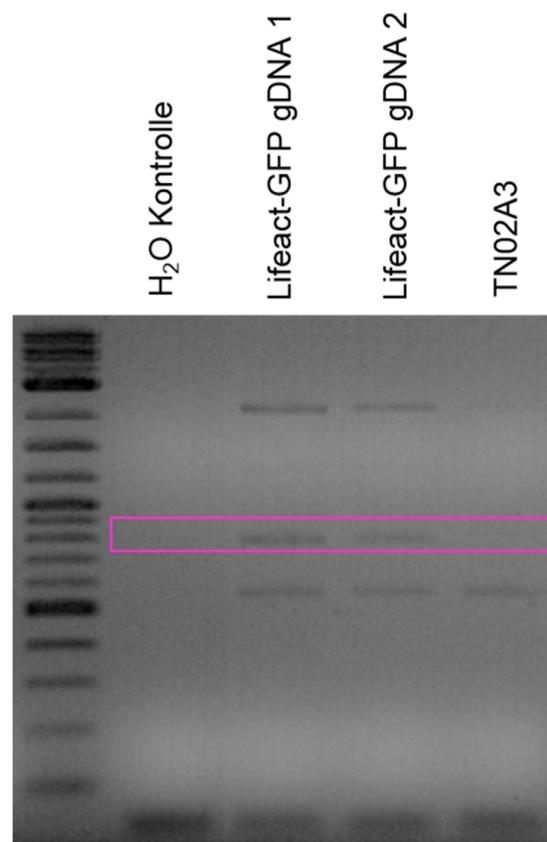
## 2. Ergebnisse

### 2.1 Lifeact stabilisiert Actinkabel

In vielen Organismen wird Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes (Wieland, 1979), welches an Actinfilamente bindet, gekoppelt an Fluorophore zur Anfärbung des Actincytoskeletts verwendet (Cooper, 1987). In den meisten filamentösen Pilzen, sowie auch in *A. nidulans*, kann Phalloidin jedoch nicht zur Anfärbung des Actincytoskeletts genutzt werden (Brent Heath *et al.*, 2003). Deshalb wurde zu diesem Zweck Lifeact als spezifischer Marker für F-Actin entwickelt (Riedl *et al.*, 2008). Lifeact ist ein 17 Aminosäuren langes Peptid, welches vom N-Terminus des Actin Bindeproteins 140 (Abp140) aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt (Asakura & Tanaka, 1998). Zur Analyse der Actindynamik mit Hilfe des Peptids Lifeact, wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, welches C-terminal mit GFP fusioniertes Lifeact unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA* Promoters enthielt (Abb. 2.1). Hierzu wurde Lifeact-GFP aus dem Plasmid pEGFP-N1-Lifeact (Riedl *et al.*, 2008) mit Hilfe der Primer lifeact-f-kpn und GFP\_sto\_Pacl\_rev amplifiziert. Hierdurch wurde am 5' Ende eine *KpnI* Schnittstelle und am 3' Ende eine *PacI* Schnittstelle angefügt. Das PCR Fragment wurde, ebenso wie der pCMB17 Vektor, mit *KpnI* und *PacI* verdaut. Der Vektor und das Fragment wurden ligiert, wodurch das Plasmid pNT52 entstand. Dieses wurde dann in *A. nidulans* TN02A3 Protoplasten transformiert. Der resultierende Stamm wurde SNT95 genannt. Da kein Homolog zu Lifeact im *A. nidulans* Genom existiert wurde durch eine Analytische PCR die Integration in das *A. nidulans* Genom nachgewiesen (Abb. 2.2). Für diese PCR wurde genomische DNA des SNT95 Stammes präpariert und die Primer Lifeact\_fw und GFP\_rev zur Amplifikation eines ca. 760 bp großen Fragments benutzt. Wie in Abbildung 2.2 zu sehen ist, konnte für beide verwendeten genomischen DNAs eine ca. 760 bp große Bande amplifiziert werden, welche weder in der Wasserkontrolle, noch im Wildtyp (TN02A3) amplifiziert wurde. Die darüber und darunter laufenden Amplifikate können als unspezifisch eingestuft werden, da sie auch mit Wildtyp DNA als Template amplifiziert wurden.



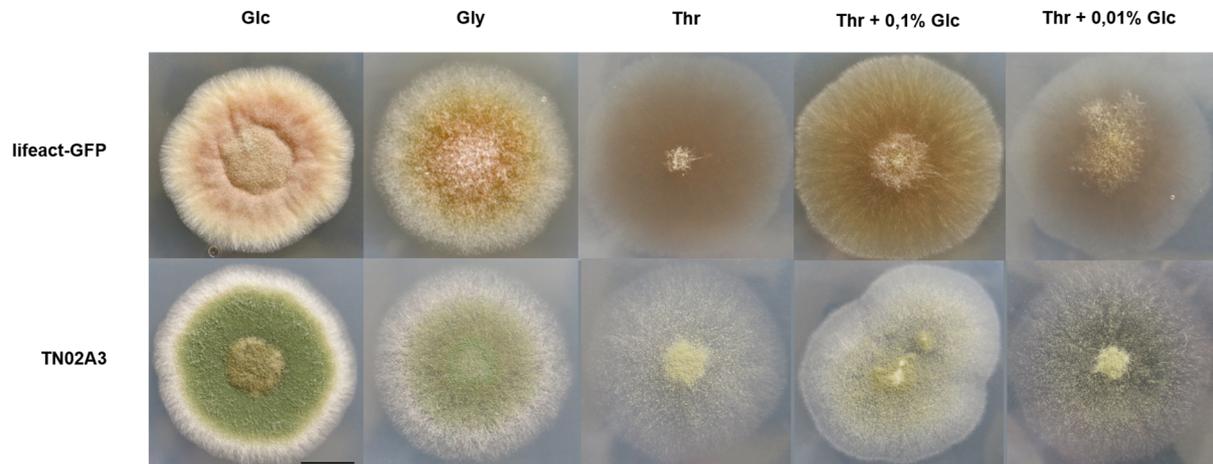
**Abbildung 2.1: Vektorkarte des *alcA(p)::Lifeact::gfp* Expressionsvektors pNT52.** Der Vektor enthält eine Ampicillin Resistenz (Orange), zur Selektion in *Escherichia coli*, den Auxotrophiemarker *pyr4* (Magenta), und Lifeact (Pink) fusioniert mit GFP (Grün) unter der Kontrolle des regulierbaren *alcA* Promotors (Cyan). Der Vektor hat eine Gesamtgröße von circa 5,8 kb.



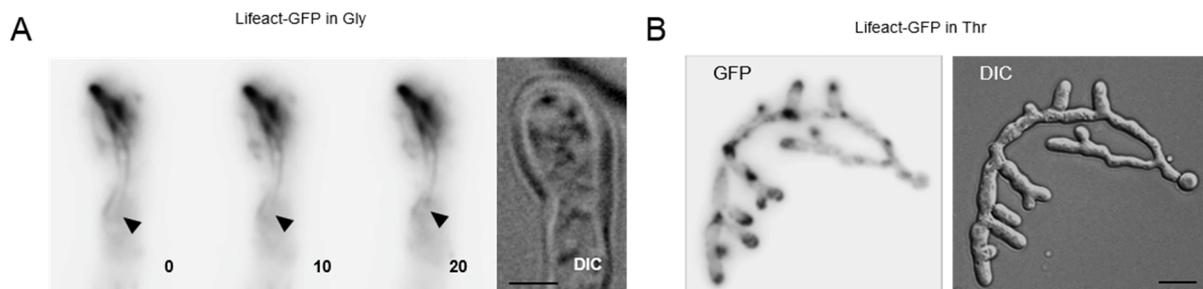
**Abbildung 2.2: Analytische PCR zur Überprüfung der Integration des pNT52 Vektors in das Genom von *A. nidulans*.** Genomische DNA wurde von SNT95 (Lifeact-GFP) und dem Wildtyp TN02A3 präpariert. Auf diese wurde eine PCR mit den Primern Lifeact\_fw und GFP\_rev durchgeführt. Die beiden genomischen DNAs des SNT95 Stammes weisen hierbei die erwartete Bande bei einer Höhe von ca. 760 bp auf. Diese ist im Wildtyp und der Wasserkontrolle nicht detektierbar. Alle anderen Banden scheinen unspezifische Produkte darzustellen, da sie auch in der Wildtyp Probe amplifiziert wurden.

Unter de-reprimierenden Bedingungen, mit 2% Glycerin als Kohlenstoffquelle, war die Größe der Kolonien vergleichbar mit der des Wildtyps (Abb. 2.3), jedoch wiesen die Hyphen oft eine

abnormale Morphologie mit geschwollenen Spitzen auf (Abb. 2.4). Lifeact-GFP visualisierte netzartige Actinstrukturen mit Kabeln an der Hyphenspitze.



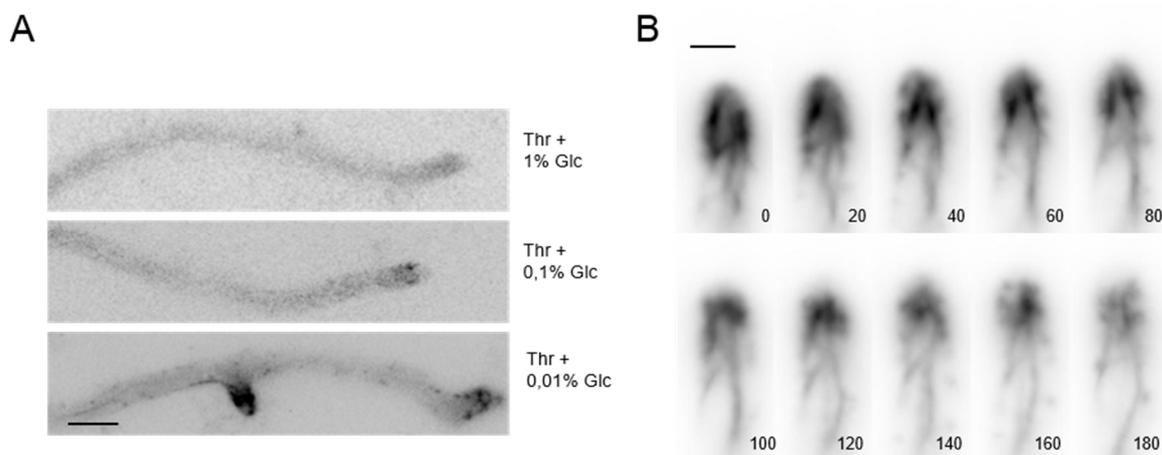
**Abbildung 2.3: Vergleich des Wachstums eines *A. nidulans* Stammes, der Lifeact-GFP unterschiedlich stark exprimiert mit dem Wachstum eines Wildtyp Stammes.** Sporensuspensionen mit einer Konzentration von  $10^5$  Sporen/ml wurden auf Agarplatten mit der angegebenen Kohlenstoffquelle aufgetropft und zwei Tage bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Im Vergleich untereinander sehen die Kolonien auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen ähnlich aus, dies lässt auf eine biologische Funktionalität der Stämme rückschließen. Jedoch ist festzustellen, dass der Lifeact-GFP Stamm einen Defekt in der Sporulation hat. Maßstabsbalken 1 cm.



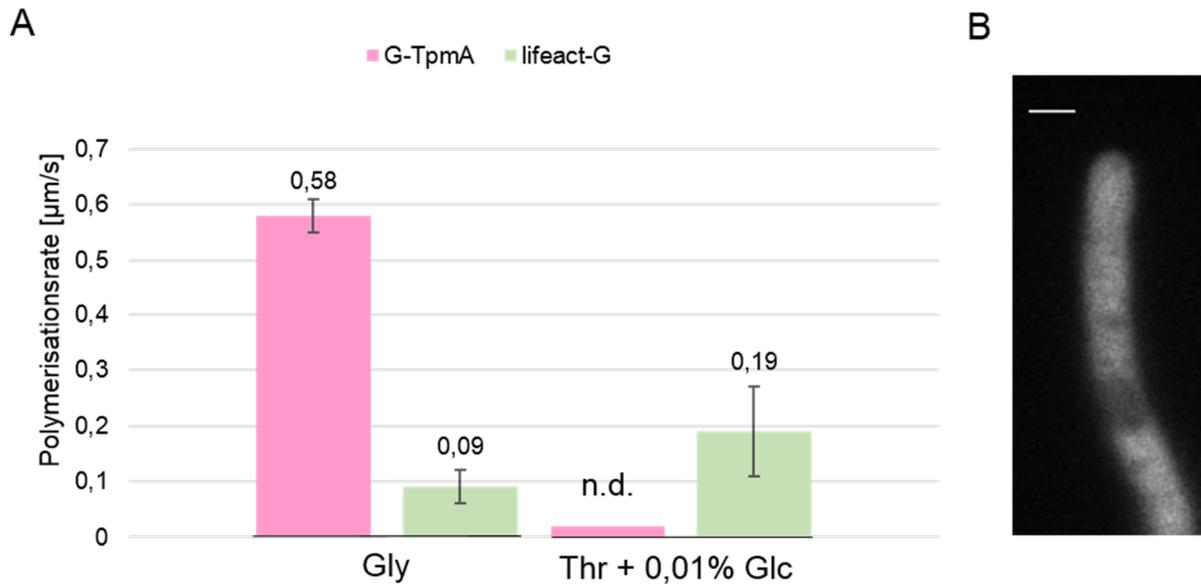
**Abbildung 2.4: Visualisierung von Lifeact-GFP. A: Lifeact-GFP exprimierender Stamm unter deprimierenden Bedingungen (Minimalmedium mit 2% Glycerin als Kohlenstoffquelle).** Das DIC Bild zeigt eine leicht geschwollene Hyphenspitze. Im Fluoreszenzkanal sind ein Netzwerk aus Actinkabeln und Patches an der Hyphenspitze zu erkennen. Das Actincytoskelett ist statisch. Maßstabsbalken 1  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden. B: Lifeact-GFP unter Überexpressions-Bedingungen (Minimalmedium mit 2% Threonin als Kohlenstoffquelle). Die Hyphen sind unter diesen Bedingungen stark geschwollen und weisen mehr Verzweigungen als der Wildtyp auf. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ .

Die Überexpression von Lifeact-GFP durch Zugabe von 2% Threonin als Kohlenstoffquelle löste schwerwiegende Hyphenabnormalien mit geschwollenen Spitzen und verstärkten Verzweigungen aus (Abb. 2.4). Unter diesen Bedingungen wurden adynamische Netzstrukturen an den Hyphenspitzen beobachtet (Abb. 2.4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Expressionslevel von Lifeact-GFP einen Einfluss auf die Dynamik von Actinkabeln haben könnte. Aufgrund dessen wurde Lifeact-GFP in verschiedenen Kohlenstoffquellen exprimiert. Diese waren 2% Threonin mit 1%, 0,1% oder 0,01% Glucose. Hierbei wurde eine Reduktion der Expression in Abhängigkeit der zugegebenen Menge an

Glucose erwartet. Unter Zugabe von 1% oder 0,1% Glucose zum Anzuchtmedium wuchsen die Hyphen ähnlich derer des Wildtyps, doch das Fluoreszenzsignal konnte nur schwerlich detektiert werden (Abb. 2.5). Wurde der Lifeact-GFP exprimierende Stamm in Minimalmedium mit 2% Threonin und 0,01% Glucose inkubiert, so hatten die Hyphen eine normale, gesunde Morphologie und zeigten Actinkabel sowie Patches (Abb. 2.5). Zur Verifikation eines möglichen positiven Effekts der Regulation der Expression von Lifeact-GFP wurden die Polymerisationsraten der Actinkabel in den GFP-TpmA und Lifeact-GFP exprimierenden Stämmen entweder in Glycerin haltigem oder Threonin haltigem Medium mit Zugabe von Glucose ermittelt (Abb. 2.6). Die Elongationsrate für GFP-TpmA markierte Actinkabel in Minimalmedium mit 2% Glycerin lag hierbei bei  $0,58 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 76). Für Lifeact-GFP dekorierte Kabel unter denselben Bedingungen konnte lediglich ein Wert von  $0,09 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 37) ermittelt werden. Dies bedeutet eine Reduktion der Dynamik um 85%. In Threonin haltigem Medium mit 0,01% Glucose konnte der Wert für die Polymerisationsrate bis zu  $0,19 \pm 0,04 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 13) wiederhergestellt werden (Abb. 2.6 und Tabelle 2.1). Unter denselben Konditionen konnten im GFP-TpmA exprimierenden Stamm unter der Kontrolle des *alcA* Promotors keine spezifischen Actinkabel beobachtet werden (Abb. 2.6).

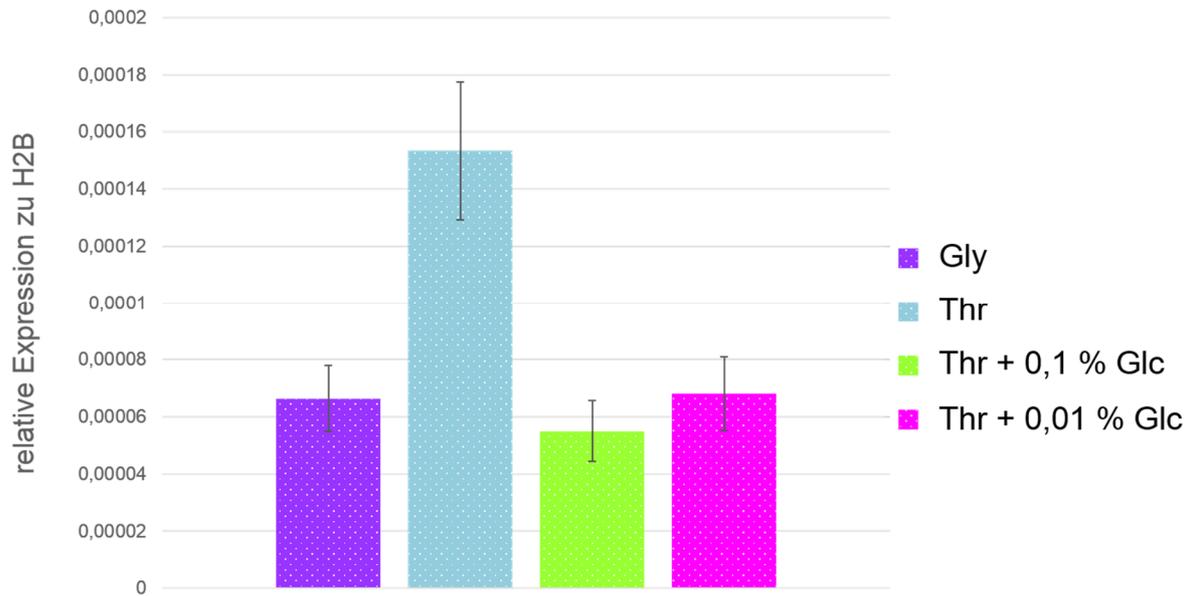


**Abbildung 2.5: Lifeact-GFP Expressionslevel durch Regulation der Expression mit Hilfe der Kohlenstoffquelle.** **A:** Lifeact-GFP Expression in Minimalmedium mit 2% Threonin plus verschiedenen Konzentrationen von Glucose. Glucose reguliert hierbei die Expression herunter. Unter den Bedingungen unter Zugabe von 1% und 0,1% Glucose zum Medium weisen die Hyphen eine gesunde und normale Morphologie auf, das Fluoreszenzsignal ist jedoch kaum detektierbar. Unter Zugabe von 0,01% Glucose zum Medium ist die Morphologie der Hyphen ebenfalls normal und es können dynamische Actin Strukturen beobachtet werden. Maßstabsbalken 2  $\mu\text{m}$ . **B:** Dynamik des Actin Netzwerkes unter Anzucht in Minimalmedium mit 2% Threonin plus 0,01% Glucose. Es sind lange, dynamische Actinkabel an der Hyphenspitze zu beobachten. Maßstabsbalken 1  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden.



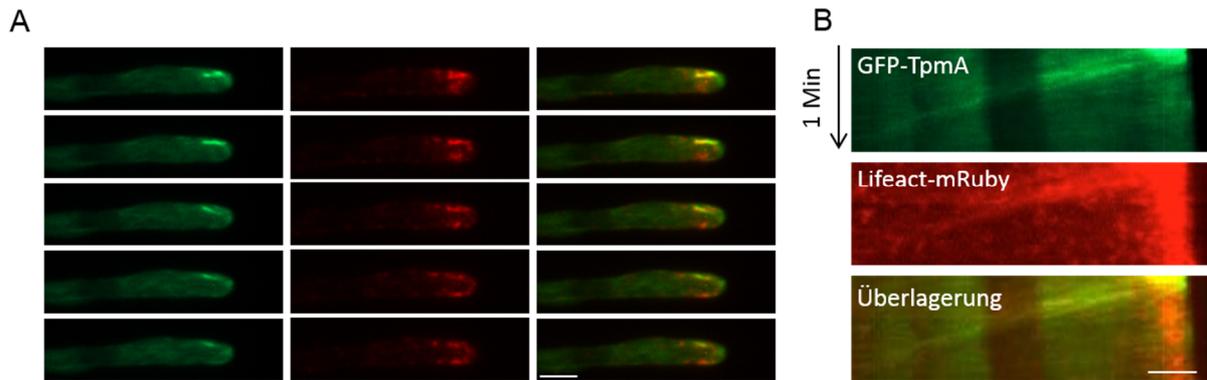
**Abbildung 2.6: Quantifizierung der Elongationsraten von Actinkabeln entweder in Glycerin haltigem oder Threonin plus Glucose haltigem Minimalmedium und Expression von GFP-TpmA in Minimalmedium mit 2% Threonin plus 0,01% Glucose als Kohlenstoffquelle. A:** Quantifizierung der Elongationsraten von Actinkabeln in den GFP-TpmA und Lifact-GFP exprimierenden Stämmen. In Glycerin haltigem Medium ist die Elongationsrate des Lifact-GFP exprimierenden Stammes gegenüber der des GFP-TpmA exprimierenden Stammes um 85% reduziert. Dieser Effekt kann jedoch fast vollständig wieder hergestellt werden, wenn Threonin haltiges Medium mit 0,01% Glucose zur Anzucht verwendet wird. **B:** Expression von GFP-TpmA in Minimalmedium mit 2% Threonin plus 0,01% Glucose als Kohlenstoffquelle. Unter diesen Bedingungen sind keine spezifischen Actin Strukturen innerhalb der Hyphse erkennbar, lediglich eine Hintergrundfluoreszenz im Cytoplasma wurde detektiert. Maßstabsbalken 1 µm.

Da die Zugabe von Glucose ins Anzuchtmedium die Expression theoretisch herunterregulieren sollte, wurde dies mittels einer quantitativen Realtime Polymerase Ketten Reaktion (qRT PCR) überprüft. Hierzu wurde der Lifact-GFP exprimierende Stamm in Flüssigkultur in Minimalmedium mit 2% Glucose in einer Vorkultur über Nacht, schüttelnd, angezogen. Das Mycel wurde filtriert und gewaschen und anschließend für drei Stunden in Minimalmedium mit entweder 2% Glycerin, 2% Threonin, 2% Threonin plus 0,1% Glucose oder 2% Threonin plus 0,01% Glucose induziert. Aus dem Mycel wurde die RNA mit Hilfe des EZNA fungal RNA Kits präpariert und eine qRT PCR mit den Primern qRT\_GFP\_fw und qRT\_GFP\_rev, welche GFP amplifizieren durchgeführt. Die relative Expression von GFP wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$  Methode ermittelt, diese ist in Abbildung 2.7 visualisiert. Abbildung 2.7 zeigt anschaulich, dass die Zugabe von Glucose zum Anzuchtmedium die Expression herunterreguliert. Hierbei ist die Expression stärker herabreguliert je höher die Menge an zugegebener Glucose ist. Auch ist erkennbar, dass der *alcA* Promotor korrekt funktioniert, da die Expression in Threonin weit höher ist, als diese in Glycerin.



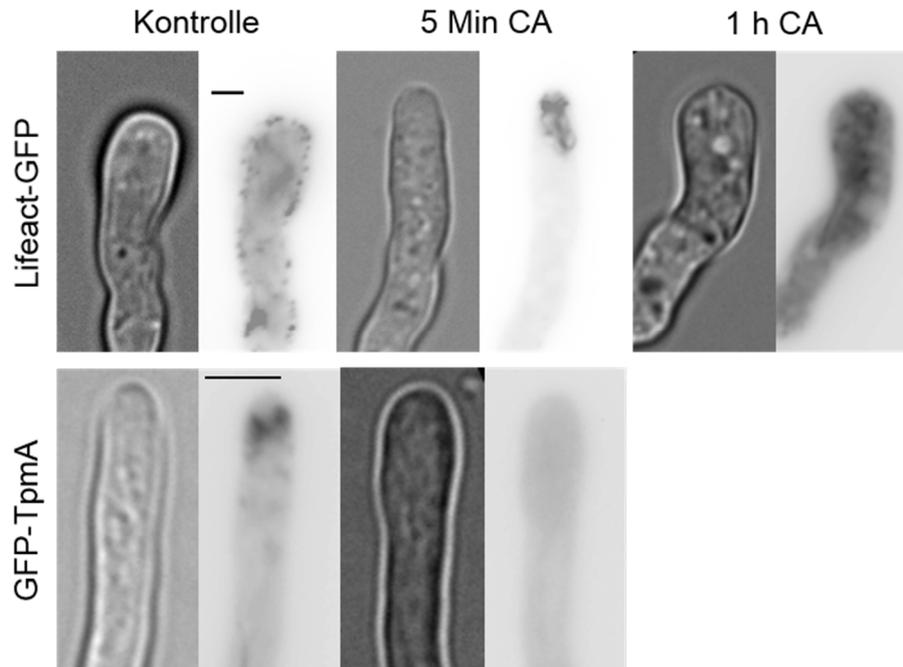
**Abbildung 2.7: qRT PCR zur Ermittlung der relativen Expression des Lifact-GFP Fusions-Konstruktes in Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.** Die Expression in Glycerin (lila, MM 2% Glycerin) ist, wie erwartet, bei weitem niedriger als in Threonin (hellblau, MM 2% Threonin) haltigem Medium. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Glucose zum Anzuchtmedium eine Herabsetzung der Expression zur Folge hat, dabei ist die Expression bei Zugabe einer größeren Menge Glucose geringer (grün, MM 2% Threonin mit 0,1% Glucose; pink, MM 2% Threonin mit 0,01% Glucose). Die Werte wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta Ct$  Methode relativ zur Expression des Haushaltsgens Histon 2B (H2B) ermittelt.

Zur Überprüfung eines möglichen globalen Stabilisierungseffekts von Lifact auf Actin wurde ein Stamm konstruiert, welcher GFP-TpmA und Lifact-mRuby unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA* Promoters exprimiert. Unter de-reprimierenden Bedingungen konnten in der vorliegenden Arbeit für GFP-TpmA dynamische Actinkabel gezeigt werden (Abb. 2.15), wohingegen der Stamm, welcher nur Lifact-GFP exprimiert, stabilere, statische Actinstrukturen aufwies (Abb. 2.4). Der Stamm, welcher beide Proteine exprimiert, zeigte unter denselben Bedingungen eine co-Lokalisation der beiden Signale entlang von Actinkabeln (Abb. 2.8), diese waren jedoch weniger dynamisch als diese, welche nur von GFP-TpmA alleine dekoriert wurden.

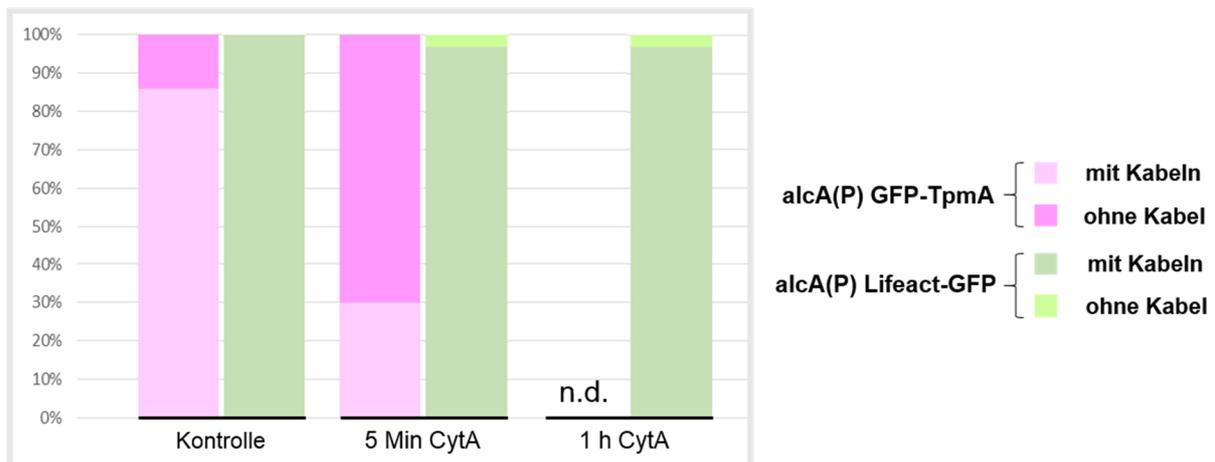


**Abbildung 2.8: Untersuchung der Actindynamik in einem Lifact-mRuby und GFP-TpmA co-Expressionsstamm.** **A:** co-Expression von Lifact-mRuby und GFP-TpmA unter dem *alcA* Promotor. Die beiden Signale co-Lokalisieren entlang von Actinkabeln. Maßstabsbalken 1  $\mu\text{m}$ . **B:** Kymographen aus A. Die Dynamik von GFP-TpmA dekorierten Kabeln ist unter co-Expression mit Lifact-mRuby reduziert. Maßstabsbalken 1  $\mu\text{m}$  beziehungsweise 1 Minute.

Zusätzlich wurden die Lifact-GFP und GFP-TpmA exprimierende Stämme unter Kontrolle des induzierbaren *alcA* Promotors in Minimalmedium mit 2% Glycerin für die Epifluoreszenz Mikroskopie inokuliert und nach Inkubation über Nacht bei 28°C mit einer 1  $\mu\text{g/ml}$  konzentrierten Cytochalasin-Lösung behandelt. Cytochalasine sind dafür bekannt, dass sie die Polymerisation von Actin *in vivo* hemmen und können zur Untersuchung der Funktionen des Actincytoskeletts genutzt werden (Srinivasan *et al.*, 1996). Bei diesem Experiment konnte beobachtet werden, dass das von GFP-TpmA visualisierte Actincytoskelett nach fünf minütiger Inkubation mit Cytochalasin A (CA) zerstört wurde (Abb. 2.9). Wohingegen das von Lifact-GFP angefärbte Actincytoskelett selbst nach einer einstündigen Behandlung mit Cytochalasin noch stabil war (Abb. 2.9). Die nicht behandelten Proben wiesen hierbei die normalen Actin Strukturen auf (Abb. 2.9). Diese Beobachtungen wurden darüber hinaus quantifiziert. Im Zuge dessen wurden für jede Art der Behandlung 100 Zellen ausgezählt und in zwei Kategorien, mit Kabeln oder ohne Kabel, eingeteilt. Das Ergebnis ist in Abb. 2.10 dargestellt. Im Falle des GFP-TpmA exprimierenden Stammes wiesen die Zellen der Kontrolle (ohne Cytochalasin A Behandlung) in 86% der Fälle Kabel auf. Nach 5 minütiger CA Behandlung konnten in lediglich 30% der Zellen Kabel beobachtet werden. Im Falle des Lifact-GFP exprimierenden Stammes wiesen alle Zellen der Kontrolle Kabel auf und nach einer Stunde CA Behandlung waren es immer noch 97%.



**Abbildung 2.9: Visualisierung des Actincytoskeletts in Lifeact-GFP und GFP-TpmA exprimierenden Stämmen unter Behandlung mit Cytochalasin A (CA).** In den Kontrollstämmen, welche nicht mit Cytochalasin A behandelt wurden, konnten die für den jeweiligen Stamm normalen Actin Strukturen beobachtet werden. Im Falle des Lifeact-GFP exprimierenden Stammes war das Actincytoskelett sogar nach einer einstündigen Behandlung mit Cytochalasin A noch intakt. Jedoch war das Actincytoskelett im GFP-TpmA exprimierenden Stamm bereits nach einer fünf minütigen Behandlung zerstört. Maßstabsbalken 1  $\mu\text{m}$ .

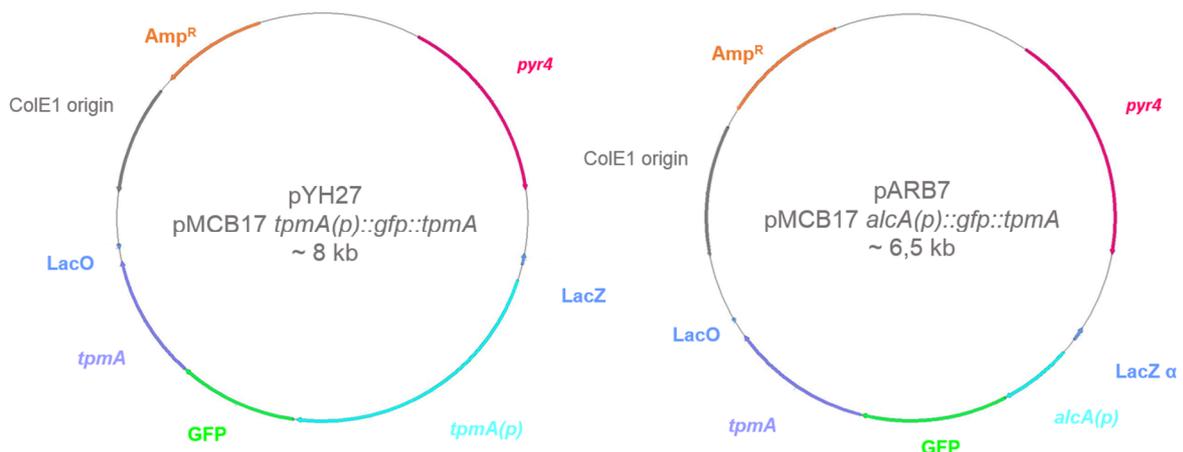


**Abbildung 2.10: Quantifizierung der Actinkabel in Lifeact-GFP und GFP-TpmA exprimierenden Stämmen unter Cytochalasin A Behandlung.** Es wurden für jede Art der Behandlung 100 Zellen ausgezählt und in zwei Kategorien, mit Kabeln oder ohne Kabel, eingeteilt. Im Falle von GFP-TpmA dekorierten Kabeln wiesen 86% der Zellen unter Kontrollbedingungen (kein Cytochalasin A) Kabel auf, wohingegen es 100% im Falle von Lifeact-GFP dekorierten Kabeln waren. Nach einer fünf minütigen Behandlung mit Cytochalasin A wiesen lediglich 30% der Hyphen des GFP-TpmA exprimierenden Stammes Kabel auf, indes konnten in 97% der Zellen des Lifeact-GFP exprimierenden Stammes nach dieser Zeit Kabel detektiert werden. Selbst nach einer einstündigen Behandlung mit Cytochalasin A änderte sich dieser Wert nicht.

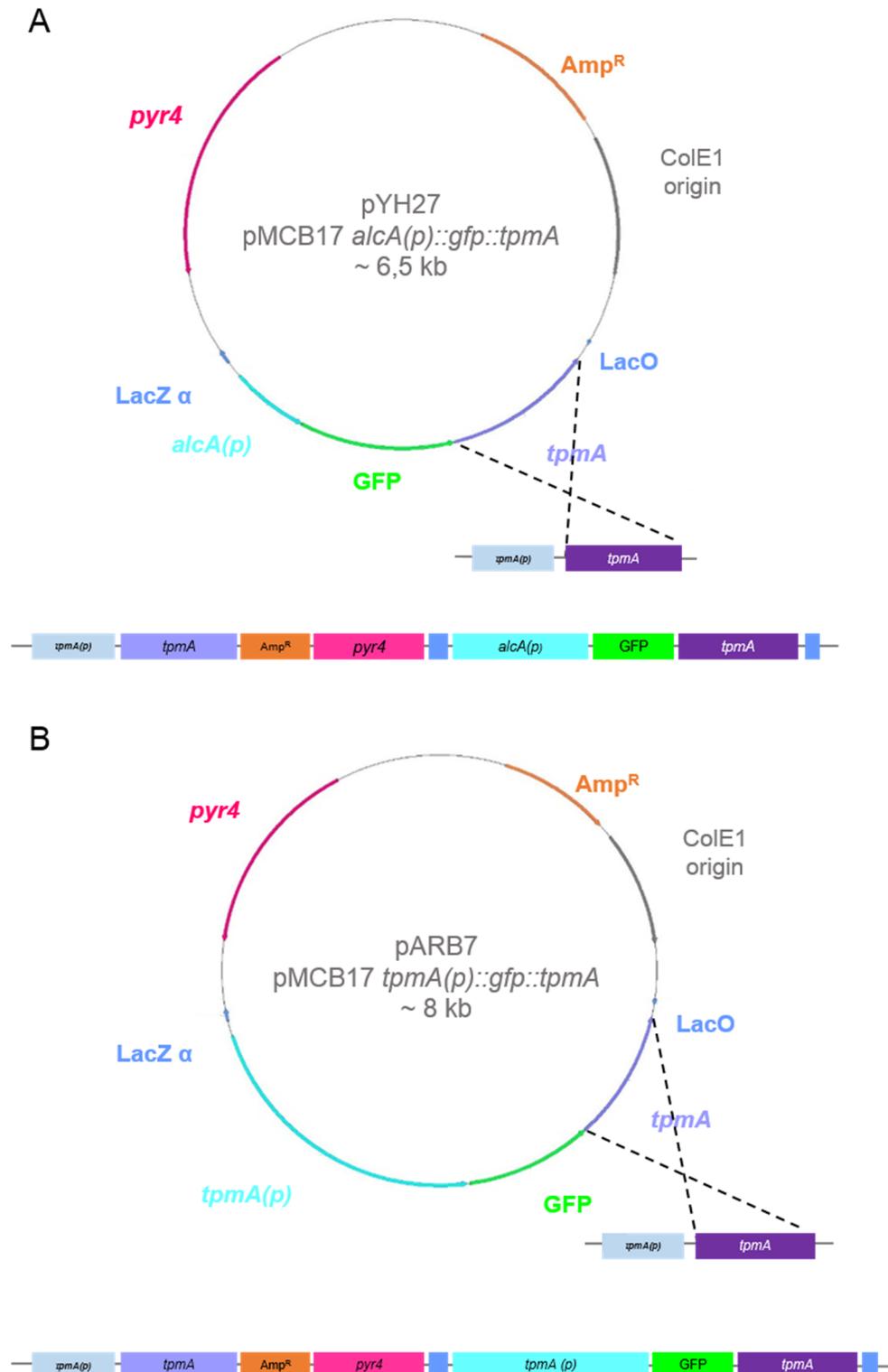
## 2.2 Tropomyosin TpmA als Marker für dynamische Actinkabel

Da Lifeact offensichtlich zu einer Stabilisierung der Actindynamik führt, sollte ein anderer Marker zur Visualisierung von Actinfilamenten genutzt werden. TpmA wurde bereits in *Aspergillus nidulans* zu diesem Zweck verwendet (Pearson *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass es nicht in Actinpatches, jedoch gelegentlich in Kabeln sowie dem Spitzenkörper und einem Ring an Septen lokalisiert (Pearson *et al.*, 2004, Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Deshalb wurde zur Untersuchung der Dynamik von Actinkabeln in *A. nidulans*, GFP an den N-Terminus des Tropomyosins TpmA fusioniert. Hierzu wurde *tpmA* aus genomischer DNA mit Hilfe der Primer *tpmA\_fw* und *tpmA\_rev*, welche passende Schnittstellen anfügten, amplifiziert. Dieses Amplikon wurde schlussendlich in den pCMB17 Expressionsvektor ligiert, wodurch das Fusionsprotein unter der Kontrolle des regulierbaren *alcA* Promotors exprimiert wurde. Der resultierende Expressionsvektor wurde pYH27 genannt (Abb. 2.11). Zur Expression unter der Kontrolle des natürlichen Promotors wurde dieser mit Hilfe der Primer *tpmA(P)\_fw* und *tpmA(P)\_rev* aus genomischer DNA amplifiziert, wobei geeignete Restriktionsschnittstellen angefügt wurden. Dieser wurde dann anstelle des *alcA* Promotors in das pYH27 Plasmid eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde pARB7 genannt (Abb. 2.11). Dieses wurde anschließend in *A. nidulans* TN02A3 Protoplasten transformiert. Die Selektion positiver Kandidaten erfolgte durch ein visuelles Screening der Transformanden. Durch homologe Rekombination der Konstrukte ins Genom, gelangen die auf dem Vektor enthaltenen Gene unter die Kontrolle des jeweiligen natürlichen Promotors. Gleichzeitig gelangt das vollständige Gen unter die Kontrolle des *alcA* beziehungsweise des *tpmA* Promotors (Abb. 2.12). Die resultierenden Stämme wurden SNT147 und SARB6 genannt. Die Integration der Konstrukte in das *A. nidulans* Genom wurde via Southern Blot überprüft (Abb. 2.13). Hierzu wurde genomische DNA der Stämme SNT147 und SARB6 präpariert. Die genomische DNA wurde mit *HindIII* geschnitten. Eine Sonde, welche den *open reading frame* überspannte, wurde mit Hilfe der Primer *TpmA\_fw\_SB* und *TpmA\_rev\_SB* hergestellt. Diese wurde mit DIG dNTPs markiert und sollte an ein 700 bp großes Fragment binden. Bei einer homologen Rekombination in das Genom würde dies in beiden Fällen bedeuten, dass das Fusionsgen hinter dem natürlichen Gen eingefügt wird. Dies hat zur Folge, dass zwei *tpmA* Gene innerhalb des Genoms vorhanden sind. Zum einen die Version, welche auf dem Plasmid liegt und mit GFP fusioniert ist und zum anderen das Gen unter seinem natürlichen Promotor. Diese Strategie wurde gewählt, da in vorhergehenden Studien gezeigt wurde, dass das Fusionskonstrukt nur heterolog integriert (Taheri-Talesh *et al.*, 2008) und dies womöglich der Fall ist, da das Fusionskonstrukt nicht vollständig funktionsfähig ist und das endogene nicht markierte Gen zusätzlich vorhanden sein muss. Für SNT147 ergibt sich bei homologer

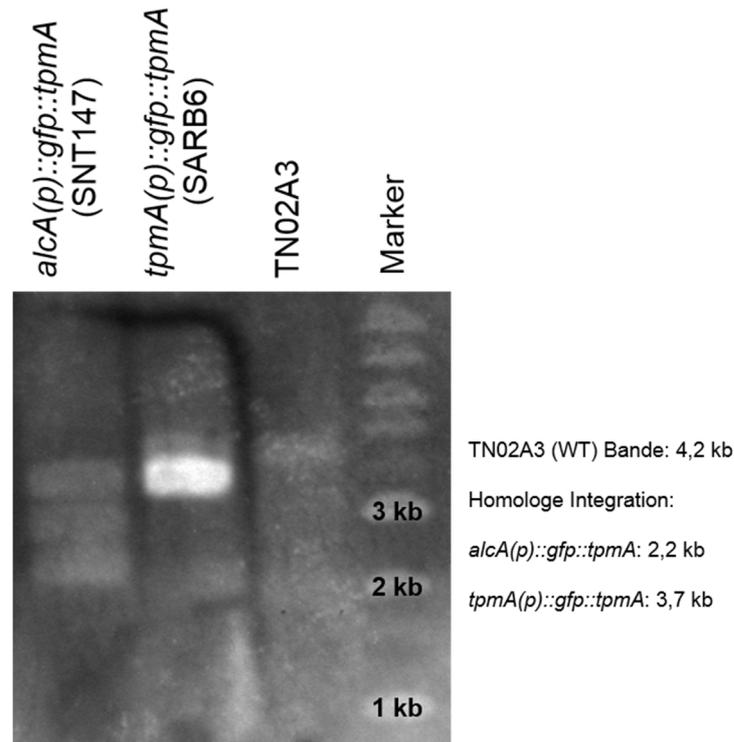
Integration eine Bande mit einer Größe von 2,2 kb. Für den Wildtyp ergäbe sich in diesem Fall eine Bandengröße von 4,2 kb. Für SARB6 wäre bei homologer Integration eine Bandengröße von 3,7 kb zu erwarten. Sowohl für SNT147 als auch für SARB6 würde sich, falls die Sequenz des Vektors direkt hinter dem natürlichen Gen eingefügt, eine Bande mit einer Größe von 3,7 kb für das natürliche *tpmA* Gen ergeben. Wie deutlich in Abbildung 2.13 erkennbar, konnte für den Wildtyp TN02A3, wie erwartet, eine Bande in Höhe von 4,2 kb detektiert werden. Im Falle des Stammes SNT147 konnte die Bande für homologe Integration auf Höhe von 2,2 kb, eine Bande unbekanntes Ursprungs mit einer Größe von etwa 3 kb sowie eine Bande bei 3,7 kb, welche dem natürlichen *tpmA* Gen entspricht festgestellt werden. Die Bande unbekanntes Ursprungs stellt möglicherweise eine weitere, ektopische, Integration des Konstrukts in das Genom dar. Im Falle des Stammes SARB6 wurde eine starke Bande auf Höhe von 3,7 kb registriert, welche sowohl das integrierte Fusionskonstrukt, als auch das endogene, nicht markierte *tpmA* Gen nachweist.



**Abbildung 2.11: Vektorkarten der *alcA(p)::gfp::tpmA* und *tpmA(p)::gfp::tpmA* Expressionsvektoren.** Die Vektoren enthalten eine Ampicillin Resistenz (Orange), zur Selektion in *Escherichia coli*, den Auxotrophiemarker *pyr4* (Magenta), und *tpmA* (Lila) fusioniert mit GFP (Grün) unter der Kontrolle des regulierbaren *alcA* beziehungsweise des natürlichen Promotors (Cyan). Der *alcA(p)::gfp::tpmA* Vektor hat eine Gesamtgröße von circa 6,5 kb, wohingegen *tpmA(p)::gfp::tpmA* eine Größe von circa 8 kb hat.



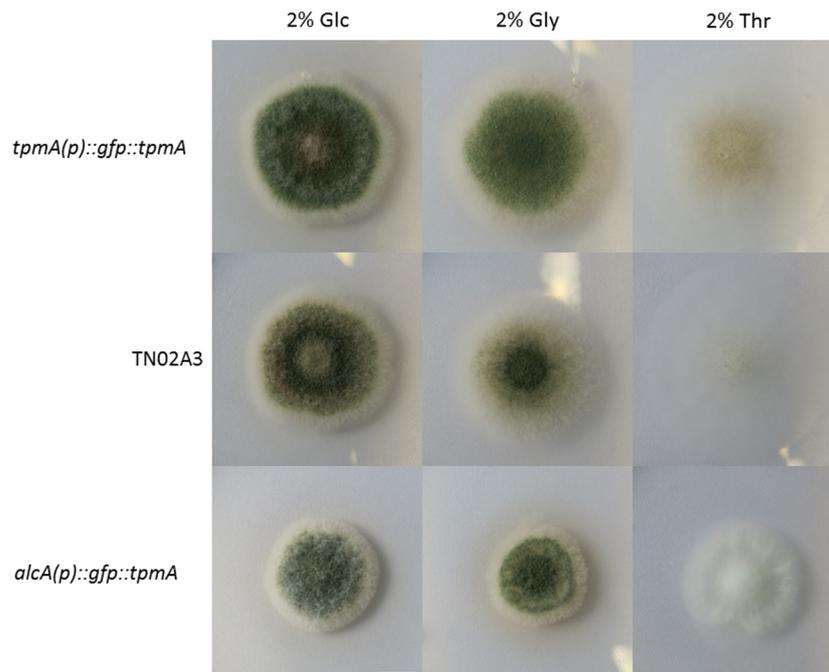
**Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der homologen Rekombination von pYH27 und pARB7 in das *A. nidulans* Genom. A:** pYH27 Vektor und Ort der homologen Rekombination. Herstellung eines N-terminalen GFP Fusion mit dem *tpmA* Gen. Das Fusionskonstrukt wurde in einen Vektor ligiert, welcher den induzierbaren *alcA* Promotor besitzt. Durch Transformation in einen Wildtyp-Stamm findet homologe Rekombination zwischen der im Vektor enthaltenen Sequenz und der im Genom vorhandenen Sequenz statt. Durch homologe Integration wird die auf dem Plasmid enthaltene *tpmA* Version hinter dem natürlichen Promotor integriert, wodurch das Fusionskonstrukt unter die Kontrolle des *alcA* Promoters gelangt. **B:** pARB7 Vektor und Ort der homologen Rekombination. Herstellung eines 1,8 kb großen Promotorfragments des natürlichen, *tpmA(p)*, Promotors. Das Fusionskonstrukt wurde in den pYH27 Vektor ligiert. Durch Transformation in einen Wildtyp-Stamm findet homologe Rekombination zwischen der im Vektor enthaltenen Sequenz und der im Genom vorhandenen Sequenz statt. Durch homologe Integration wird die auf dem Plasmid enthaltene *tpmA* Version hinter dem natürlichen Promotor integriert, wodurch das Fusionskonstrukt unter die Kontrolle des *tpmA(p)* Promoters gelangt.



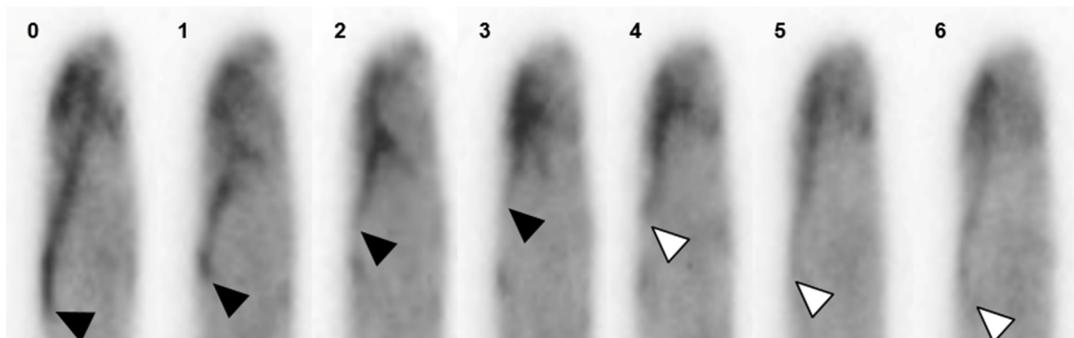
**Abbildung 2.13: Southern Blot zur Überprüfung der Stämme SNT147 und SARB6.** Die genomische DNA der Stämme SNT147 (*alcA(p)::gfp::tpmA*) und SARB6 (*tpmA(p)::gfp::tpmA*) sowie des Wildtyp Stammes TN02A3 wurde präpariert und mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten. Zur Detektion wurde eine Sonde, welche den *tpmA* open reading frame überspannte, mit Hilfe der Primer TpmA\_fw\_SB und TpmA\_rev\_SB amplifiziert. Bei homologer Integration (siehe Abb. 2.12) würde der Vektor hinter dem endogenen *tpmA* integriert, sodass zwei funktionelle Versionen des Gens im Genom enthalten sind (eine natürliche und eine mit GFP fusionierte Version). Dadurch entstünde im Falle von SNT147 eine Bande von 2,2 kb Größe für die Fusion und von 3,7 kb für das natürliche Gen. Diese sind beide detektiert. Zusätzlich ist eine weitere Bande von etwa 3 kb zu sehen, welche nicht eindeutig zuzuordnen ist. Im Falle des SARB6 Stammes entstünde eine Bande von 3,7 kb Größe für das Fusionsgen und eine gleichgroße Bande für das natürliche Gen. Auf dem Blot ist eine sehr starke Bande in Höhe von etwa 3,7 kb erkennbar. Im Falle der Wildtyp Situation ist eine Bande von 4,2 kb zu erwarten, welche für TN02A3 detektiert werden konnte.

Die Expression unter der Kontrolle des *alcA* Promoters ist mit Hilfe der Kohlenstoffquelle regulierbar. So ist die Expression unter Anzucht in Minimal Medium mit 2% Glycerin als Kohlenstoffquelle de-reprimiert, unter Zugabe von 2% Threonin wird das Gen der Wahl überexprimiert und unter Verwendung von 2% Glucose reprimiert. Unter de-reprimierenden Bedingungen zeigte der Stamm SNT147 eine ähnliche Hyphenmorphologie wie der Wildtyp (Abb. 2.14). GFP-TpmA lokalisierte an den Hyphenspitzen, dort konnten häufig Actinkabel, aber niemals Patches, beobachtet werden (Abb. 2.15). Zudem lokalisierte das Fusionsprotein in Spitzenkörper-ähnlichen Strukturen. Die Actinkabel, welche mit Hilfe des Tropomyosins visualisiert wurden, zeigten eine Dynamik, welche durch Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation charakterisiert wurde (Abb. 2.15). Die Fusion des Proteins mit GFP unter dem natürlichen Promotor hatte keine offensichtlichen Effekte auf das Kolonie Wachstum, die Sporenbildung oder die Morphologie der Hyphen (Abb. 2.14). Der Stamm SARB6, welcher TpmA unter seinem natürlichen Promotor exprimiert, wies ähnliche Actinstrukturen auf, das Fluoreszenzsignal war jedoch um einiges schwächer im Vergleich zur Expression unter dem

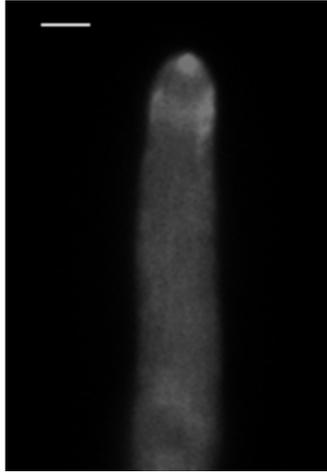
*alcA* Promotor und es konnte eine höhere Hintergrundfluoreszenz im Cytoplasma verzeichnet werden (Abb. 2.16).



**Abbildung 2.14: Vergleich des Wachstums von GFP-TpmA exprimierenden Stämmen und dem Wildtyp TN02A3 kultiviert auf Festmedium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.** Sporensuspensionen mit einer Konzentration von  $10^5$  Sporen/ml wurden auf Agarplatten mit der angegebenen Kohlenstoffquelle auf getropft und zwei Tage bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Im Vergleich untereinander sehen die Kolonien auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen ähnlich aus, dies lässt auf eine biologische Funktionalität der Stämme rückschließen. Maßstabsbalken 1 cm.

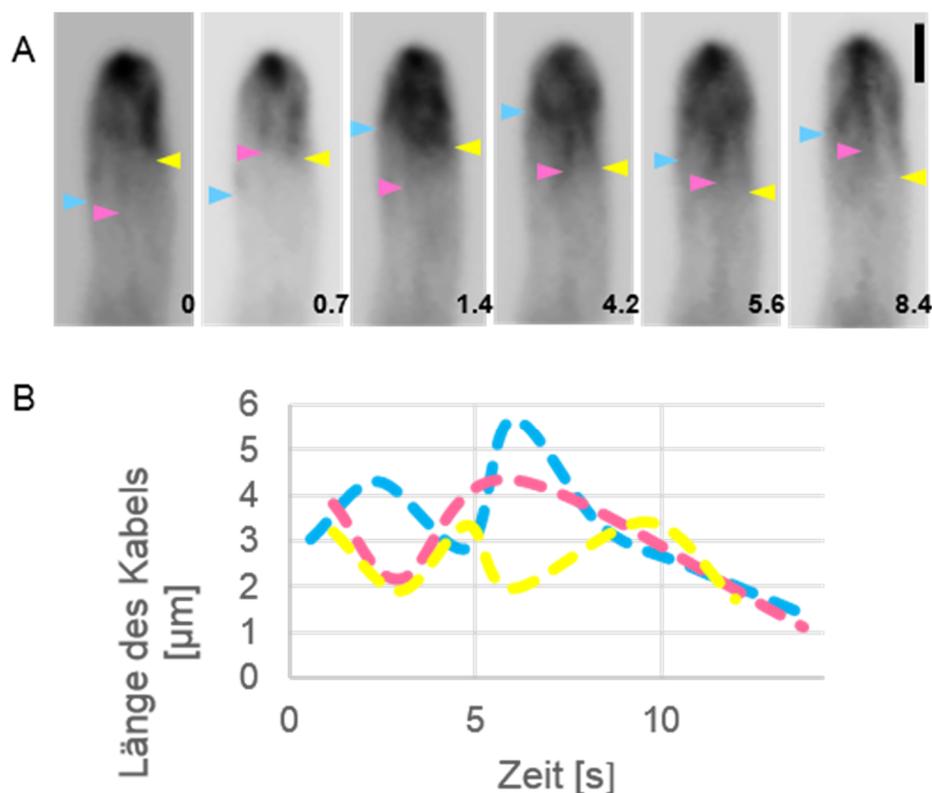


**Abbildung 2.15: Bildsequenz dynamischer Actinkabel in Hyphenspitzen von *A. nidulans* untersucht mit Hilfe von Epifluoreszenz Mikroskopie in lebenden Zellen, welche das GFP-TpmA Fluoreszenzprotein exprimierten.** Gesamtzeit 6 Sekunden. Expositionszeit im DIC Kanal 100 ms, Expositionszeit im GFP Kanal 500ms. Schwarze Pfeile zeigen Polymerisation, weiße Pfeile Depolymerisation des Actinkabels. Maßstabsbalken  $2\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden.



**Abbildung 2.16: Lokalisation von Actin unter Expression des GFP-TpmA Fusionsproteins unter seinem natürlichen Promotor in Minimalmedium mit 2% Glucose.** Unter dem natürlichen Promotor konnten ähnliche Lokalisierungsmuster von Actin, wie unter dem *alcA* Promotor (Abbildung 2.2) beobachtet werden. Jedoch scheinen das Signal schwächer und die Hintergrundfluoreszenz im Cytoplasma höher zu sein. Maßstabsbalken 2  $\mu\text{m}$ .

In den meisten Fällen wurden mehrere Actinkabel an der Hyphenspitze beobachtet. Diese zeigten voneinander unabhängige Dynamiken (Abb. 2.17). Zur Veranschaulichung wurde die Änderung der Länge der Actinkabel in  $\mu\text{m}$  gegen die Zeit aufgetragen, das resultierende Diagramm ist in Abbildung 2.17 B gezeigt. Die Anzahl der Kabel pro Hyphe, die Polymerisationsrate, die Depolymerisationsrate, die Länge vor einer Katastrophe und die Häufigkeit von Katastrophen wurden quantifiziert (siehe dazu Abschnitt 2.3 und Tabelle 2.1). Zusätzlich zu seiner Lokalisation an der Hyphenspitze, konnte TpmA an sich neu formenden Septen beobachtet werden (siehe dazu Abschnitt 2.4, Abb. 2.24 A).



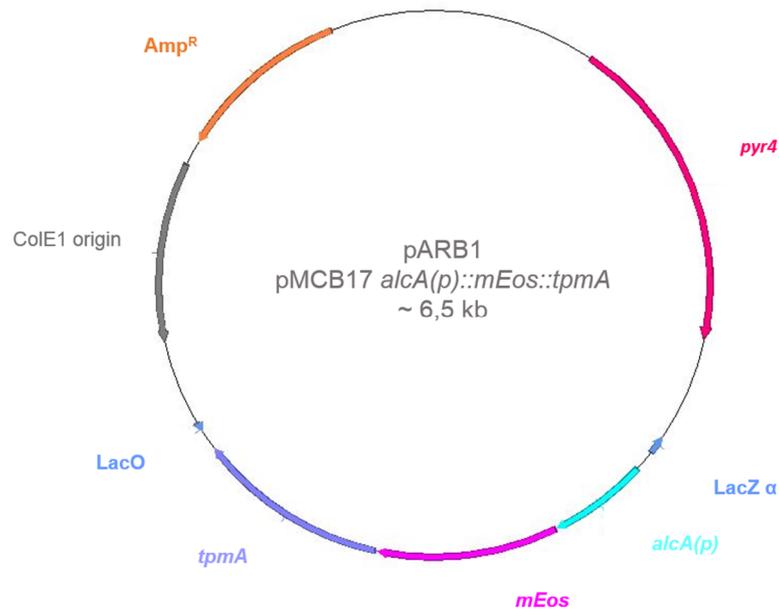
**Abbildung 2.17: Dynamik der mit GFP-TpmA visualisierten Actinkabel.** **A:** Actinkabel an der Hyphenspitze. Verschiedenfarbige Pfeile zeigen die Minusenden des jeweiligen Actinkabels an. Die drei Actinkabel haben voneinander unabhängige Dynamiken. Maßstabsbalken 1 µm. Zeit in Sekunden. **B:** Visualisierung der Dynamik der in A gezeigten Actinkabel über die Zeit. Dabei wurde die Änderung der Länge in µm gegen die Zeit aufgetragen. Auch hier ist erkennbar, dass die Dynamik jedes Actinkabels für sich allein steht.

Die Überexpression von TpmA in 2% Threonin hatte keine offensichtlichen Effekte auf das Kolonie Wachstum, die Sporenbildung oder die Morphologie der Hyphen (Abb. 2.14). Jedoch hatte der Stamm zusätzlich zur normalen Verteilung eine hohe Hintergrundfluoreszenz im Cytoplasma (Abb. 2.18).

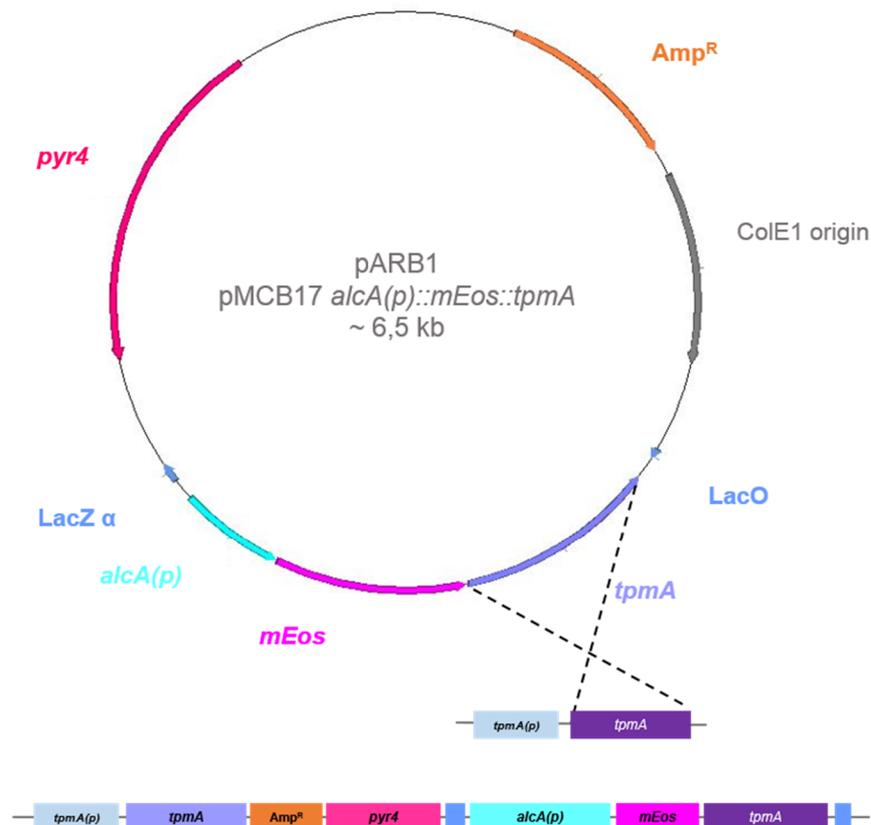


**Abbildung 2.18: Lokalisation von Actin unter Expression des GFP-TpmA Fusionsproteins unter Überexpression unter der Kontrolle des *alcA* Promotors in Minimalmedium mit 2% Threonin als Kohlenstoffquelle.** Zusätzlich zur üblichen Lokalisation konnte eine sehr hohe Hintergrundfluoreszenz im Cytoplasma festgestellt werden. Maßstabsbalken 2 µm.

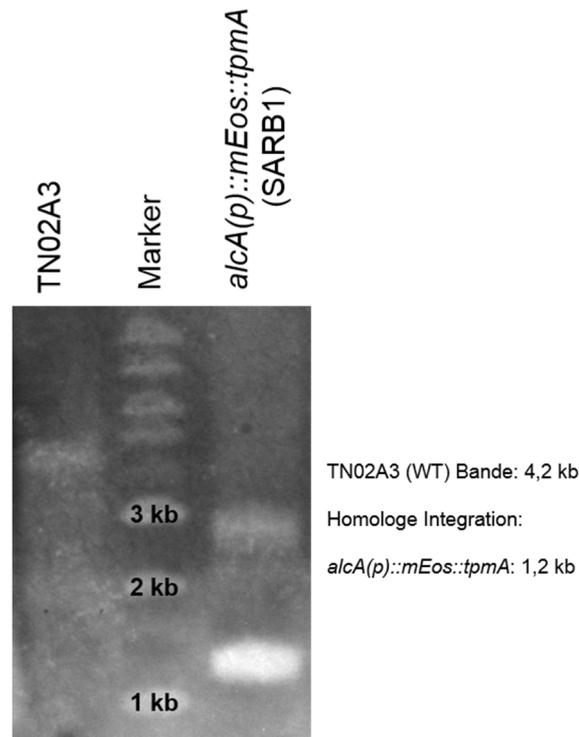
Zur Verfolgung von Einzelmolekülen innerhalb eines Actinkabels wurde das GFP Fluoreszenzprotein mit dem photo-konvertierbaren mEosFPthermo ausgetauscht. mEosFPthermo ist die monomere Variante des Grün zu Rot konvertierenden Fluorophors EosFP (Nienhaus *et al.*, 2005, Wiedenmann & Nienhaus, 2006). Zu diesem Zweck wurde mEosFP mit Hilfe der Primer IrisEos\_KpnI\_fwd und Eos-st-r-pac mit dem pcDNA3\_Lifeact\_d2EosFP Plasmid als Template amplifiziert. Dieses wurde, sowie auch der pMBC17 Vektor, mit *KpnI* und *PacI* verdaut. Beide Fragmente wurden ligiert und der pARB1 Vektor (Abb. 2.19) mit dem *mEos::tpmA* Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA* Promotors erhalten. Dieser wurde in TN02A3 Protoplasten transformiert. Hierdurch wurde der Stamm SARB1 erhalten. Die Integration wurde durch einen visuellen Screen der Transformanten und einen Southern Blot getestet (Abb. 3.21). Für den Southern Blot wurde genomische DNA von SARB1 präpariert und mit *HindIII* verdaut. Die verwendete Sonde war dieselbe, welche für die GFP-TpmA exprimierenden Stämme verwendet wurde und umfasste den *open reading frame* von *tpmA*. Bei einer homologen Rekombination in das Genom würde dies, wie auch im Falle der Stämme SNT147 und SARB6, bedeuten, dass das Fusionsgen hinter dem natürlichen Gen eingefügt wurde. Dies hat zur Folge, dass zwei *tpmA* Gene innerhalb des Genoms vorhanden sind. Zum einen die Version, welche auf dem Plasmid liegt und mit mEos fusioniert ist und zum anderen das natürliche Gen unter seinem natürlichen Promotor (Abb. 2.20). Bei einer homologen Integration wäre hiermit eine Bandengröße von 1,2 kb zu erwarten. Für den Wildtyp ergäbe sich eine Bandengröße von 4,2 kb. Außerdem würde sich, falls die Sequenz des Vektors direkt hinter dem natürlichen Gen liegt, eine Bande mit einer Größe von 3,7 kb für das natürliche *tpmA* Gen ergeben. Wie in Abbildung 2.20 deutlich zu erkennen wurde für den Wildtyp die erwartete Bande in einer Höhe von 4,2 kb detektiert. Für den SARB1 Stamm wurde eine Bande auf Höhe von 1,2 kb, welche der homologen Integration des Konstruktes entspricht sowie eine Bande bei 3 kb detektiert. Diese Bande entspricht mit hoher Wahrscheinlichkeit dem endogenen, nicht markierten Gen. Die Größe für diese Bande kann nicht vorhergesagt werden, wenn der Vektor nicht direkt hinter dem natürlichen Gen eingebaut wird, sondern an einer anderen Stelle zur Rekombination öffnet.



**Abbildung 2.19: Vektorkarte des *alcA(p)::mEos::tpmA* Expressionsvektors.** Der Vektor enthält eine Ampicillin Resistenz (Orange), zur Selektion in *Escherichia coli*, den Auxotrophiemarker *pyr4* (Magenta), und *tpmA* (Lila) fusioniert mit *mEos* (Pink) unter der Kontrolle des regulierbaren *alcA* Promotors (Cyan). Der *alcA(p)::mEos::tpmA* Vektor hat eine Gesamtgröße von circa 6,5 kb.

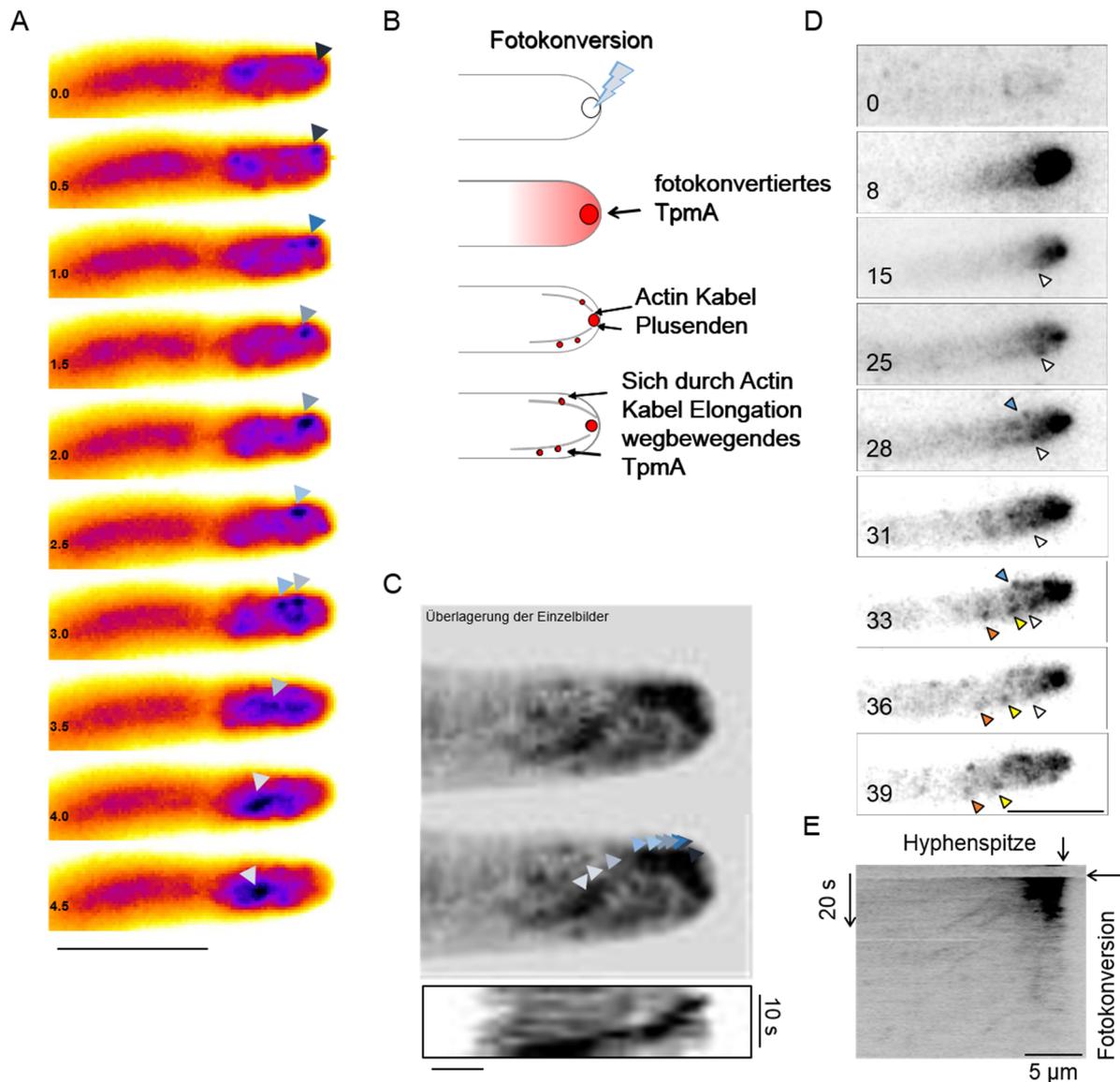


**Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der homologen Rekombination von pARB1 in das *A. nidulans* Genom.** pARB1 Vektor und Ort der homologen Rekombination. Herstellung eines N-terminalen *mEos* Fusion mit dem *tpmA* Gen. Der Fluorophor wurde in einen Vektor ligiert, welcher den induzierbaren *alcA* Promotor besitzt. Durch Transformation in einen Wildtyp-Stamm findet homologe Rekombination zwischen der im Vektor enthaltenen Sequenz und der im Genom vorhandenen Sequenz statt. Durch homologe Integration wird die auf dem Plasmid enthaltene *tpmA* Version hinter dem natürlichen Promotor integriert, wodurch das Fusionskonstrukt unter die Kontrolle des *alcA* Promotors gelangt.



**Abbildung 2.21 Southern Blot zum Nachweis der Integration des pARB1 Plasmids in das *A. nidulans* Genom.** Die genomische DNA des Stammes SARB1 (*alca(p)::mEosFPthermo::tpmA*) sowie des Wildtyp Stammes TN02A3 wurde präpariert und mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten. Zur Detektion wurde eine Sonde, welche den *tpmA* open reading frame überspannte, mit Hilfe der Primer TpmA\_fw\_SB und TpmA\_rev\_SB amplifiziert. Durch die homologe Integration (siehe Abb. 2.20) würde der Vektor hinter dem endogenen *tpmA* integriert, sodass zwei funktionelle Versionen des Gens im Genom enthalten sind (eine natürliche und eine mit *mEosFPthermo* fusionierte Version). Dadurch entstünde im Falle von SARB1 eine Bande von 1,2 kb Größe für die Fusion. Diese ist detektierbar. Zusätzlich ist eine weitere Bande von etwa 3 kb zu sehen, welche möglicherweise dem endogenen Gen zuzuordnen ist. Falls der Vektor nicht direkt hinter dem natürlichen Gen integriert wurde, kann die Bandengröße für das natürliche Gen nicht eindeutig bestimmt werden. Im Falle der Wildtyp Situation ist eine Bande von 4,2 kb zu erwarten, welche für TN02A3 detektiert werden konnte.

Ein geringer Anteil der Fluorophore wurde zur Verfolgung von Einzelmolekülen innerhalb eines Actinkabels durch Beleuchtung mit 405 nm Licht in seine rote Form konvertiert. Das rote Signal wurde dann innerhalb dynamischer Actinkabel verfolgt (Abb. 2.22 A). Die Einzelmoleküle schienen dabei von der Hyphenspitze zurück, in apikale Bereiche, zu wandern (Abb. 2.22 A). Das Überlagerungsbild der Einzelmoleküle weist eine einzelne Linie auf, bei der es sich vermutlich um ein Actinkabel handelt, welches von der Hyphenspitze her polymerisiert wurde (Abb. 2.22 C). Ein ähnliches Phänomen kann in Abbildung 2.22 D beobachtet werden. Hier wurde zum Zeitpunkt  $t = 7$  s für eine Sekunde mit 405 nm Licht konvertiert. Anschließend wurde das fotokonvertierte mEosFPthermo-TpmA Signal über die Zeit beobachtet. Auch hier ist sichtbar, dass das TpmA Signal in distale Bereiche der Hyphe zu wandern scheint. Der dazugehörige Kymograph (Abb. 2.22 E) zeigt eine lineare Bewegung der TpmA Moleküle. Dies ist ein Indiz für eine aktive Elongation der Actinkabel.

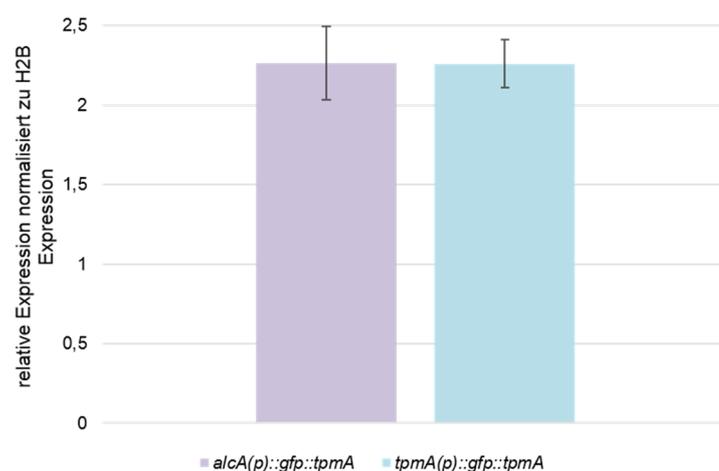


**Abbildung 2.22: Dynamische Lokalisation von Actinkabeln in *A. nidulans* Hyphenspitzen beobachtet mit Hilfe von PALM (*photo activated light microscopy*) in lebenden Zellen, welche das mEosFPthermo-TpmA Fusionsprotein exprimierten. A:** Weitfeld Aufnahmen der Bewegung des mEosFPthermo-TpmA Signals entlang des Apex von wachsenden Hyphen. Jede Aufnahme wurde mit einer Expositionszeit von 50 ms aufgenommen. Die Bilder wurden nachträglich falsch eingefärbt, wobei dunkle Farben eine hohe Moleküldichte und helle Farben eine niedrige Moleküldichte kennzeichnen. Die verschiedenen Blauschattierungen der Pfeile zeigen das Erscheinen verschiedener Einzelmoleküle an. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden. **B:** Modell für die Molekülbewegung innerhalb von Actinkabeln. Die Abbildung zeigt die Bewegung von Einzelmolekülen über die Zeit. Wenn ein Molekül fotokonvertiert wird, wandert es, durch den Einbau von neuen G-Actin Molekülen am Plusende des Kabels, zum Minusende des Kabels. Dies führt zur Bewegung der fotokonvertierten Moleküle in subapikale Bereiche der Hyph. **C:** Überlagerung der Einzelbilder aus A und dazugehöriger Kymograph. Verschiedene Einzelmoleküle sind mit den aus A korrespondierenden Pfeilen markiert. Die Überlagerung zeigt ein aus den Einzelmolekülen geformtes Actinkabel. Der Kymograph zeigt die Bewegung der Moleküle über die Zeit. Maßstab 1  $\mu\text{m}$  beziehungsweise 10 Sekunden. **D:** Bildsequenz von fotokonvertiertem mEosFPthermo-TpmA. Die Moleküle wurden zum Zeitpunkt  $t = 7\text{s}$  für eine Sekunde fotokonvertiert. Die verschiedenfarbigen Pfeilspitzen zeigen die Bewegung von mEosFPthermo-TpmA. Zeit in Sekunden. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ . **E:** Kymograph der Bildsequenz aus (D). Das Profil zeigt, dass sich das fotokonvertierte mEosFPthermo-TpmA linear bewegt, was ein Hinweis auf eine aktive Elongation eines Actinkabels darstellt. Vertikale Ausdehnung 20s, horizontaler Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ .

### 2.3 Quantifizierung der Actindynamik in *A. nidulans*

Zur Quantifizierung der Actindynamik in *A. nidulans* wurden die Polymerisations- und Depolymerisationsraten für jedes einzelne untersuchte Actinkabel berechnet. Zusätzlich wurde die Anzahl der Kabel per Hyphe, die Häufigkeit von Katastrophen und die Länge der Kabel vor einer Katastrophe ermittelt (Tabelle 2.1 und Abb. 2.24). Für diese Experimente wurden beide GFP-TpmA exprimierenden Stämme, sowohl unter dem natürlichen als auch unter dem *alcA* Promotor sowie der Lifeact-GFP exprimierende Stamm unter verschiedenen Expressionsbedingungen genutzt.

Um einen möglichen Effekt der Expressionsstärke der unterschiedlichen, für die GFP Fusionen mit TpmA verwendeten, Promotoren auszuschließen, wurde eine quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qRT PCR) auf die Expression von GFP durchgeführt. Hierfür wurden die Stämme SNT147 und SARB6 über Nacht in Minimalmedium mit 2% Glycerin kultiviert und am darauffolgenden Tag die RNA präpariert. Mit Hilfe der Primer qRT\_GFP\_fw und qRT\_GFP\_rev wurde die Expression des *gfp* Gens ermittelt. Diese wurde zur Histon 2B Expression mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$  Methode normalisiert. Es wurde bewusst die Expression des *gfp* Gens und nicht des *tpmA* Gens ermittelt, da durch den Verbleib des natürlichen *tpmA* Gens im Genom die Expression des *tpmA* Gens nicht nur die Expression des eingebrachten Fusionskonstruktes widerspiegelt. Für die Expression unter dem *alcA* Promotor ergeben sich dadurch Werte für die relative Expression von  $2,26 \pm 0,23$  (Mittelwert  $\pm$  S.D.) und für die Expression unter dem natürlichen Promotor von  $2,26 \pm 0,16$  (Mittelwert  $\pm$  S.D.) (Abb. 2.23). Die Expressionsstärken der beiden Vektoren sind dabei annähernd gleich.



**Abbildung 2.23: Relative Expression des *gfp* Gens unter Kontrolle des regulierbaren *alcA* beziehungsweise des natürlichen *tpmA* Promotors, normalisiert zur Expression des *h2b* (Histon 2B) Gens.** Mit Hilfe einer qRT PCR wurde die relative Expression, normalisiert zu H2B, ermittelt. Diese wurde gewählt, da die Expression des *tpmA* Gens nicht nur die Expression des Fusionskonstruktes, sondern auch, des im Genom verbleibenden natürlichen Gens, widerspiegeln würde. Die Expression unter Kontrolle beider Promotoren ist dabei annähernd gleich.

Der Mittelwert für die Anzahl der Actinkabel pro Hyphe in den GFP-TpmA exprimierenden Stämmen war bei Überexpression unter Kontrolle des *alcA* Promotors vergleichbar mit der unter dem natürlichen Promotor in beiden getesteten Konditionen und war um zwei Kabel pro Hyphe situiert. Der Wert für de-reprimierende Konditionen unter dem *alcA* Promotor war mit drei Kabeln pro Hyphe etwas höher angesiedelt. Die Elongationsraten sind ebenfalls ähnlich in der Überexpression unter dem *alcA* Promotor und in Glycerin und Threonin unter dem natürlichen Promoter. Als da wären  $0,28 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 11) für die Überexpression unter Kontrolle des *alcA* Promotors,  $0,28 \pm 0,04 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 46) für die Expression unter dem natürlichen Promotor in Glycerin-haltigem Medium und  $0,29 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 8) für die Anzucht desselben Stammes in Threonin-haltigem Medium. Unter dem *alcA* Promotor und de-reprimierenden Bedingungen war der Wert für die Elongationsrate mit  $0,58 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 76) viel höher im Vergleich zu den anderen Bedingungen. Dieses Bild zeichnet sich auch für die Depolymerisationsraten ab, mit Werten von  $0,37 \pm 0,04 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 17) für die Überexpression unter dem *alcA* Promotor,  $0,22 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 61) für die Expression unter dem natürlichen Promotor in Glycerin haltigem Medium und  $0,36 \pm 0,05 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 12) für die Expression unter dem natürlichen Promotor in Threonin haltigem Medium. Auch in diesem Falle zeigte die Expression unter de-reprimierenden Bedingungen unter dem *alcA* Promotor die höchsten Werte mit  $0,59 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 100). Die mittlere Häufigkeit von Katastrophen ist in den Stämmen, die GFP-TpmA unter der Kontrolle des *alcA* Promotors exprimierten, mit  $9,00 \pm 6,04$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 69) Katastrophen pro Minute unter de-reprimierenden Konditionen und  $11,98 \pm 2,08$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 14) Katastrophen pro Minute für die Überexpression viel höher als diese unter der Kontrolle des natürlichen Promotors mit  $4,0 \pm 2,71$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 41) in Glycerin und  $5,88 \pm 1,96$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 8) Katastrophen pro Minute in Threonin gemessen werden konnte. Die mittlere Länge der Actinkabel vor dem Auftreten einer Katastrophe war unter allen Bedingungen relativ ähnlich und die Werte lagen bei ca.  $3 \mu\text{m}$ .

Die Werte des Lifeact-GFP exprimierenden Stammes unterschieden sich sehr in Abhängigkeit der verwendeten Kohlenstoffquelle. So war die Anzahl der Kabel pro Hyphe mit  $1,3 \pm 0,7$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 29) in Glycerin Medium circa 22% geringer als die Anzahl unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) mit  $1,67 \pm 0,7$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 15) Kabeln pro Zelle. Die mittlere Elongationsrate in Glycerin hatte einen Wert von  $0,09 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 37), wohingegen die als  $0,19 \pm 0,04 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 144) unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) berechnet wurde, was bedeutet, dass die Elongationsrate in Glycerin nur 47% der Elongationsrate unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) beträgt. Die Depolymerisationsrate in Glycerin haltigem Medium ist mit  $0,1 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$

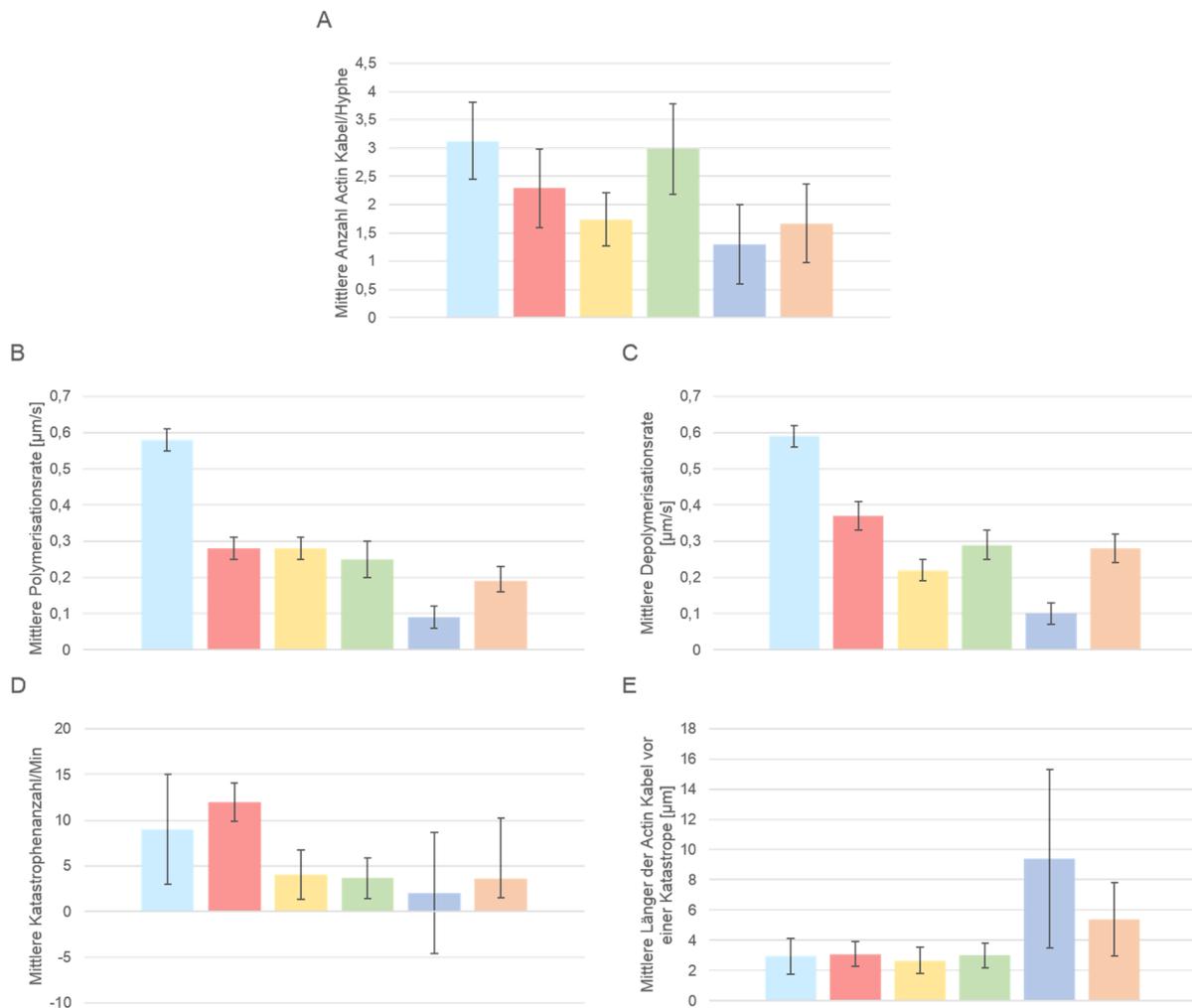
(Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 43) nur 35% von der unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) mit  $0,28 \pm 0,04 \mu\text{m/s}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, N = 52). Die Häufigkeit von Katastrophen in Glycerin haltigem Medium ist mit  $2,03 \pm 6,66$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 40) Katastrophen pro Minute um 56% gegenüber der unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) mit  $3,60 \pm 2,06$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 24) Katastrophen pro Minute herabgesenkt. Die mittlere Länge der Actinkabel vor dem Beginn einer Katastrophe ist in Glycerin mit  $9,38 \pm 5,91$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 20)  $\mu\text{m}$  um ca. 57% höher als unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) mit  $5,38 \pm 2,43$  (Mittelwert  $\pm$  SD, N = 55)  $\mu\text{m}$ . Alle diese errechneten Werte lassen die Vermutung aufkommen, dass Actinkabel, welche mit einer hohen Anzahl von Lifeact Peptiden dekoriert sind (Expression in Minimalmedium mit 2% Glycerin), im Vergleich zu Kabeln während einer niedrigeren Lifeact Expression (Herabregulation in Minimalmedium mit 2% Threonin plus 0,01% Glucose) weniger dynamisch und stabilisiert sind.

Im Vergleich waren die Elongationsraten von Lifeact-GFP Kabeln unter de-reprimierenden Konditionen 15% ( $0,09 \mu\text{m/s}$ ) derer von GFP-TpmA Kabeln ( $0,58 \mu\text{m/s}$ ) unter gleichen Bedingungen. Unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) waren die Elongationsraten von Lifeact-GFP Kabeln ( $0,19 \mu\text{m/s}$ ) in etwa ein Drittel von GFP-TpmA Kabeln in Glycerin haltigem Medium (Tabelle 2.1 und Abb. 2.10 und 2.12). Das Verhältnis der unterschiedlichen Depolymerisationsraten ist ähnlich, mit 16% der Depolymerisationsraten von GFP-TpmA ( $0,59 \mu\text{m/s}$ ) in Glycerin im Vergleich zu Lifeact-GFP ( $0,1 \mu\text{m/s}$ ) in demselben Medium und der Hälfte im Falle von Lifeact unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) ( $0,28 \mu\text{m/s}$ ) zu GFP-TpmA. Die Anzahl der Kabel pro Hyphe ist in Lifeact-GFP (1,3 Kabel pro Hyphe) unter de-reprimierenden Konditionen 60% niedriger im Vergleich zu GFP-TpmA (3,13 Kabel pro Hyphe) unter gleichen Bedingungen, jedoch in etwa die Hälfte, wenn Lifeact-GFP unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) (1,67 Kabel pro Hyphe) und GFP-TpmA in Glycerin verglichen werden. Die Katastrophenrate von GFP-TpmA Kabeln in Glycerin Medium (9,0 Katastrophen pro Minute) ist circa 80% höher als die von Lifeact-GFP Kabeln unter denselben Bedingungen (2,03 Katastrophen pro Minute). Dieser Phänotyp kann mit Hilfe der Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) teilweise wiederhergestellt werden (3,60 Katastrophen). Die mittlere Länge der Kabel vor Eintreten einer Katastrophe war in Lifeact-GFP unter Herabregulation der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) ( $5,38 \mu\text{m}$ ) gegenüber GFP-TpmA in Glycerin ( $2,94 \mu\text{m}$ ) um die Hälfte erhöht, wohingegen sie um 70% anstieg, wenn Lifeact-GFP in Glycerin ( $9,38 \mu\text{m}$ ) untersucht wurde. Unter den herabregulierenden Bedingungen der Expression (2% Threonin plus 0,01% Glucose) hatten die Hyphen des GFP-TpmA exprimierenden Stammes keinen Phänotyp oder Wachstumsdefekt, dennoch war das Signal im ganzen Cytoplasma verteilt und es war nicht

möglich spezialisierte Actinstrukturen zu beobachten (Abb. 2.6). Dieser Vergleich zwischen Lifeact und TpmA weist stark daraufhin, dass Lifeact einen generellen Stabilisierungseffekt auf Actinkabel haben könnte und dass durch die Regulierung der Expression der Phänotyp der Überexpression, zumindest teilweise, wieder hergestellt werden kann.

**Tabelle 2.1: Quantifizierung der Actindynamik in *A. nidulans*.**

	<i>alcA(p)::tpmA::gfp</i> 2% Gly	<i>alcA(p)::tpmA::gfp</i> 2% Thr	<i>tpmA(p)::tpmA::gfp</i> 2% Gly	<i>(tpmA(p)::tpmA::gfp</i> 2% Thr	<i>alcA(p)::Lifeact::gfp</i> 2% Gly	<i>alcA(p)::Lifeact::gfp</i> 2% Thr + 0,01% Glc
<b>Mittlere Anzahl Kabel/Zelle</b>	3,13 ± 0,68 (Mittelwert ± SD, N=72)	2,29 ± 0,69 (Mittelwert ± SD, N=16)	1,74 ± 0,44 (Mittelwert ± SD, N=40)	2,98 ± 0,8 (Mittelwert ± SD, N=13)	1,3 ± 0,7 (Mittelwert ± SD, N=29)	1,67 ± 0,7 (Mittelwert ± SD, N=15)
<b>Mittlere Polymerisationsrate</b>	0,58 ± 0,03 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=76)	0,28 ± 0,03 µm/s µm/s (Mittelwert ± SEM, N=11)	0,28 ± 0,04 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=46)	0,25 ± 0,05 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=23)	0,09 ± 0,03 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=37)	0,19 ± 0,04 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=44)
<b>Mittlere Depolymerisationsrate</b>	0,59 ± 0,03 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=100)	0,37 ± 0,04 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=17)	0,22 ± 0,03 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=61)	0,29 ± 0,04 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=29)	0,1 ± 0,03 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=43)	0,28 ± 0,04 µm/s (Mittelwert ± SEM, N=52)
<b>Mittlere Katastrophenfrequenz/min</b>	9,00 ± 6,04 (Mittelwert ± SD, N=69)	11,98 ± 2,08 (Mittelwert ± SD, N=14)	4,0 ± 2,71 (Mittelwert ± SD, N=41)	3,64 ± 2,21 (Mittelwert ± SD, N=20)	2,03 ± 6,66 (Mittelwert ± SD, N=40)	3,60 ± 2,06 (Mittelwert ± SD, N=24)
<b>Mittlere Länge vor Katastrophe</b>	2,94 ± 1,19 µm (Mittelwert ± SD, N=108)	3,08 ± 0,82 (Mittelwert ± SD, N=17)	2,66 ± 0,85 (Mittelwert ± SD, N=60)	2,98 ± 0,8 (Mittelwert ± SD, N=28)	9,38 ± 5,91 (Mittelwert ± SD, N=20)	5,38 ± 2,43 (Mittelwert ± SD, N=55)



**Abbildung 2.24: Visualisierung der Werte der Actindynamik in *A. nidulans* aus Tabelle 2.1. Visualisierung der Werte aus Tabelle 2.1.** Die Farben korrespondieren dabei (hellblau: *alcA(p)::tpmA::gfp* 2% Gly, rot: *alcA(p)::tpmA::gfp* 2% Thr, gelb: *tpmA(p)::tpmA::gfp* 2% Gly, grün: *tpmA(p)::tpmA::gfp* 2% Thr, mittelblau: *Lifeact::gfp* 2% Gly und orange: *Lifeact::gfp* 2% Thr + 0,01% Glc). Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen beziehungsweise Standardfehler an. **A:** Mittlere Anzahl der Kabel pro Hyphe. **B:** Mittlere Polymerisationsrate in  $\mu\text{m/s}$ . **C:** Mittlere Depolymerisationsrate in  $\mu\text{m/s}$ . **D:** Mittlere Katastrophenfrequenz pro Minute **E:** Mittlere Länge der Actinkabel vor einer Katastrophe in  $\mu\text{m}$ .

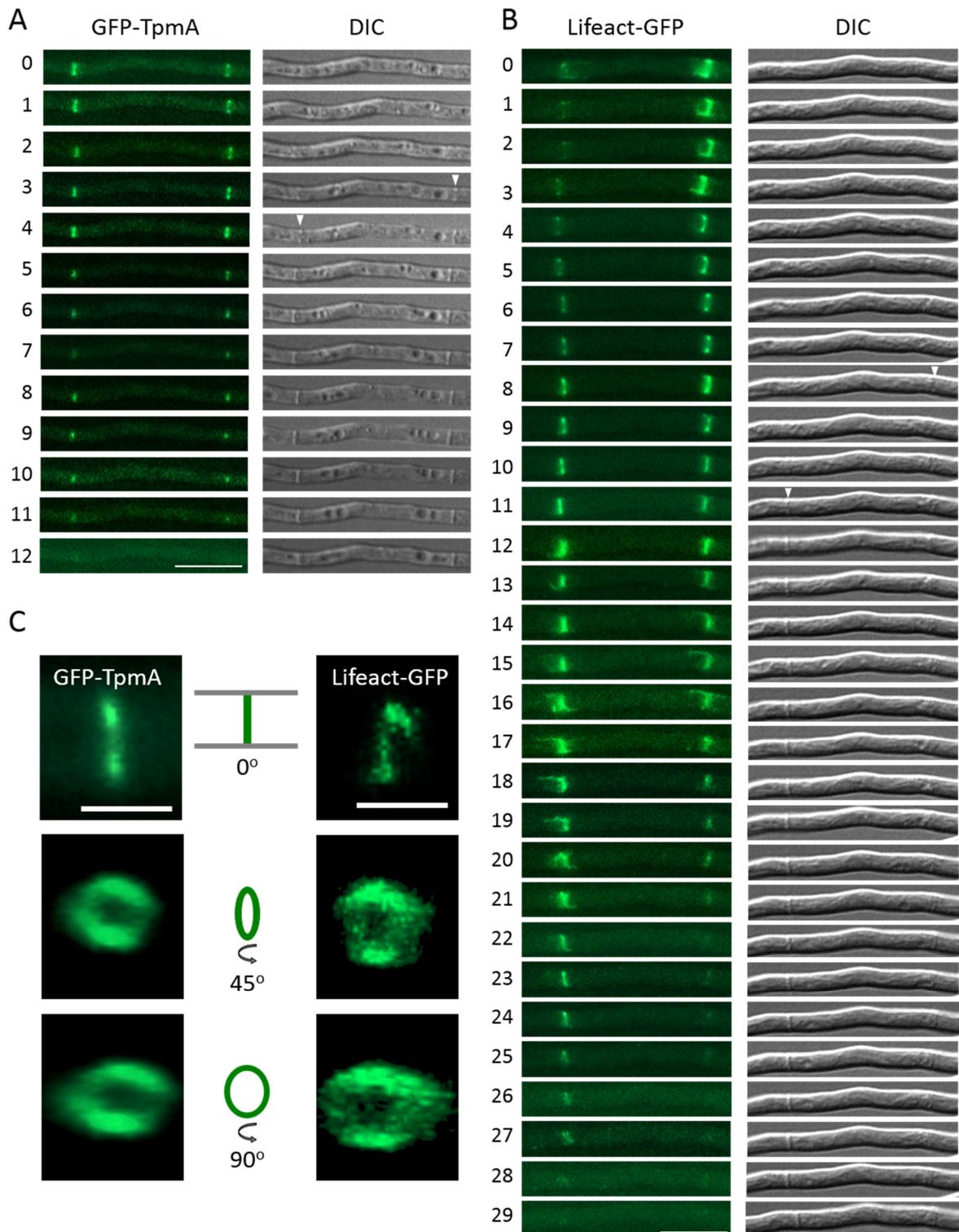
## 2.4 Actin Lokalisierung während der Septierung

Die Rolle und die Lokalisation des Actincytoskeletts bei der Septierung wurden bereits untersucht (Harris, 2001, Delgado-Alvarez *et al.*, 2014). Es ist bekannt, dass das Schrumpfen des Actinomyosin Rings, welcher von Actinfilamenten und Myosin II gebildet wird, dem Prozess der Septierung angehört (Taheri-Talesh *et al.*, 2012). Im folgenden Abschnitt soll die sich verändernde Lokalisation von Actin während der Septierung mit Hilfe von GFP-TpmA und Lifeact-GFP beschrieben werden (Abb. 2.25). Dies sollte Aufschluss über einen möglichen Stabilisierungseffekt von Lifeact-GFP auf Actinstrukturen innerhalb des Actinrings geben.

Im Zuge dessen wurden GFP-TpmA und Lifeact-GFP unter der Kontrolle des *alcA* Promoters unter de-reprimierenden Bedingungen exprimiert. GFP-TpmA lokalisierte im Actin-Ring, bevor

ein Septum im DIC Kanal beobachtet werden konnte (Abb. 2.25 A). Sobald das Septum im DIC Kanal detektiert werden konnte, fing der Actinring an zu schrumpfen um dann letztendlich nach circa 10 Minuten nach der Beobachtung des Septums im DIC Kanal gänzlich zu verschwinden (Abb. 2.25 A). Lifeact-GFP lokalisierte ebenfalls im Actin-Ring, bevor ein Septum im DIC Kanal beobachtet werden konnte (Abb. 2.25 B). Nachdem das Septum im DIC Kanal gesehen werden konnte, wurden Actinkabel, die aus dem Ring heraus ragten, beobachtet. Diese wurden nicht beobachtet, wenn GFP-TpmA zur Visualisierung verwendet wurde. Der via Lifeact-GFP visualisierte Actin-Ring war für ca. 5-10 Minuten statisch, fing an zu schrumpfen und verschwand nach 15-20 Minuten nach der Detektion des Septums im DIC Kanal gänzlich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lifeact-GFP länger im Actin-Ring lokalisiert als GFP-TpmA und komplexere Strukturen formt, wie die Actinkabel aus dem Ring heraus. Mit dem Wissen, dass Lifeact Kabel an der Hyphenspitze stabilisiert, könnte der Unterschied zwischen TpmA und Lifeact während der Septierung daher stammen, dass Lifeact einen artifiziellen Effekt auf Actinfilamente hat.

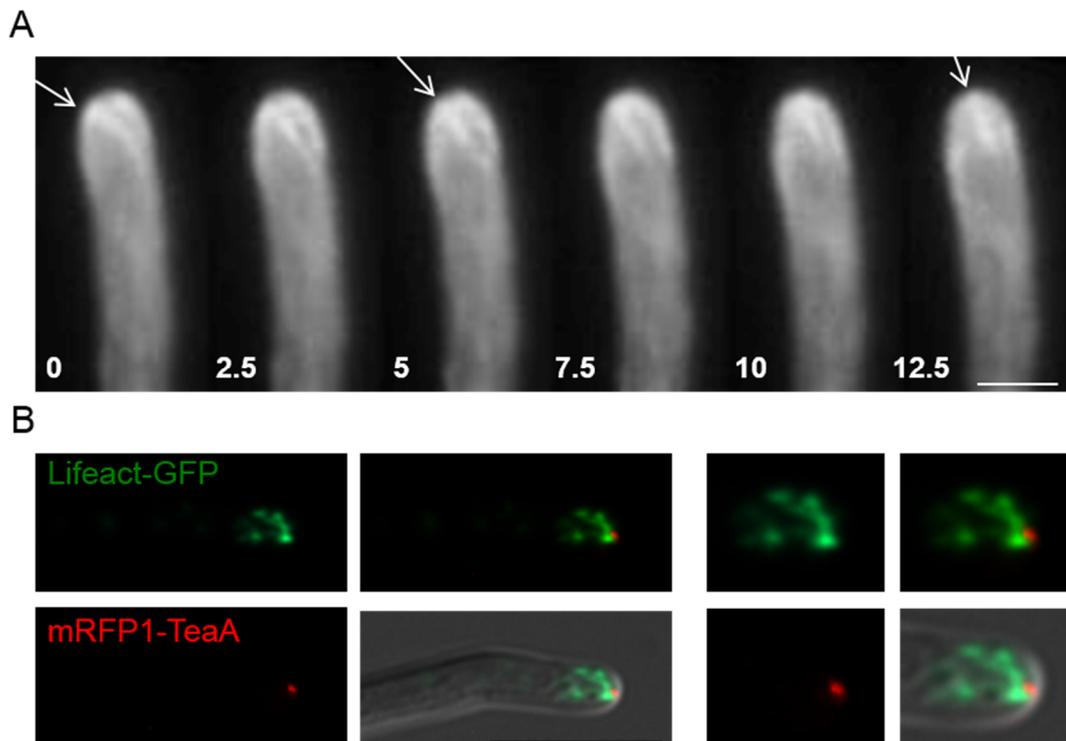
Mit Hilfe der Zen Software (Zeiss) wurde eine 3D Rekonstruktion der mit GFP-TpmA und Lifeact-GFP visualisierten Actinringe angefertigt (Abb. 2.25 C). Diese wurde in Aufsicht, 45° Drehung und 90° Drehung konstruiert. Dabei fiel auf, dass die Rekonstruktion des mit Lifeact-GFP visualisierten Actinrings nicht perfekt rund war, was durch die herauswachsenden Actinkabel begründet sein könnte.



**Abbildung 2.25: Lokalisation des Actinrings während der Septierung, visualisiert mit Lifeact-GFP oder GFP-TpmA. A:** Bildsequenz der Lokalisation des Actinrings visualisiert mit Hilfe von GFP-TpmA. GFP-TpmA lokalisierte in einem Actinring, bevor ein Septum im DIC Kanal detektiert werden konnte. Wenn das Septum im DIC Kanal sichtbar wurde, begann der Actinring zu schrumpfen und verschwand letztendlich vollständig nach circa zehn Minuten. Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ . Zeit in Minuten. **B:** Bildsequenz der Lokalisation des Actinrings visualisiert mit Hilfe von Lifeact-GFP. Lifeact-GFP lokalisierte ebenfalls in einem Actinring, bevor ein Septum im DIC Kanal detektiert werden konnte. Wenn das Septum im DIC Kanal sichtbar wurde, begannen Actinkabel aus dem Ring heraus zu ragen. Der Ring veränderte seine Größe für eine Weile nicht (5-10 Minuten). Nach circa zehn Minuten begann der Actinring zu schrumpfen und verschwand letztendlich vollständig nach circa zwanzig Minuten. Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ . Zeit in Minuten. **C:** 3D Rekonstruktion des Actinrings. Links GFP-TpmA, rechts Lifeact-GFP. Oben Aufsicht auf den Actinring, Mitte 45° Drehung der 3D Rekonstruktion und Unten 90° Drehung der 3D Rekonstruktion.

## 2.5 Co-Lokalisation von Actinkabel-Plusenden mit dem Zellendmarker TeaA

Actinfilamente werden an ihren Plusenden, die nahe der Plasmamembran sind, von Formin polymerisiert (Goode & Eck, 2007). Das Plusende von Actinkabeln wurde als ein Punkt mit hoher optischer Dichte am Kortex der Hyphe beobachtet. Das Plusende bewegte sich manchmal entlang der apikalen Membran (Abb. 2.26 A). Eine co-Lokalisierung und indirekte Interaktion des Zellendmarkers TeaA und des Formins SepA konnte bereits gezeigt werden (Takeshita *et al.*, 2008, Higashitsuji *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass TeaA für die Lokalisierung von SepA am Apex der Hyphenspitze notwendig ist (Takeshita *et al.*, 2013). Zur Untersuchung des Zusammenhangs der Lokalisierung von TeaA und Actinkabel-Plusenden, wurde ein Stamm konstruiert, welcher Lifeact-GFP und mRFP1-TeaA co-exprimierte. mRFP1-TeaA akkumulierte am Apex der Hyphenspitzen, wo auch der Ursprung des Actinkabel Netzwerkes lokalisierte (Abb. 2.26 B). Die beobachtete co-Lokalisation wird von der zuvor beobachteten co-Lokalisation von TeaA und SepA unterstützt.



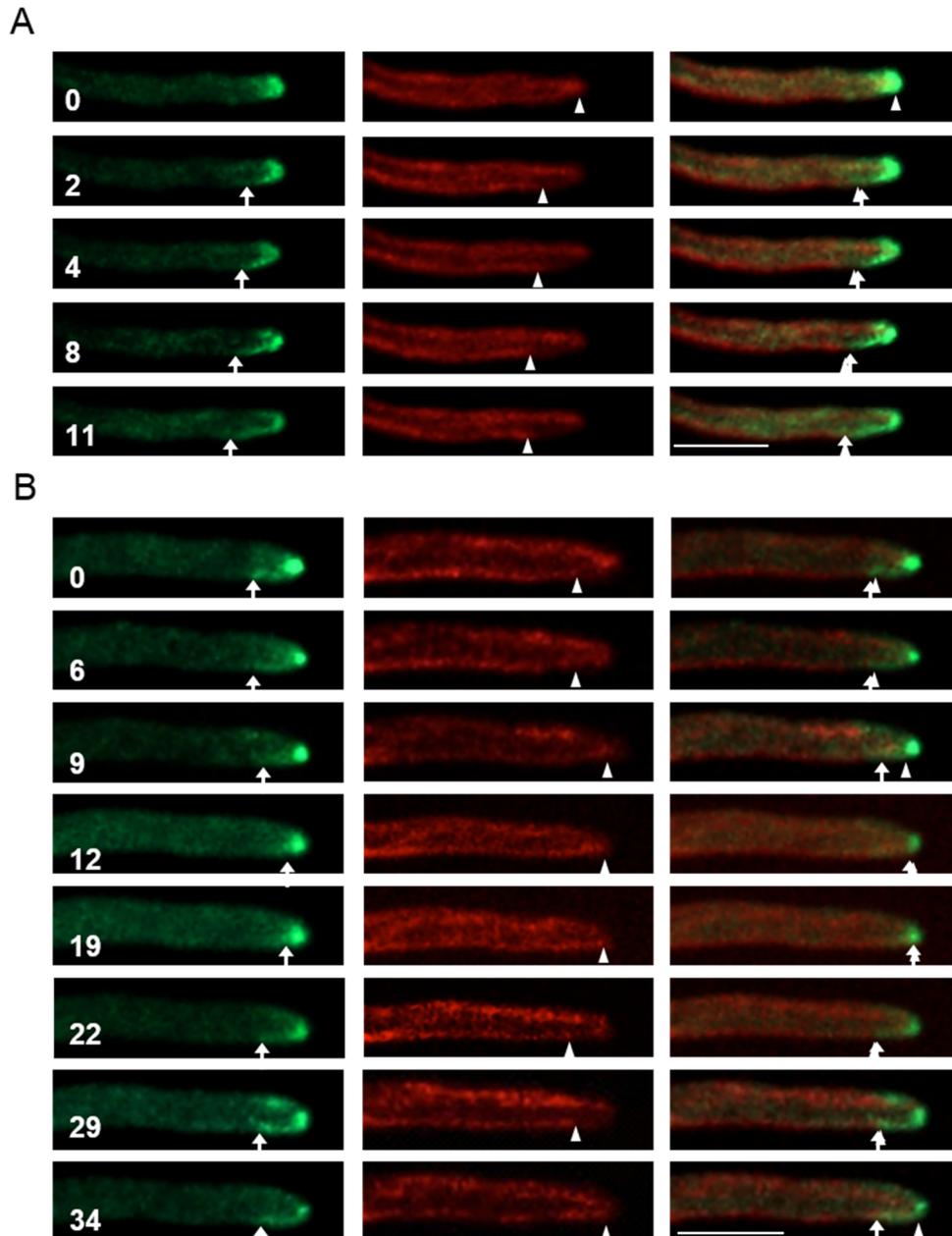
**Abbildung 2.26: Co-Lokalisation von Actinkabeln und dem Zellendmarker TeaA.** **A:** Bildsequenz eines Actinkabels visualisiert mit GFP-TpmA, welches sich entlang der apikalen Membran bewegt. Pfeile zeigen die Lokalisierung des Plusendes des Actinkabels. Maßstabsbalken 2  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden. **B:** co-Expression von Lifeact-GFP und mRFP1-TeaA zur co-Lokalisation von Actinkabeln und dem Zellendmarker TeaA. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass der Ursprung des Actin Netzwerkes, welches durch Lifeact-GFP visualisiert wurde, mit der Akkumulation des Zellendmarkers TeaA an der Hyphenspitze übereinstimmt. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ .

## 2.6 Zusammenhang der Dynamik des Actin- und des Mikrotubuli Cytoskeletts

Das funktionale Zusammenspiel der Actin- und Mikrotubuli-Cytoskelette ist ausschlaggebend für das polare Wachstum der Hyphen filamentöser Pilze (Takeshita *et al.*, 2014). Zur Untersuchung des Zusammenhangs von Actinkabeln und Mikrotubuli (MT) wurde ein Stamm, welcher GFP-TpmA und mCherry-TubA ( $\alpha$ -Tubulin) exprimiert, konstruiert. Dieser wurde für *spinning disk* Konfokal Mikroskopie Experimente genutzt. Diese Mikroskopie Methode wurde gewählt, da sie eine höhere zeitliche Auflösung von Zweikanal Aufnahmen ermöglicht. Mikrotubuli haben eine Dynamik, die sich in Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation zeigt. Im Bereich der Hyphenspitze polymerisieren die Mikrotubuli in Richtung der Spitze, erreichen den apikalen Kortex, verbleiben dort kurzzeitig und depolymerisieren schlussendlich.

In Abbildung 2.27 A erreichen zwei Mikrotubuli den apikalen Kortex zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Einer der beiden Mikrotubuli depolymerisierte und das Plusende verblieb einige Mikrometer hinter der Hyphenspitze ( $t = 2s$ , Pfeilspitze). Direkt nach der Depolymerisation wurde ein Actinkabel gebildet. Das Plusende des Actinkabels näherte sich dem Plusende des Mikrotubulus ( $t = 8 - 11s$ ). Eine kurzzeitige Überlappung der Plusenden beider Komponenten des Cytoskeletts konnte dabei beobachtet werden.

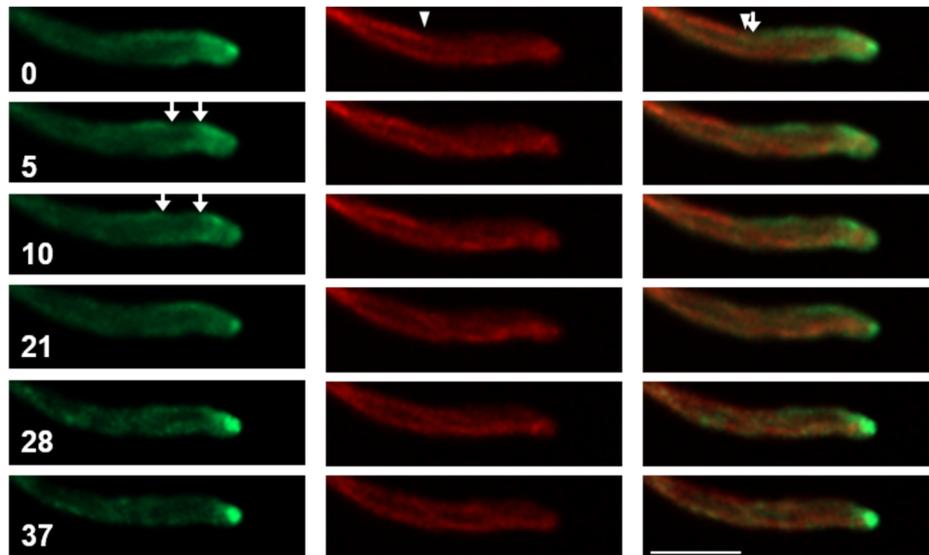
Ein ähnliches Phänomen ist in Abbildung 2.27 B dargestellt. Als das Mikrotubuli Plusende anfangs von der Mikrotubulus-Actin Brücke zu polymerisieren, begann das Actinkabel in Richtung der Hyphenspitze zu schrumpfen (Abb. 2.26 B,  $t = 0 - 12 s$ ). Während der Phase in der das Mikrotubuli Plusende den apikalen Kortex berührte, wurden keine Actinkabel polymerisiert ( $t = 12 - 19 s$ ). Als der Mikrotubulus vom Hyphen Kortex aus zu depolymerisieren begann und das Mikrotubuli Plusende schließlich einige Mikrometer hinter der Spitze lokalisierte, wurden neue Kabel in Richtung des Mikrotubuli Plusendes polymerisiert ( $t = 22 - 29 s$ ). Als das Mikrotubuli Plusende erneut von der Mikrotubulus-Actin Brücke begann zu polymerisieren, blieb das Actinkabel intakt und der Mikrotubulus elongierte an ihm entlang ( $t = 29 - 34 s$ ).



**Abbildung 2.27: Co-Expression von GFP-TpmA und mCherry-TubA zur co-Lokalisierung von Actin und Mikrotubuli. Bildsequenz der co-Lokalisierung von Actin und Mikrotubuli. Pfeile zeigen das Ende eines Actinkabels. Pfeilspitzen markieren das Plusende eines Mikrotubulus. A:** Zu Zeitpunkt 0 berühren zwei Mikrotubuli den apikalen Kortex. Einer der beiden depolymerisierte und verweilte einige  $\mu\text{m}$  hinter der Hyphenspitze ( $t = 2$ ). Zeitgleich mit der Depolymerisation des Mikrotubulus begann die Polymerisation eines Actinkabels. Das Ende des Actinkabels berührte das Plusende des Mikrotubulus ( $t = 8-11$  s). Ein kurzzeitiges Überlappen der beiden Cytoskelette konnte beobachtet werden. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden. **B:** Zum Zeitpunkt 0 konnte ein Überlappen der Cytoskelette beobachtet werden. Als der Mikrotubulus zu polymerisieren begann ( $t = 0-12$  s), depolymerisierte das Actinkabel in Richtung Hyphenspitze. Während des Zeitraums, in dem der Mikrotubulus den apikalen Kortex berührte, konnten keine Actinkabel beobachtet werden ( $t = 12-19$  s). Als der Mikrotubulus zu depolymerisieren begann, wurde ein neues Actinkabel gebildet ( $t = 22-29$  s), was schlussendlich zu einem erneuten Überlappen beider Strukturen führte. Als der Mikrotubulus erneut begann zu polymerisieren, blieb das Actinkabel intakt und der Mikrotubulus elongierte entlang des Actinkabels ( $t = 29-34$ ). Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden.

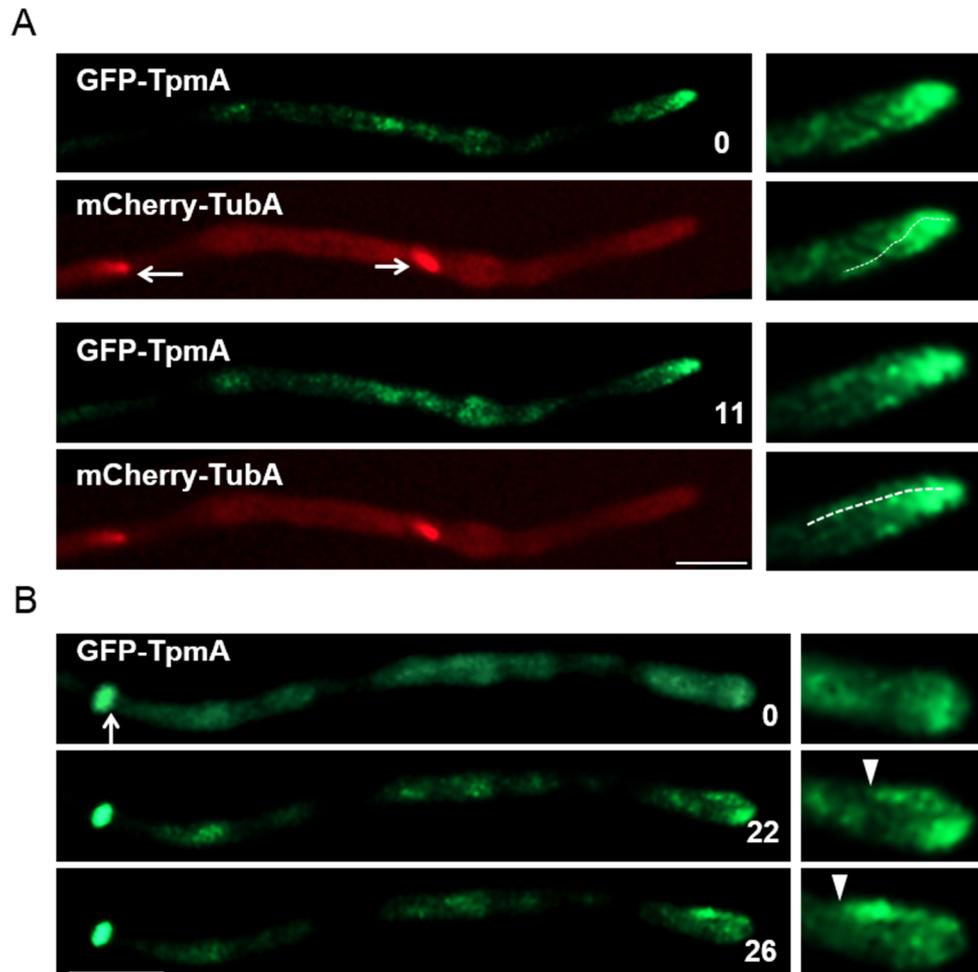
Zusätzlich zur normalen Depolymerisation der Actinkabel, konnte gelegentlich beobachtet werden, dass sehr lange Actinkabel in zwei geteilt wurden (Abb. 2.28). Der Teil des Kabels, der an der Hyphenspitze lokalisierte begann daraufhin zu depolymerisieren. Wohingegen der

andere Teil des gekappten Kabels entlang der Mikrotubuli in distale Bereiche der Hyphe transportiert wurde.



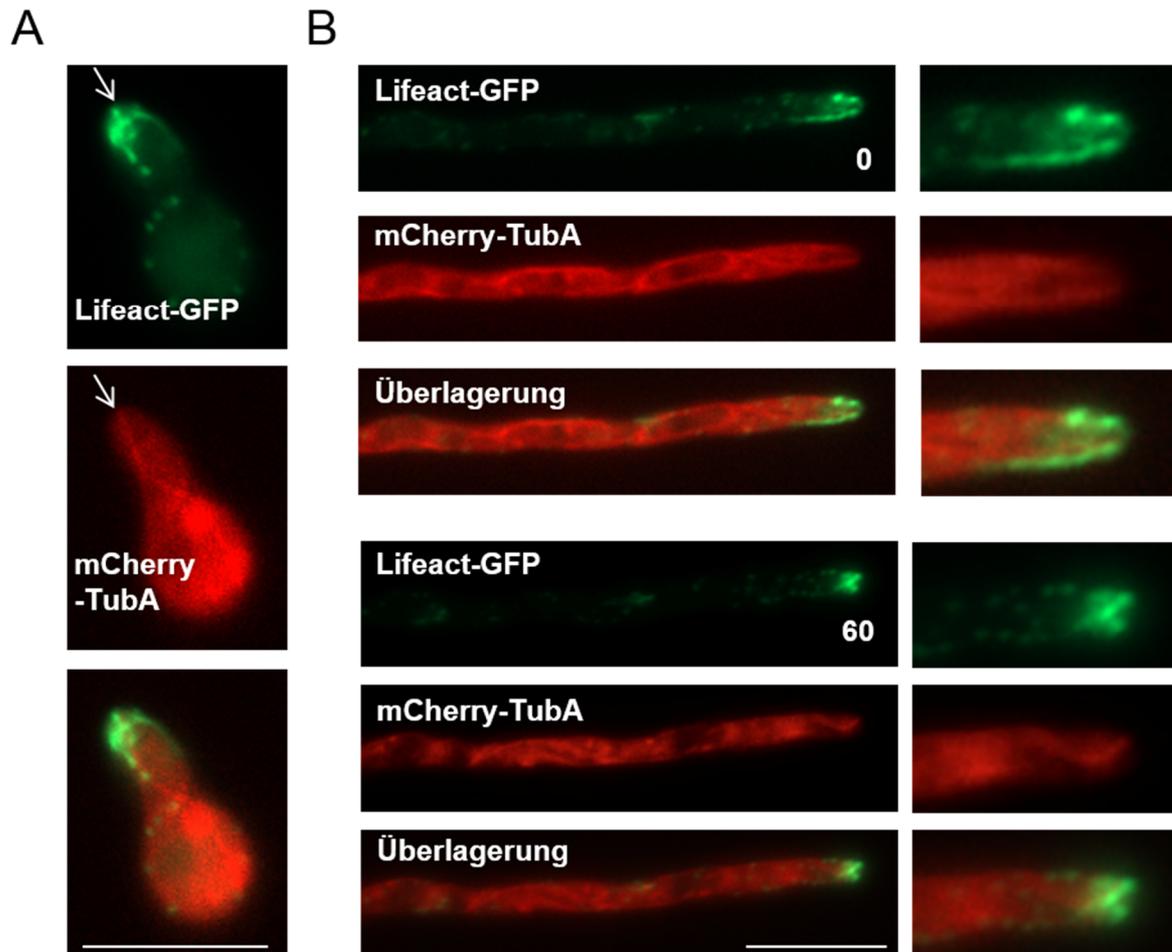
**Abbildung 2.28: Co-Expression von GFP-TpmA und mCherry-TubA zur co-Lokalisierung von Actin und Mikrotubuli. Bildsequenz der co-Lokalisation von Actin und Mikrotubuli.** Pfeile zeigen das Ende eines Actinkabels. Pfeilspitzen markieren das Plusende eines Mikrotubulus. Zu Zeitpunkt 5 ist zu erkennen, wie sich ein sehr langes Actinkabel teilt. Die an der Spitze gelegene Hälfte depolymerisiert daraufhin. Die andere Hälfte wird über den Mikrotubulus in hintere Bereiche der Hyphe transportiert. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden.

In der Bäckerhefe und der Spaltheife ist die Organisation des Actincytoskeletts vom Zellzyklus abhängig (Mishra *et al.*, 2014). In *A. nidulans* konnten Actinkabel, welche mit GFP-TpmA visualisiert wurden, auch während der Mitose an der Hyphenspitze beobachtet werden (Abb. 2.29). Die Dynamik der Kabel war hierbei ähnlich zu der in Interphase Zellen. Dies ist im Einklang mit der Erkenntnis, dass die Wachstumsrate der Hyphen keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Interphase und Mitose aufweist (Riquelme *et al.*, 2003).



**Abbildung 2.29: Co-Expression von GFP-TpmA und mCherry-TubA zur co-Lokalisierung von Actin und Mikrotubuli während der Mitose und der Septierung.** **A:** Bildsequenz der co-Lokalisierung von Actin und Mikrotubuli während der Mitose. Weiße Pfeile zeigen die Lokalisation der Mitosespindeln. Gestrichelte Linien zeigen die Lokalisation von Actinkabeln in der Vergrößerung. Sogar während der Mitose sind an der Spitze der Hyphe dynamische Actinkabel detektierbar. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden. **B:** Bildsequenz der co-Lokalisierung von Actin und Mikrotubuli während der Septierung. Weiße Pfeile zeigen die Lokalisation der Septen. Weiße Pfeilspitzen zeigen das Ende eines Actinkabels in der Vergrößerung. Auch während der Septierung konnten dynamische Actinkabel an der Hyphenspitze beobachtet werden. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ . Zeit in Sekunden.

Zusätzlich wurde ein Stamm konstruiert, welcher Lifeact-GFP und mCherry-TubA unter Kontrolle des *alcA* Promotors exprimiert. Unter de-reprimierenden Bedingungen zeigte Lifeact-GFP ein statisches Actinkabel Netzwerk, während die Mikrotubuli eine normale Dynamik aufwiesen. Wenn die Mikrotubuli in Richtung des apikalen Kortex wuchsen, erreichten die Plusenden den Ursprung des Actinkabel Netzwerks (Abb. 2.30 A). Darüber hinaus elongierten die Kabel entlang der Mikrotubuli, was in einem Überlappen von Actinkabeln und Mikrotubuli resultierte (Abb. 2.30 B).

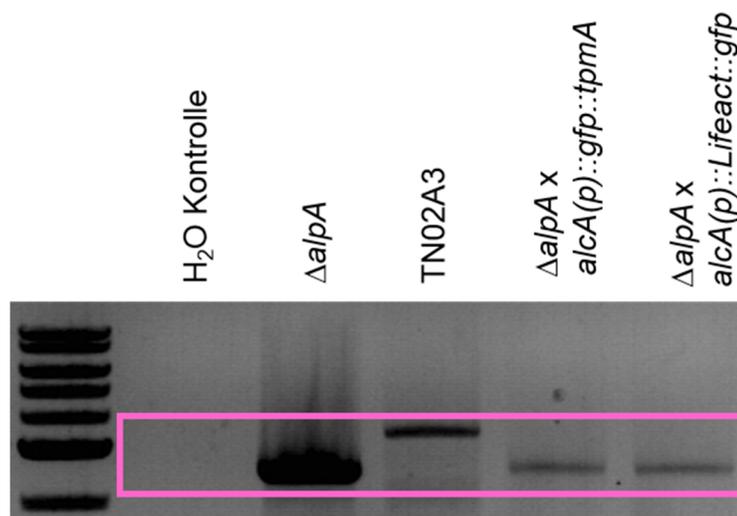


**Abbildung 2.30: Co-Expression von Lifeact-GFP und mCherry-TubA zur co-Lokalisierung von Actin und Mikrotubuli.** **A:** co-Lokalisierung von Lifeact-GFP und mCherry-TubA in einem jungen *A. nidulans* Keimschlauch. Der weiße Pfeil zeigt den Punkt am Apex an, in dem der Mikrotubulus die Plasmamembran berührt. Dieser ist identisch mit dem Ursprung des von Lifeact-GFP visualisierten Actin Netzwerks. Maßstabsbalken 5  $\mu$ m. **B:** co-Lokalisierung von Lifeact-GFP und mCherry-TubA in einer ausgewachsenen *A. nidulans* Hyphe. Die co-Lokalisierung zeigt ein dynamisches Mikrotubuli Cytoskelett und stabile, nicht dynamische Actin Strukturen. Diese überlappen, wie in der Vergrößerung zu sehen, teilweise. Maßstabsbalken 5  $\mu$ m. Zeit in Sekunden.

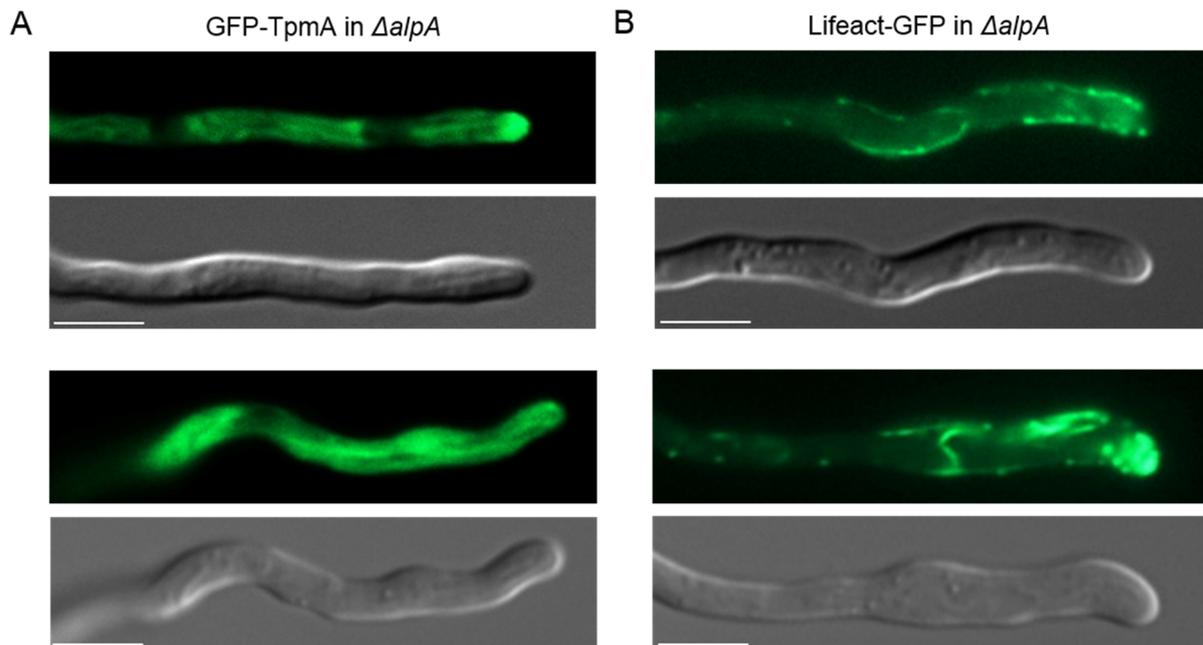
## 2.7 Actinkabel im Mikrotubuli-Polymerase Deletionsstamm und unter Behandlung mit Benomyl

Aufgrund der Beobachtung, dass die Elongation von Actinkabeln und Mikrotubuli in Beziehung zueinander stehen (Abschnitt 2.6, Abb. 2.27 und 2.28), wurde die Organisation der Actinkabel in Stämmen untersucht, welche eine Deletion der *alpA* Mikrotubuli-Polymerase aufwiesen. Diese Stämme wurden mit Hilfe von Kreuzungen generiert. Die Stämme wurden aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zum *alpA* Deletionsstamm ausgewählt und mit Hilfe einer analytischen PCR überprüft. Hierzu wurde die genomische DNA des ursprünglichen *alpA* Deletionsstammes, des Wildtyps TN02A3 und der Actin exprimierenden Stämme im Deletionshintergrund präpariert. Auf diese wurde eine PCR mit Hilfe der Primer *AlpA\_nested\_fw* und *AlpA\_nested\_rev* durchgeführt, welche den *open reading frame* des *alpA* Gens amplifizierte. Diese zeigte dieselbe Bandengröße für den Deletionsstamm und die

Kreuzungen, wobei die Bande im Wildtyp eine andere Größe hatte (Abb. 2.31). Deshalb kann es als erwiesen angesehen werden, dass die Kreuzungen kein funktionsfähiges AlpA mehr herstellen können. Diese Deletion führt zu einem Defekt in der Mikrotubuli Organisation. AlpA ist ein Ortholog zur XPMA215 Familie, die als Mikrotubuli Polymerasen fungieren und die Addition von Tubulin Dimeren an das wachsende Ende der Mikrotubuli katalysiert (Brouhard *et al.*, 2008, Takeshita *et al.*, 2014). Im Deletionsstamm konnten nur ein oder zwei verdickte Mikrotubuli Filamente in einem Kompartiment zwischen zwei Septen oder zwischen der Hyphenspitze und einem Septum beobachtet werden (Enke *et al.*, 2007). Dieser Mikrotubulus zeigte keine offensichtliche Dynamik (Takeshita *et al.*, 2013). Im *alpA* Deletionsstamm konnte mit Hilfe von GFP-TpmA mitunter ein sehr langes Actinkabel (länger als 10  $\mu\text{m}$ ) visualisiert werden (Abb. 2.32 A). Dieses schien stabiler zu sein und zeigte keine klaren Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation, was niemals für die Wildtyp Kontrolle beobachtet werden konnte. Für den Fall der Visualisierung der Actinkabel mit Lifeact-GFP war dies ebenfalls der Fall (Abb. 2.32 B).

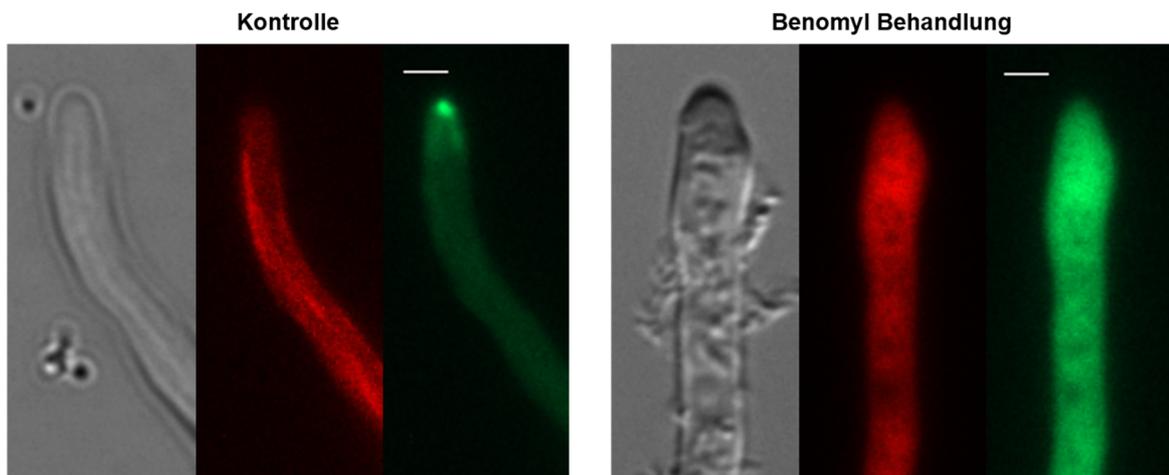
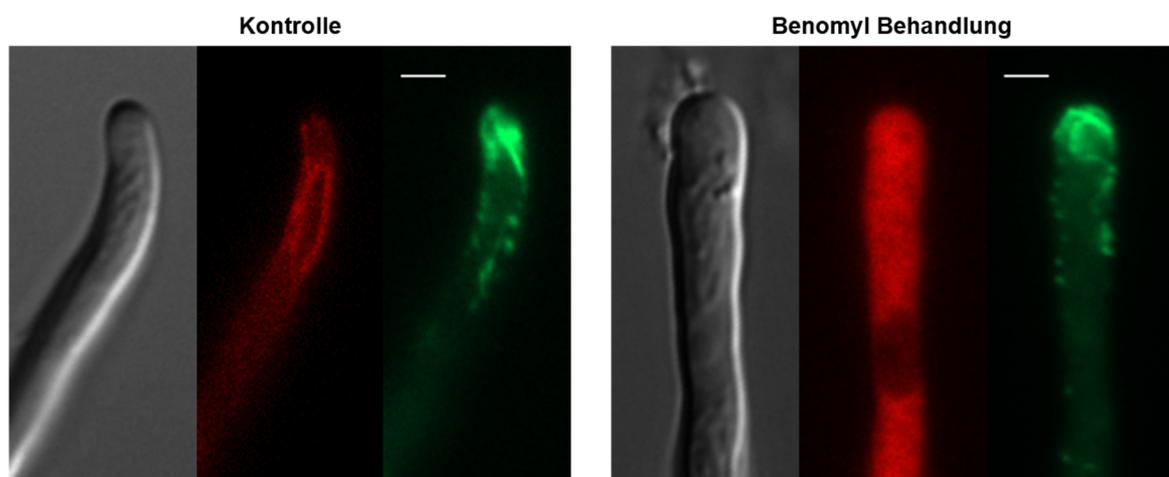


**Abbildung 2.31: Analytische PCR der Lifeact-GFP beziehungsweise GFP-TpmA exprimierenden Stämme im *alpA* Deletionshintergrund.** Genomische DNA wurde vom Ursprungsstamm, dem Wildtyp TN02A3 und den beiden Actin Stämmen im Deletionshintergrund präpariert. Auf diese wurde eine PCR mit den Primern *AlpA\_nested\_fw* und *AlpA\_nested\_rev* durchgeführt. Die beiden Actin Marker exprimierenden Stämme weisen hierbei eine Bande auf derselben Höhe, wie der ursprüngliche *alpA* Deletionsstamm auf, wohingegen der Wildtyp TN02A3 eine andere Bandenhöhe aufweist.



**Abbildung 2.32: Actin Lokalisierung in Mikrotubuli Polymerase Deletionsstämmen.** **A:** GFP-TpmA im *alpA* Deletionshintergrund. In diesem Stamm konnten sehr lange Actinkabel detektiert werden. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ . **B:** Lifeact-GFP im *alpA* Deletionshintergrund. Hier konnten ebenfalls sehr lange Actin Strukturen beobachtet werden. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ .

Zur genaueren Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit zwischen den Mikrotubuli- und Actin-Cytoskeletten wurden Stämme, welche sowohl Actin als auch Mikrotubuli visualisieren, mit Benomyl behandelt (Abb. 2.33). In den Kontrollstämmen, welche nicht behandelt wurden, konnte eine normale Organisation der Mikrotubuli beobachtet werden. Der mCherry-TubA x lifeact-GFP co-exprimierende Stamm zeigte dabei das typische Actin Netzwerk mit langen Kabeln an der Hyphenspitze, wohingegen der mCherry-TubA x *alcA(p)* GFP-TpmA co-exprimierende Stamm die typischen kurzen Kabel an der Hyphenspitze aufwies (Abb. 2.33). Benomyl ist ein anti-Mikrotubuli Wirkstoff, welcher Mikrotubuli depolymerisiert. Dadurch werden die Nuclei in der Mitose arretiert, das Wachstum von Keimschläuchen ist jedoch nicht beeinflusst (Orr & Rosenberger, 1976, Oakley & Morris, 1980, Sheir-Neiss *et al.*, 1978). Nach zehnminütiger Behandlung der Hyphen mit einer 1  $\mu\text{M}$  Benomyl Lösung war in beiden Stämmen das Mikrotubuli Cytoskelett aufgelöst (Abb. 2.33). Das durch GFP-TpmA visualisierte Actincytoskelett war nach dieser Zeit der Behandlung ebenfalls zersetzt (Abb. 2.33 A). Das durch Lifeact-GFP visualisierte Actincytoskelett hingegen war noch nach einer Stunde Benomyl Behandlung intakt (Abb. 2.33 B).

**A** *alcA(p)* GFP-TpmA x mCherry-TubA**B** Lifeact-GFP x mCherry-TubA

**Abbildung 2.33: Actin und Mikrotubuli Lokalisation in co-Expressionsstämmen von Lifeact-GFP beziehungsweise GFP-TpmA und mCherry-TubA unter der Behandlung des Mikrotubuli Destabilisators Benomyl.** Die Stämme wurden in Minimalmedium mit 2% Glycerin über Nacht bei 28°C auf Deckgläschen angezogen. Die Kontrollen wurden nicht behandelt. Die Benomylbehandlung erfolgte mit einer 1 µg/ml konzentrierten Benomyl-Lösung. **A:** Unter Kontrollbedingungen konnten normale Actin und Mikrotubuli Strukturen im co-Expressionsstamm GFP-TpmA x mCherry-TubA beobachtet werden. Nach zehn minütiger Benomyl Behandlung waren sowohl das Actin als auch das Mikrotubuli Cytoskelett zerstört. Maßstabsbalken 1 µm. **B:** Unter Kontrollbedingungen konnten auch im Lifeact-GFP x mCherry-TubA co-Expressionsstamm normale Actin und Mikrotubuli Strukturen detektiert werden. Nach zehn minütiger Benomyl Behandlung war das Mikrotubuli Cytoskelett zerstört, das Actincytoskelett jedoch intakt. Maßstabsbalken 1 µm.

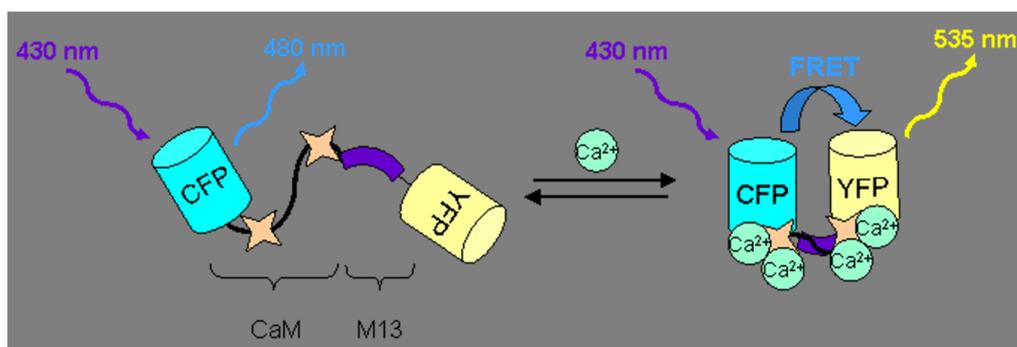
## 2.8 Ca<sup>2+</sup> Oszillationen visualisiert mit Hilfe von Cameleon

Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration ist dafür verantwortlich den Aufbau von Actin Strukturen und die Vesikel Fusion mit der Plasmamembran zu regulieren (Schneppenburger & Neher, 2005, Janmey, 1994). Zur Visualisierung der Ca<sup>2+</sup> Konzentration in lebenden Zellen wurde der FRET-basierte Calcium-Biosensor Cameleon verwendet. Dieser besteht aus Calmodulin (CaM) und dem CaM-Bindemotiv M13, welches zwischen einem Cyan- (FRET Donor) und einem Gelb- (FRET Akzeptor) fluoreszierenden Protein eingeschlossen ist. In Abwesenheit von Calcium resultiert die Anregung des CFPs in der Emission eines Cyan-farbenen

Fluoreszenzsignals. Folglich wird unter Anregung des Cyan-farbenen Donors, im Falle der Bindung von vier Calcium Molekülen, durch die resultierende Änderung in der Proteinkonformation, ein FRET Signal des gelben Akzeptors detektiert (siehe Abbildung 2.34). Dieser Biosensor wurde in verschiedenen Zelltypen erfolgreich verwendet (Nagai *et al.*, 2004). Unter Verwendung von Cameleon konnte an der Hyphenspitze einiger filamentöser Pilze eine  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillation nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2012a).

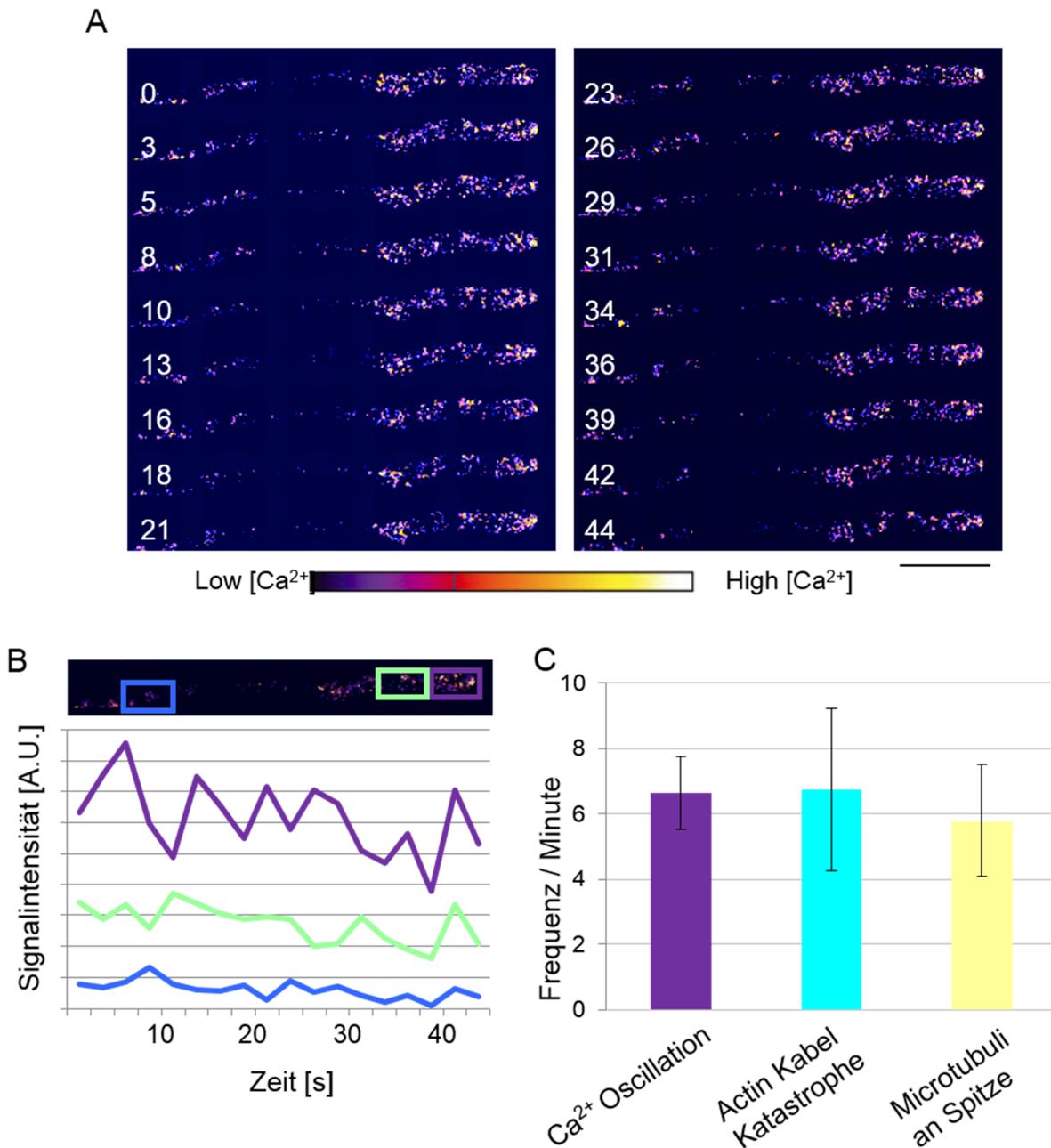
Cameleon wurde im Zuge der Visualisierung der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration in lebenden Hyphen unter dem regulierbaren *alcA* Promotor exprimiert. Die FRET Verhältnis Bilder wurden aus Denominator CFP oder YFP Bildern und Numerator FRET Bildern konstruiert (siehe auch Material und Methoden). Die FRET Experimente enthüllten eine Calcium Oszillation im Bereich der Hyphenspitze von *A. nidulans* (Abb. 2.35 A), wie sie zuvor schon in anderen filamentösen Pilzen nachgewiesen werden konnte. Die Oszillationen waren an der Hyphenspitze (Abb. 2.35 B, lila Kasten und Linie) ausgeprägter als in subapikalen Regionen (grüner Kasten und Linie) oder hinteren Regionen der Hyphe (blauer Kasten und Linie). Die Frequenz der Calcium Oszillationen an der Hyphenspitze wurde mit  $6,6 \pm 1,1$  (Mittelwert  $\pm$  SD; N = 10) berechnet.

Zur Untersuchung der Beziehung von Calcium Oszillationen und dem Actincytoskelett wurde die Katastrophen Frequenz der Actinkabel pro Hyphe und Minute aus den Daten der Actindynamik Quantifizierung für GFP-TpmA bestimmt ( $6,7 \pm 2,5$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 12). Die Frequenz des Erreichens der Spitze von Mikrotubuli pro Minute wurde in vorhergehenden Studien bestimmt ( $5,8 \pm 1,7$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 12) (Pohlmann *et al.*, 2014). Diese Daten wurden unter denselben Bedingungen erzeugt. Die Frequenz der Calcium Oszillationen, der Actinkabel Katastrophen und des Erreichens der Spitze der Mikrotubuli waren miteinander vergleichbar und zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 2.34 C).



**Abbildung 2.34: Schematischer Aufbau und Funktionsweise des FRET basierten Calcium Biosensors Cameleon.** Zur Visualisierung der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration in lebenden Zellen wurde der FRET-basierte Calcium-Biosensor Cameleon verwendet. Dieser besteht aus Calmodulin (CaM) und dem CaM-Bindemotiv (M13), welches zwischen einem Cyan (CFP, FRET Donor) und einem Gelben (YFP, FRET Akzeptor) Fluoreszenten Protein eingeschlossen ist. Folglich wird unter Anregung des cyan-farbenen Donors mit 430 nm Licht, im Falle der Bindung von Calcium, ein 535 nm FRET Signal des gelben Akzeptors detektiert.

Quelle: <http://www.embl.de/eamnet/html/calcium/imagenes/YFP.gif>



**Abbildung 2.35: Visualisierung der Ca<sup>2+</sup> Konzentration mit Hilfe des FRET basierten Calcium Biosensors Cameleon.** **A:** Bildsequenz der Messung der Ca<sup>2+</sup> Konzentration innerhalb einer *A. nidulans* Hyphe. Dunkle Farben stehen dabei für niedrige, helle Farben für hohe Konzentrationen. Maßstabsbalken 10  $\mu$ m. Zeit in Sekunden. **B:** Visualisierung der Oszillation der Ca<sup>2+</sup> Konzentration in verschiedenen Bereichen der Hyphe. Blau steht für hintere Bereiche der Hyphe, grün für subapikale Bereiche und lila für die Hyphenspitze. Die Oszillation war an der Spitze am meisten ausgeprägt. **C:** Darstellung der Frequenz pro Minute der Ca<sup>2+</sup> Oszillation, der Actinkabel Katastrophe und des Erreichens der Mikrotubuli der Spitze.

## 2.9 Der Actinring und der Zellendmarker TeaR in Septinmutanten

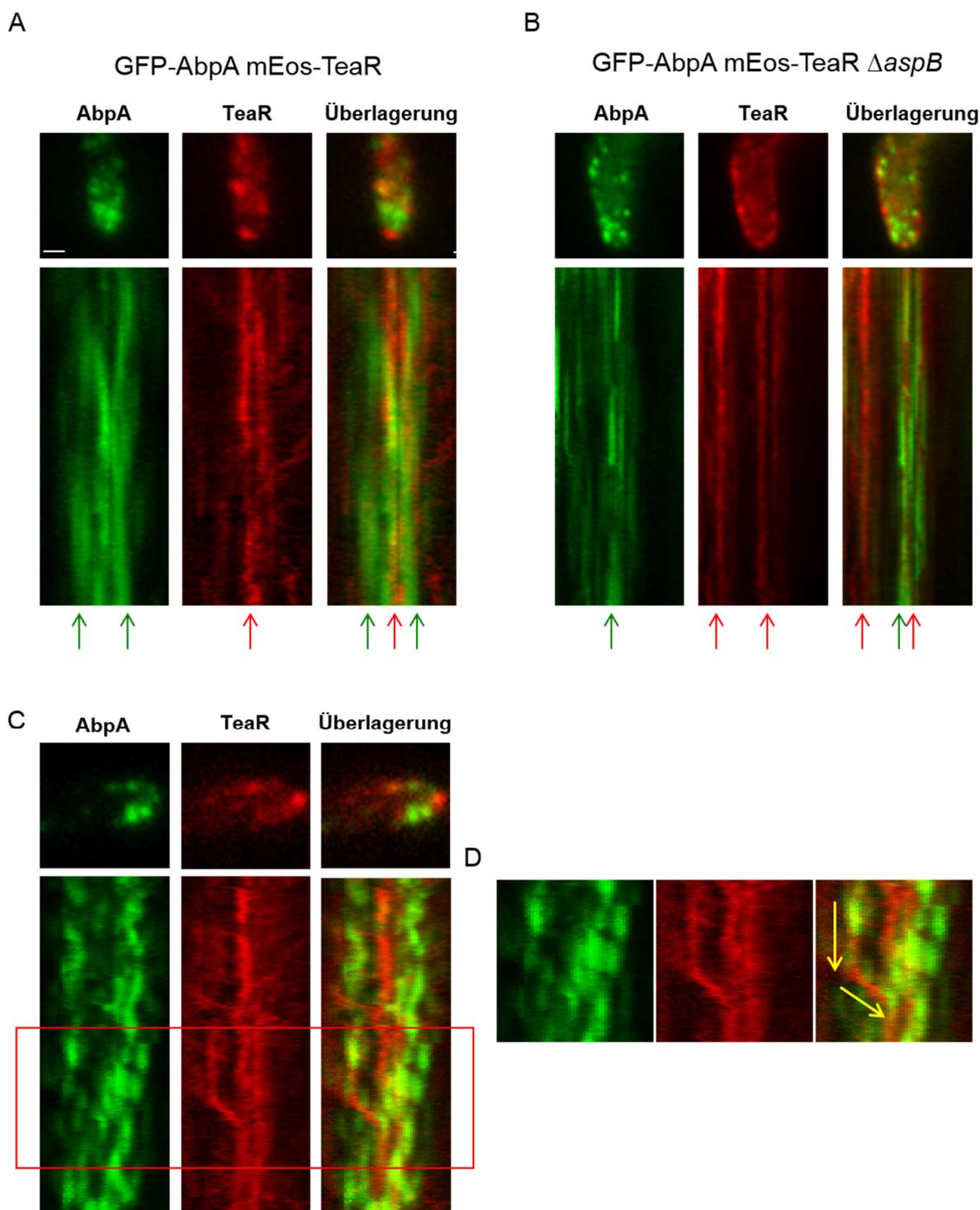
Da Septine wichtige Bestandteile des Cytoskeletts sind und ihre Heteropolymere Aufgaben in Entwicklungsprozessen wie der Etablierung der Zellpolarität, der Cytokinese, dem Vesikel Transport und der Zellarchitektur spielen, sollte der Zusammenhang der korrekten Septin Lokalisation mit der Lokalisation des Actinrings und des Zellendmarkers TeaR untersucht

werden (Weirich *et al.*, 2008, Spiliotis & Gladfelter, 2012, Mostowy & Cossart, 2012). Septin Heteropolymere lokalisieren üblicherweise am Zell Kortex und übernehmen dort Funktionen als Diffusionsbarrieren, in der Restriktion von Proteinen innerhalb bestimmter Membrandomänen und als Gerüstelement zur Reorganisation des Actincytoskeletts (Longtine *et al.*, 1996, Oh & Bi, 2011). Der Zellendmarker TeaR ist ein prenyliertes Protein und dadurch in die Plasmamembran verankert (Takeshita *et al.*, 2008). TeaR ist für die Aufrechterhaltung des polaren Wachstums in filamentösen Pilzen äußerst wichtig (Takeshita *et al.*, 2008), deshalb ist die richtige Positionierung des Proteins unerlässlich für die Polarisierung des Zellkompartiments.

Der hier verwendete Marker für Actinpatches, AbpA, ist in Actinpatches lokalisiert, welche einen kortikalen Actinring formen, der die Region der Endocytose darstellt (Araujo-Bazan *et al.*, 2008). AbpA ist ein Homolog des *S. cerevisiae* Abp1 Proteins. Es stellt wahrscheinlich einen negativen Regulator der Arp2/3 Komplex abhängigen Actin Formation dar (Sun *et al.*, 2006, D'Agostino & Goode, 2005) und bindet an die Seiten von Actinfilamenten (Drubin *et al.*, 1988, Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003, Quintero-Monzon *et al.*, 2005). Abp1, sowie auch AbpA, ist ein exzellenter Marker für Actinpatches, da es nicht mit Actinkabeln, sondern ausschließlich mit Patches assoziiert (Drubin *et al.*, 1988, Huckaba *et al.*, 2004).

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts der Deletion des Septins *aspB* auf die Lokalisierung der endocytotischen Maschinerie oder der Zellendmarker, wurden TeaR und AbpA in Wildtyp und *aspB* Deletionshintergrund co-exprimiert. TeaR war hierbei C-terminal mit mEosFPthermo markiert. AbpA war C-terminal mit GFP fusioniert. Die Spitzenregion von Hyphen wurde zunächst für 10 Sekunden mit einem 405 nm Laser bestrahlt. Dies führte zu einer Prä-Konvertierung einer ausreichenden Anzahl von Molekülen. Anschließend wurden die Proben für 200 ms gleichzeitig mit 561 und 405 nm Licht angeregt. Dieses Experiment zeigte im Wildtyphintergrund eine Akkumulation von des Zellendmarkers TeaR an der Spitze, sowie eine subapikale Lokalisation in einem Ring für die mit GFP-AbpA visualisierten Actinpatches. Hierbei zeigten die Kymographen, dass das Eos-TeaR Signal von den GFP-AbpA Actinpatches flankiert wurde. Im *aspB* Deletionshintergrund waren die Lokalisationen beider untersuchter Proteine gestört. AbpA zeigte keine eindeutige Lokalisation innerhalb eines Rings. TeaR lokalisierte weiträumiger entlang der Plasmamembran. Auch die Kymographen zeigten, dass TeaR nicht weiter von AbpA flankiert wurde (Abb. 2.36 A und B).

Zusätzlich konnte in diesem Zusammenhang ein interessantes Phänomen beobachtet werden. Wie in Abbildung 2.36 C und D gezeigt, scheinen die TeaR und AbpA Moleküle zusammen zu verweilen, bevor sie sich in einem Punkt an der Hyphenspitze treffen. Darüber hinaus schien ein Actinpatch sich weg zu bewegt und das TeaR Signal dadurch weiter weg von der Spitze ansiedeln kann.

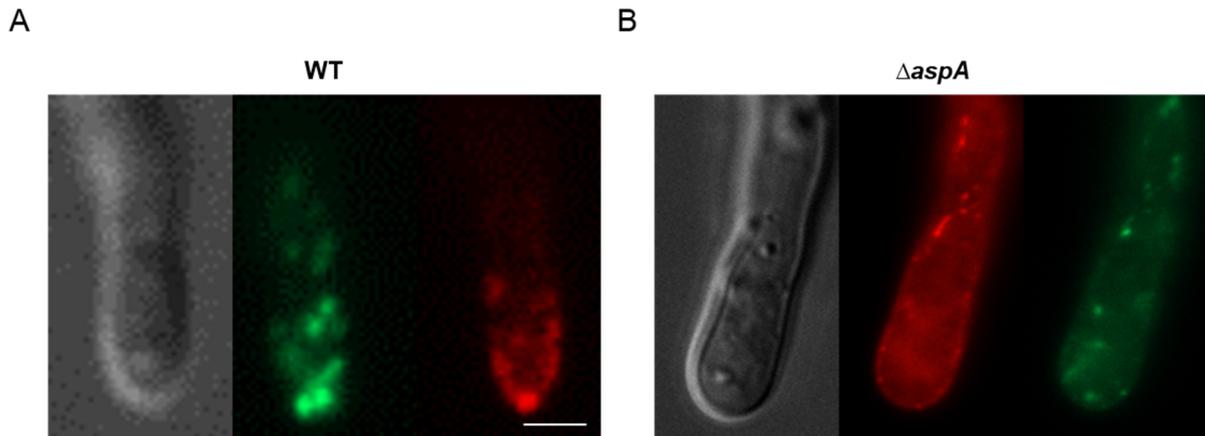


**Abbildung 2.36: Co-Lokalisierung von AbpA und TeaR im Wildtyp und *aspB* Deletionshintergrund.** **A:** Kymographen und Abbildungen der Hyphenspitzen der co-Lokalisierung von GFP-AbpA und mEos-TeaR im Wildtyp Hintergrund. Rote Pfeile Zeigen das TeaR Signal, Grüne das AbpA Signal an. Die TeaR Akkumulation ist an der Hyphenspitze lokalisiert und wird von AbpA Actinpatches umrahmt. **B:** Kymographen und Abbildungen der Hyphenspitzen der co-Lokalisation von GFP-AbpA und mEos-TeaR im *aspB* Deletionshintergrund. Rote Pfeile Zeigen das TeaR Signal, Grüne das AbpA Signal an. Im Vergleich zur Wildtypsituation ist das TeaR Signal mehr an der Membran verteilt, ebenso das AbpA Signal. **C:** Kymograph einer alternativen Aufnahme des Stammes in A. Das rote Rechteck zeigt den Bereich der Vergrößerung in D an. **D:** Vergrößerung des angezeigten Bereichs aus C. Pfeile im Überlagerungsbild zeigen ein mögliches gleichzeitiges Verweilen der Moleküle an, bis sie sich in einem Punkt an der Hyphenspitze treffen. Gesamtzeiten jeweils 60 Sekunden. Maßstabsbalken 1  $\mu$ m.

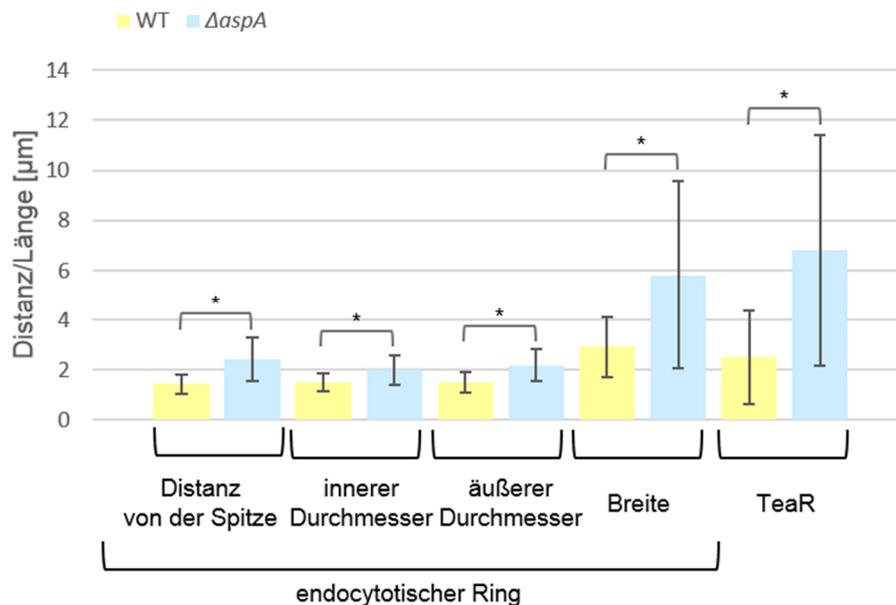
Ferner sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Deletion des Septins *aspA* auf die Lokalisierung des Zellendmarkers TeaA und den endocytotischen Ring hat. Zu diesem Zweck wurde ein Stamm konstruiert, welcher mRFP-TeaR und GFP-AbpA im *aspA* Deletionshintergrund co-exprimierte. Dieser wurde für konventionelle Epifluoreszenz Mikroskopie verwendet und mit einem co-Expressions Stamm im Wildtyp Hintergrund verglichen.

Im Wildtyp Hintergrund (Abb. 2.37 A) bildet das AbpA Signal eine Grenze für das TeaR Signal, wohingegen im *aspA* Deletionshintergrund eine Dislokalisierung beider Proteine vorzuliegen scheint, welche in einem weitreichenderen Signal für TeaR und stärker verteilten Actinpatches resultiert (Abb. 2.37 B). Diese Beobachtung ist ähnlich der Situation im *aspB* Deletionshintergrund.

Des Weiteren wurde mit Hilfe der Aufnahmen die Ausweitung des TeaR Signals, sowie der Abstand des endocytotischen Ringes zur Hyphenspitze, der innere und äußere Durchmesser des Rings und dessen Breite gemessen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass in der Septin Mutante ( $6,80 \pm 4,62 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 24) im Vergleich zum Wildtyp ( $2,50 \pm 1,86 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 42) das TeaR Signal deutlich mehr ausgebreitet war, wie es zuvor auch schon für die  $\Delta\textit{aspB}$  Mutante beobachtet werden konnte (Abb. 2.36  $\Delta\textit{aspB}$  und 2.37 und 2.38  $\Delta\textit{aspA}$  sowie Tabelle 2.2). Zusätzlich ist der endocytotische Actinring im *aspA* Deletionshintergrund misslokalisiert. So konnte für die Entfernung von der Hyphenspitze eine Verdopplung der Distanz in der Mutante ( $2,4 \pm 0,86 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 24; WT:  $1,42 \pm 0,38 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 42) berechnet werden. Der innere Durchmesser des Actinrings war um 33% größer ( $1,98 \pm 0,57 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 24; WT:  $1,49 \pm 0,35 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 42), der äußere Durchmesser um 46% größer ( $2,18 \pm 0,62 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 24) als im Wildtyp ( $1,49 \pm 0,41 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 42). Die Breite des Actinrings war in der Mutante ( $5,80 \pm 3,75 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 24) doppelt so groß, wie im Wildtyp ( $2,90 \pm 1,2 \mu\text{m}$ , Mittelwert  $\pm$  SD, N = 42).



**Abbildung 2.37: Co-Expression von GFP-AbpA und mRFP-TeaR im Wildtyp und im *aspA* Deletionshintergrund zur co-Lokalisierung des Actinrings und des Zellendmarkers TeaR. A:** co-Lokalisierung des Actinrings und des Zellendmarkers TeaR im Wildtyp. Maßstabsbalken 2 µm. **B:** co-Lokalisierung des Actinrings und des Zellendmarkers TeaR im *aspA* Deletionshintergrund. Maßstabsbalken 2µm.

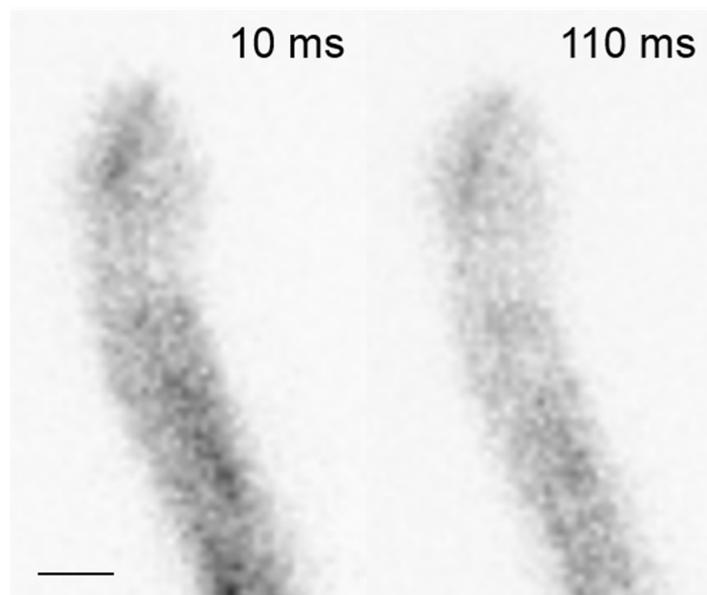


**Abbildung 2.38: Balkendiagramm der ermittelten Werte für den endocytotischen Ring und den Zellendmarker TeaR im Wildtyp und im *aspA* Deletionshintergrund.** Dargestellt sind die gemessenen Werte für den Endocytotischen Ring und das TeaR Signal in µm. In hellgelb jeweils der Wildtyp, in hellblau die *ΔaspA* Mutante. Für den Endocytotischen Ring wurde die Distanz zur Spitze, der innere und äußere Durchmesser, sowie die Breite gemessen. Für TeaR wurde die Ausbreitung des kompletten Signals berechnet. Sternchen zeigen die statistische Signifikanz unter den Datensätzen an.

## 2.10 Super Resolution Mikroskopie von Mikrotubuli

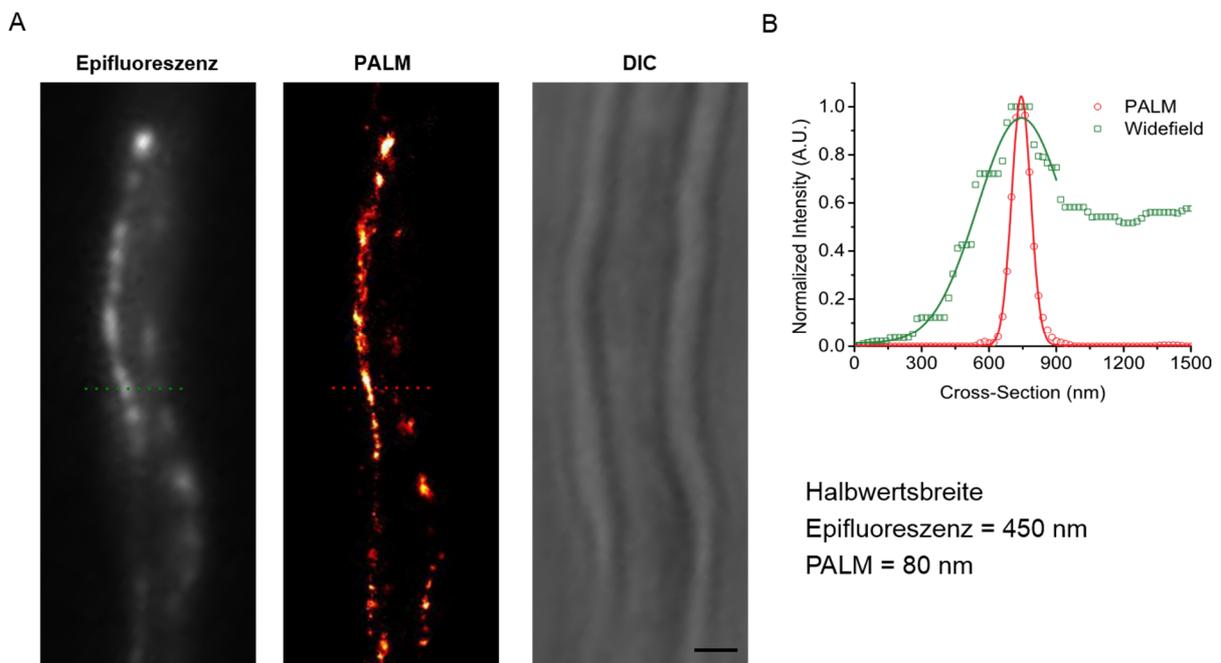
Im Rahmen dieser Arbeit sollte, zur genaueren Untersuchung des Mikrotubuli Cytoskeletts, PALM Mikroskopie des Mikrotubuli Markers TubA durchgeführt werden. Dies sollte mit Hilfe des fotokonvertierbaren mEosFPthermo Fluorophors realisiert werden. Es kann durch Bestrahlung mit 405 nm Licht von seiner Grünen in seine Rote Form konvertiert und durch 561 nm Bestrahlung angeregt werden. Diese Eigenschaften werden bei der *photo activated light*

*microscopy* (PALM) dazu genutzt, durch niedrige Laserintensitäten und kurze Anregungszeiten, statistisch wenige Moleküle zu konvertieren. Es werden dann viele Tausende Bilder aufgenommen, auf denen statistisch gesehen immer einzelne Moleküle angeregt wurden. Diese werden dann mit Hilfe von spezifischen Algorithmen zusammen gerechnet und es entsteht eine zeitlich aufgelöste Aufnahme der Probe. Zu diesem Zweck wurde TubA aus dem Vektor pSH44 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Ascl* und *PacI* geschnitten und in pNT65, welcher zuvor auch mit *Ascl* und *PacI* geschnitten wurde, ligiert. Dadurch entstand der Vektor pNT67, welcher die Fusion von mEosFPthermo und TubA unter der Kontrolle des regulierbaren *alcA* Promotors exprimiert. Dieser wurde in den Wildtyp TN02A3 transformiert und ein visueller Screen zur Verifikation korrekter Stämme durchgeführt. Der resultierende Stamm wurde SNT132 genannt. Dieser wurde anschließend für PALM Experimente verwendet. Hierzu wurden die Fluorophore, durch Bestrahlung mit einer niedrigen Intensität an 405 nm Licht, von ihrer Grünen in ihre Rote Form konvertiert und durch gleichzeitige Bestrahlung mit 561 nm angeregt. Leider wies der Stamm eine sehr hohe Hintergrundfluoreszenz auf und so konnten sehr schwerlich zusammenhängende Strukturen visualisiert werden (Abb. 2.39). Zusätzlich war die Dynamik der Moleküle zu schnell. Durch das geringe Signal und schnelle positionelle Änderung der Moleküle war eine Aufnahme in lebenden Zellen nicht möglich. Durch Fixierung der Zellen wurde das Signal noch diffuser.

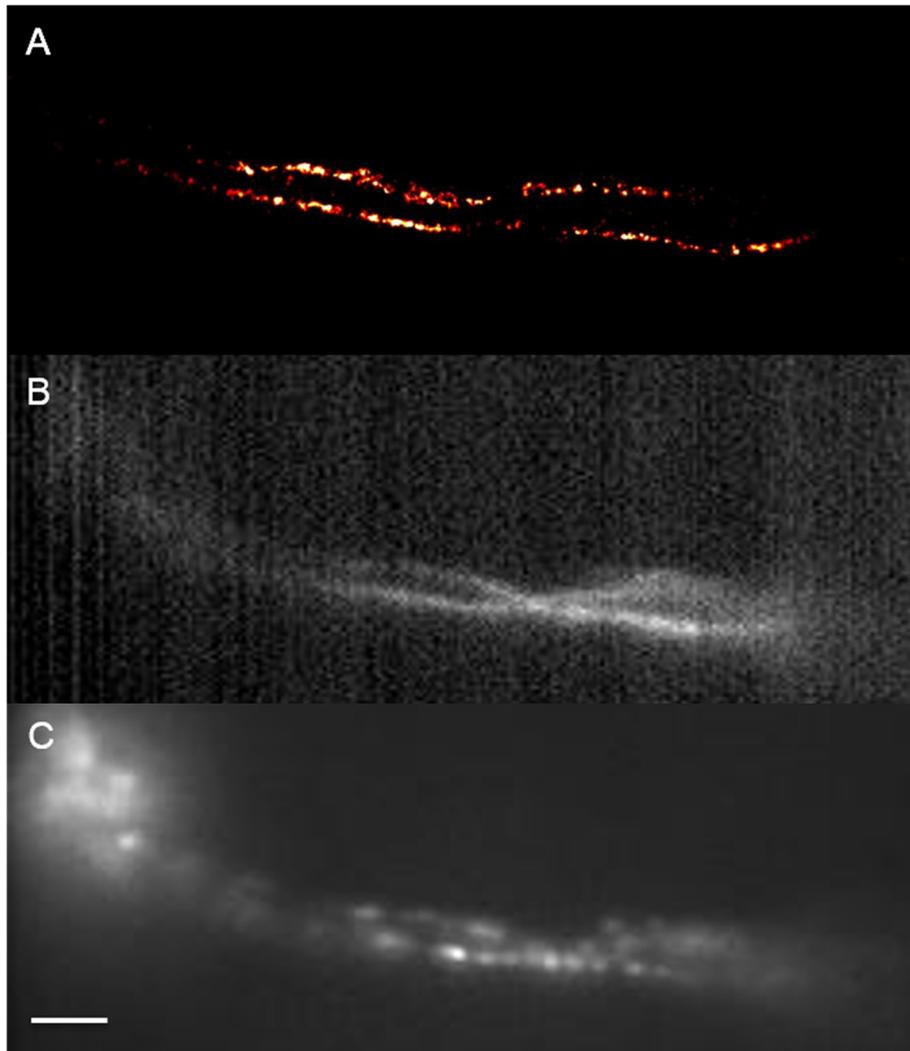


**Abbildung 2.39: PALM Mikroskopie eines mEosFPthermo exprimierenden Stammes.** Zellen des Stammes SNT132 wurden über Nacht in Minimalmedium mit 2% Threonin als Kohlenstoffquelle in Mikroskopie Kammern inkubiert. Die Aufnahmen wurden durch gleichzeitige Konvertierung von mEos mit 405 nm Licht und Anregung mit 561 nm gemacht. Die Belichtungszeit pro Bild betrug 10 ms. Es wurden mehrere Tausende Bilder aufgenommen und mit einer Software für PALM bearbeitet. Anschließend wurden jeweils 10 Bilder überlagert. Hier gezeigt sind das erste Bild einer Zeitreihe und ein weiteres Bild nach 100 ms. Es sind keine spezifischen Mikrotubuli Strukturen erkennbar, lediglich zu erahnen. Das zweite Bild zeigt eindeutig eine schnelle Ausbleichung des Fluorophors, die normalerweise nicht vorkommt. Maßstabsbalken 1  $\mu\text{m}$ .

Aus diesem Grund wurden Rigor Mutanten der Kinesine KinA und UncA gekoppelt an mEosFPthermo zur weiteren Untersuchung des Mikrotubuli Cytoskeletts mit Hilfe der PALM Mikroskopie verwendet. Eine Modifikation im *P-Loop* von UncA führt zur sogenannten Rigor Mutation. Diese hat zur Folge, dass der Motor an Mikrotubuli binden kann, jedoch nicht mehr in der Lage ist von ihnen zu dissoziieren (Meluh & Rose, 1990, Nakata & Hirokawa, 1995). Daraus resultiert eine Dekoration des Mikrotubulus. Eine verkürzte Version der UncA<sup>rigor</sup> Mutation bindet an alle Mikrotubuli in der Hyphe (Seidel *et al.*, 2012). Für das konventionelle Kinesin KinA ist ebenfalls eine Rigor Mutante vorhanden, welche die Mikrotubuli dekoriert (Zekert & Fischer, 2009). Im Falle von UncA<sup>rigor</sup> wurde eine kurze Version des Proteins verwendet, welche nicht, wie das Vollängen-Protein nur an einen, sondern an alle Mikrotubuli in der Hyphe bindet. Es entstanden durch Austauschen des Ursprünglichen Fluorophors in pCoS25 beziehungsweise pCS5-NZ die Vektoren pNT75 (KinA<sup>rigor</sup>) und pNT76 (UncA<sup>rigor</sup>short). Diese wurden in TN02A3 transformiert und durch Selektion und einen visuellen Screen wurden korrekte Transformanden ermittelt. Die resultierenden Stämme wurden im Falle von mEos-UncA<sup>rigor</sup>short SNT157 und im Falle von mEos-KinA<sup>rigor</sup> SNT156 genannt. Mit Hilfe dieser Stämme konnten Aufnahmen von viel besserer Qualität erzielt werden (Abb. 2.39 und 2.40).



**Abbildung 2.40: PALM Experiment zur Ermittlung der Mikrotubuli Lokalisation mit einem mEosFPthermo-KinA<sup>rigor</sup> exprimierenden Stamm.** **A:** Vergleich von Epifluoreszenzmikroskopie und PALM eines mEosFPthermo-KinA<sup>rigor</sup> exprimierenden Stammes. Die gestrichelten Linien zeigen die Linien zum Erstellen eines Profilplots des Mikrotubulus, die zur Berechnung der Halbwertsbreite genutzt wurden. Maßstabsbalken 1  $\mu\text{m}$ . **B:** Profil der Halbwertsbreiten der in A angedeuteten Profile. Grün korrespondiert mit der Epifluoreszenz, rot mit PALM. In diesem Beispiel konnte die Halbwertsbreite für die Epifluoreszenzmikroskopie mit 450 nm und diejenige für PALM mit 80 nm als Durchmesser des Mikrotubulus errechnet werden.



**Abbildung 2.41: Abbildung eines PALM Experiments zur Ermittlung der Mikrotubuli Lokalisation eines mEosFPthermo-UncA<sup>rigor</sup>short exprimierenden Stammes. A:** PALM Rekonstruktion aus den Rohdaten (C), hierbei sind Molekülakkumulationen in hellerer Farbe dargestellt als Einzelmoleküle. **B:** Verrechnete Daten aus (C), welche zu einer Bildsequenz zusammen gefügt wurden. Hier dargestellt ist repräsentativ ein Zeitpunkt. **C:** Rohdaten des Experiments. Maßstabsbalken 2 µm.

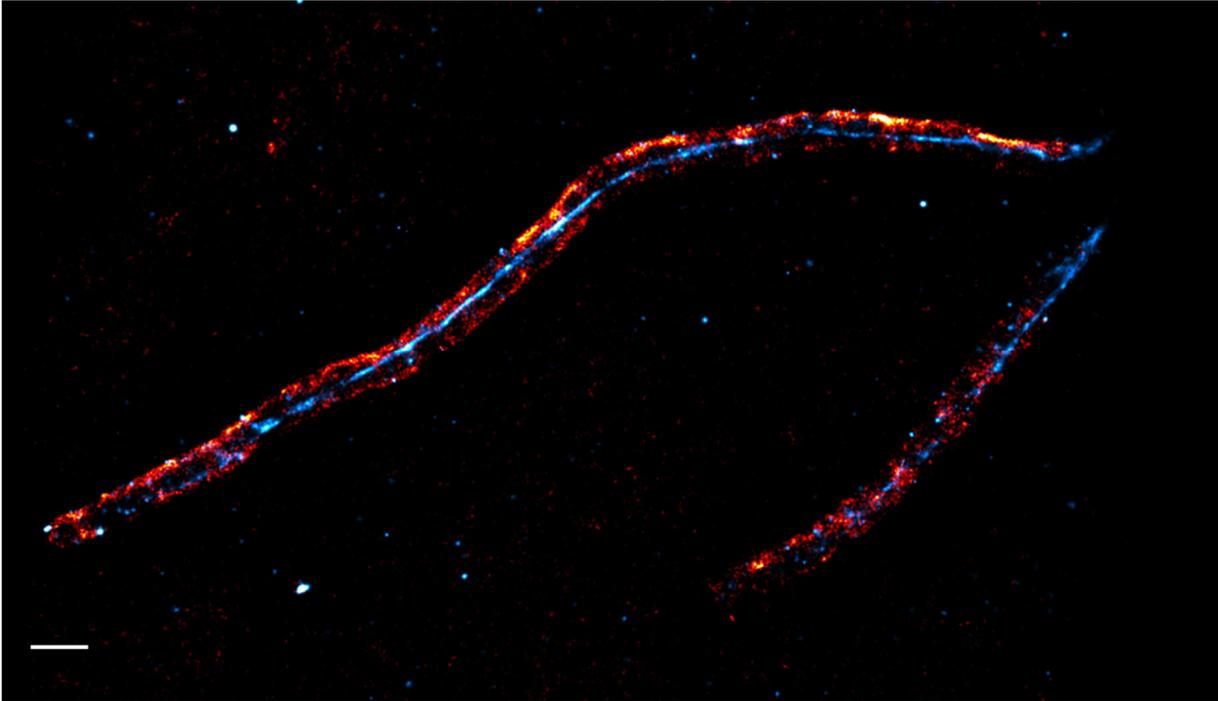
Zusätzlich wurden diese Stämme dazu genutzt Profile des Durchmessers der Mikrotubuli zu erstellen und mit Hilfe derer die Halbwertsbreite und somit den Durchmesser der Mikrotubuli zu errechnen. Diese wurden mit den Werten von normaler Epifluoreszenzmikroskopie der Stämme mCherry-TubA (sSH62), mRFP-KinA<sup>rigor</sup> (sCS5-NZ) und GFP-UncA<sup>rigor</sup>short (sCoS11) verglichen. Die Berechnung der Halbwertsbreiten erfolgte mit Hilfe von *ImageJ* (Schindelin *et al.*, 2012). Hierbei wurde eine Linie horizontal zum zu untersuchenden Mikrotubulus gezogen. Hiervon wurde ein Profil geplottet. Die X und Y Werte dieses Profils wurden dann in *OriginPro* 9.1 (Northampton, USA, <http://www.originlab.de/>) eingefügt. Die Kurve wurde dann an die Gauss-Funktion angeglichen und die Halbwertsbreite errechnet. Die Werte wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die gemittelten Werte können der Tabelle 2.2 entnommen werden. Hierbei fällt auf, dass die Werte für die Epifluoreszenzmikroskopie mindestens um den Faktor 100 höher sind als für die PALM Experimente. PALM ist demnach

sehr gut dafür geeignet Mikrotubuli zu untersuchen. Auffallend sind aber auch die hohen Werte für die Standardabweichung und den Standardfehler. Diese kommen vermutlich durch die Messung von Mikrotubuli-Bündeln und einzelnen Mikrotubuli zustande. Die durch PALM Experimente errechneten Mikrotubuli Durchmesser für KinA<sup>rigor</sup> und UncA<sup>rigor</sup>short sind dabei vergleichbar.

**Tabelle 2.2: FWHM Werte der Eos-Rigor-Motormutanten im Vergleich zu FP-Rigor-Motormutanten**

<b>FWHM</b>	<b>mEos- KinA<sup>rigor</sup></b>	<b>mEos- UncA<sup>rigor</sup> short</b>	<b>mRFP- KinA<sup>rigor</sup></b>	<b>GFP- UncA<sup>rigor</sup> short</b>	<b>mCherry- TubA</b>
	<b>PALM</b>		<b>Epifluoreszenz</b>		
<b>Mittelwert [nm]</b>	<b>42.04</b>	<b>32.95</b>	<b>662.23</b>	<b>600.36</b>	<b>455.45</b>
<b>Anzahl</b>	<b>5</b>	<b>44</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	<b>26</b>
<b>Standart- abweichung</b>	<b>3.86</b>	<b>16.80</b>	<b>91.19</b>	<b>174.91</b>	<b>192.82</b>
<b>Standart- fehler</b>	<b>1.72</b>	<b>2.53</b>	<b>45.60</b>	<b>38.17</b>	<b>37.82</b>

Zusätzlich wurden Zellen des Stammes SNT157 in Threonin Medium angezogen, mit Formaldehyd fixiert und deren Zellwand mit Hilfe von WGA-FITC angefärbt (Abb. 2.42). Mit Hilfe dieses Experiments könnte der Abstand der Mikrotubuli zur Zellwand berechnet werden.



**Abbildung 2.42: PALM Mikroskopie zur Ermittlung der Mikrotubuli Lokalisation von einem mEosFPthermo-UncA<sup>rigor</sup>short exprimierenden Stamm mit simultaner WGA-FITC Färbung der Zellwand.** Zellen des mEosFPthermo-UncA<sup>rigor</sup>short exprimierenden Stammes wurden über Nacht in Minimalmedium mit 2% Threonin angezogen, anschließend fixiert und mit WGA-FITC gefärbt. Maßstabsbalken 2  $\mu$ m.

### 3. Diskussion

Das Cytoskelett spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Morphogenese von Pilzen (Berepiki *et al.*, 2011, Lichius *et al.*, 2011). Es wird aus drei Hauptpolymeren gebildet, welche namentlich filamentöses Actin (F-Actin), Mikrotubuli (MT) und Septine sind. Sowohl Actin als auch Mikrotubuli sind entscheidend für das Wachstum der Hyphen. Sie haben unterschiedliche aber überlappende Aufgaben im polaren Wachstum (Harris *et al.*, 2005, Lichius *et al.*, 2011). Neben Actinkabeln sind die Mikrotubuli und ihre korrespondierenden Motor-Proteine in die kontinuierliche Sekretion von Vesikeln, welche essentiell für die Erweiterung der Zellwand und Plasmamembran sind, involviert (Takeshita *et al.*, 2014, Egan *et al.*, 2012, Steinberg, 2011). Mikrotubuli spielen hierbei eine Rolle im Langstreckentransport sekretorischer Vesikel, bis diese an der Spitze an Actinkabel übergeben und zur Plasmamembran transportiert werden, um dort schlussendlich mit ihr zu verschmelzen (Howard, 1981, McGoldrick *et al.*, 1995). Während des apikalen Spitzenwachstums stehen Exocytose und Endocytose in einer ständigen Balance, um sowohl die effektive Membranerweiterung als auch das Recycling von wichtigen, durch die Exocytose diffundierenden, Komponenten zu gewährleisten (Penalva, 2010, Shaw *et al.*, 2011). Septine spielen zusätzliche eine wichtige Rolle im polaren Wachstum, da sie an distinkten Stellen der Plasmamembran lokalisieren und dort als

Gerüstkomponente und Barrieren fungieren. Diese Funktionen sind essentiell für die Assemblierung bestimmter Proteinkomplexe, wie dem kontraktilen Actomyosinring, welcher für die Septenbildung und die Cytokinese wichtig ist und aus Actin und Myosin II besteht, dem Polarisomkomplex, der einen Multiproteinkomplex darstellt und für die richtige Positionierung von Actinfilamenten wichtig ist, oder dem Exocystkomplex, ebenfalls ein Multiproteinkomplex, der das Verankern sekretorischer Vesikel an der Plasmamembran an Stellen der Exocytose und des apikalen Wachstums ermöglicht (Barral *et al.*, 2000, Dobbelaere & Barral, 2004, Orlando *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Dynamik der Actinkabel in *A. nidulans* mit Hilfe des Markers TpmA gezeigt werden. Zusätzlich zeigte sich, dass die Expressionsstärke von Lifeact gravierende Auswirkungen auf die Organisation und die Dynamik des Actincytoskeletts hat. Des Weiteren konnte eine Wechselbeziehung zwischen Actin und Mikrotubuli, sowie dem Zellendmarker TeaA gezeigt werden. Im Zuge der Messung der Calciumkonzentration an der Hyphenspitze von *A. nidulans* konnten Calciumoszillationen beobachtet werden und diese in einen möglichen Zusammenhang mit der Dynamik der Cytoskelette gestellt werden. Außerdem konnte die Untersuchung des endocytotischen Actinrings und des Zellenmarkers TeaR in Septinmutanten zeigen, dass Septine eine Rolle in der korrekten Positionierung dieser Polaritätsfaktoren spielen.

Experimente zur hochauflösenden Mikroskopie von Mikrotubuli zeigten, dass die meisten mit normalen, Epifluoreszenzmikroskopen, aufgenommenen Mikrotubuli Strukturen vermutlich Bündelungen mehrerer Mikrotubuli darstellen.

### 3.1 Markerproteine zur Visualisierung von Actin

Die Visualisierung von Actin in filamentösen Pilzen gestaltete sich in der Vergangenheit eher schwierig. So ist die, in anderen Eukaryoten viel verwendete, Methode der Detektion durch Phalloidinkonjugate mit Fluoreszenzproteinen nicht möglich (Brent Heath *et al.*, 2003). Zudem sind diese toxisch und können nur in fixierten Zellen verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Actin für die Immunfluoreszenz. Diese Methode ist jedoch aufgrund der Größe der Antikörper, ebenfalls nur in fixierten und permeabilisierten Zellen möglich. Deshalb kann sie nur ein statisches, unvollständiges Bild der Actin Organisation liefern und ist zudem für die Untersuchung der Dynamik gänzlich ungeeignet. Die direkte Kopplung von Actingenen an fluoreszente Proteine gestaltet sich deshalb problematisch, da der Hauptanteil des zellulär vorliegenden Actins im Cytoplasma in der Form von G-Actin Molekülen vorliegt, hierdurch kann es zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz kommen (Aizawa *et al.*, 1997, Riedl *et al.*, 2008, Wu & Pollard, 2005). Zudem entsteht durch die Kopplung eine sterische Hinderung, welche die Dynamik und

Eigenschaften von Actin verändert und zur Bildung von Artefakten führt (Wu & Pollard, 2005, Aizawa *et al.*, 1997, Riedl *et al.*, 2008). So konnte auch in *A. nidulans* mit der Fusion des *actA* Gens nicht das vollständige Actincytoskelett gezeigt werden. Das Fusionsprotein markierte lediglich Actinpatches, welche jedoch sehr dynamisch waren (Upadhyay & Shaw, 2008, Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Das Fusionskonstrukt konnte in diesem Fall jedoch nur ektopisch integriert werden (Upadhyay & Shaw, 2008). Dies lässt mutmaßen, dass es nicht vollständig funktionsfähig ist, beziehungsweise die normalen Funktionen des Actincytoskeletts behindert und deshalb das natürliche, nicht markierte, Actin zusätzlich vorliegen muss. Aus den vorangehenden Gründen wurden in den letzten Jahren verschiedene Actinbindeproteine (ABPs) zur Visualisierung von Actin an fluoreszente Proteine gekoppelt (Doyle & Botstein, 1996, Waddle *et al.*, 1996, Yang & Pon, 2002). Diese Methode kann *in vivo* angewendet werden und ist somit hinreichend, um die Dynamik des Actincytoskeletts zu untersuchen und darzustellen. Dennoch führt die Kopplung von ABPs, beziehungsweise deren Actin Binde Domänen, zu einer indirekten Anfärbung des Cytoskeletts, welche nicht immer alle verschiedenen Strukturen innerhalb einer Zelle wiedergibt (Washington & Knecht, 2008, Burkel *et al.*, 2007). Zusätzlich kann durch diese Kopplung eine Störung des Actincytoskeletts hervorgerufen werden (Lemieux *et al.*, 2014). In *Dictyostelium discoideum* wurden die Auswirkungen verschiedener Expressionsvektoren, ABPs und Fluoreszenzproteine untersucht. Die Resultate zeigten, dass die Lokalisation der ABPs innerhalb der Zelle stark vom verwendeten Vektor und dem Fluoreszenzprotein abhing (Lemieux *et al.*, 2014). Deshalb ist es, um einen hohen cytoplasmatischen Hintergrund zu vermeiden, erforderlich, Proteine für die Markierung zu wählen, welche nur oder zumindest vornehmlich an F-Actin binden. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten ABPs, Lifeact und TpmA, stellen solche Proteine dar.

Tropomyosin wurde zuvor schon erfolgreich zur Färbung des Actincytoskeletts in *A. nidulans* verwendet (Pearson *et al.*, 2004, Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Jedoch wurde hierbei lediglich die Lokalisation des Actincytoskeletts, nicht aber die Anzahl der Actinkabel oder deren Dynamik und Regulation untersucht. Im Zuge dieser Arbeit wurden deshalb Stämme hergestellt, welche N-terminal mit GFP fusioniertes TpmA entweder unter der Kontrolle des natürlichen Promotors oder des regulierbaren *alcA* Promotors exprimierten. Zusätzlich wurde ein Stamm generiert, welcher TpmA gekoppelt an das photokonvertierbare mEosFPthermo unter Kontrolle des regulierbaren *alcA* Promotors exprimiert. Mit Hilfe dieser Stämme konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Markierung von Actinkabeln mit GFP-TpmA beziehungsweise mEosFPthermo-TpmA die Dynamik des Actincytoskeletts in *A. nidulans* gezeigt werden. Dennoch ist es möglich, dass durch die allgemeine Actin-Stabilisierungsfunktion von Tropomyosinen (Pelham & Chang, 2001, Moseley & Goode, 2006) Artefakte entstehen können. Zudem ist bei der Arbeit mit Tropomyosinen aus den nachstehenden Gründen Vorsicht geboten. Tropomyosine tendieren in Lösung dazu zu

oligomerisieren und Aggregate zu formen, dadurch ist es schwierig proteochemische Experimente mit ihnen durchzuführen (Gunning *et al.*, 2015). Tropomyosine interagieren über ionische Bindungen mit Actin, weshalb sie genau genommen nur über der Oberfläche des Actin Polymers schweben (Von der Ecken *et al.*, 2014). Darüber hinaus binden Tropomyosin Dimere Actin nur mit sehr niedrigen Affinitäten (Wegner, 1979). Hinzu kommt, dass sie, um effizient mit einem Actinfilament zu assoziieren, ein *head-to-tail* Polymer ausbilden müssen. Dieses besteht aus Homopolymeren, welche aus Tropomyosin Dimeren zusammengesetzt sind (Tobacman, 2008). Jedes Actinfilament des Cytoskeletts beinhaltet ein Homopolymer aus Tropomyosin Homodimeren, was in einem Tropomyosin Filament entlang der gesamten Länge des Actinfilaments resultiert (Gunning *et al.*, 2015). Die meisten Pilze sind in der Lage verschiedene Tropomyosin Isoforme zu exprimieren. Diese stammen entweder von unterschiedlichen Genprodukten, oder post-translationalen Modifikationen (Gunning *et al.*, 2015). Die kooperative Interaktion des Tropomyosin Filaments mit einem Actinfilament ist essentiell für die Funktion von Tropomyosin. Über diese Interaktion werden die Wechselbeziehungen mit anderen Actinbindeproteinen, wie Myosin oder Cofilin, sowie die biophysikalischen und dynamischen Eigenschaften des Actinfilaments reguliert (Bryce *et al.*, 2003). Dadurch sind verschiedene Tropomyosine in der Lage Actinfilamenten unterschiedliche physikalische Eigenschaften zu vermitteln und bestimmen demzufolge deren Funktionen. Für die Mobilität einer Zelle ist es äußerst wichtig die richtige Tropomyosin-Isoform zur rechten Zeit und am rechten Ort zu einem Actinfilament zu rekrutieren (Bach *et al.*, 2009). *A. nidulans* und *S. pombe* besitzen jeweils nur ein einziges Tropomyosin (TpmA, beziehungsweise Cdc8) (Pearson *et al.*, 2004, Johnson *et al.*, 2014). In *S. pombe* existiert Cdc8 in zwei Formen. Zum einen N-terminal acetyliert, zum anderen deacetyliert. Die acetylierte, vorherrschende Form assoziiert mit Actinfilamenten, welche in den Actomyosinring während der Mitose eingebaut werden. Nicht acetyliertes Cdc8 interagiert hingegen mit den dynamischeren Actinfilamenten während der Interphase (Skoumpla *et al.*, 2007, Coulton *et al.*, 2010). Aufgrund der Begebenheit, dass *A. nidulans* ebenfalls nur ein Tropomyosin besitzt, könnte eine ähnliche Regulation erfolgen. Deshalb ist es nicht auszuschließen, dass die Fusion von TpmA mit Fluoreszenzproteinen zu einer Änderung der Regulation und/oder Funktion des Proteins führen könnte. Zudem sind die hergestellten Stämme, welche die TpmA Fusionsproteine herstellen wahrscheinlich nur deshalb vollständig lebensfähig, da eine funktionelle Kopie des natürlichen *tpmA* Gens im Genom erhalten bleibt.

Für Lifeact konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Stabilisierungsfunktion gezeigt werden. Diese ist an die Expressionsstärke, beziehungsweise die daraus resultierende Proteinkonzentration in der Hyphe, gekoppelt und kann somit durch die Wahl eines induzierbaren Promotors und einer geeigneten Kohlenstoffquelle reguliert werden. Dennoch

liegt selbst bei niedriger Expression ein Stabilisierungseffekt vor. Die beobachteten Actinkabel waren, im Vergleich zu via TpmA visualisierten Strukturen, immer länger und stabiler. Ein ähnlicher Stabilisierungseffekt von Lifeact in Zusammenhang mit der Expressionsstärke konnte auch für *Arabidopsis thaliana* (van der Honing *et al.*, 2011) und *Physcomitrella patens* (Vidali *et al.*, 2009) gezeigt werden (siehe dazu auch Abschnitt 3.1). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass Aufgrund der Expression von Lifeact in Organismen, welche dieses Peptid, beziehungsweise sein Ursprungprotein, nicht enthalten, eine Änderung des Actin Bindeprotein Verhaltens des Actinfilaments, welches Lifeact gebunden hat, entsteht. Dadurch könnte die Funktion und Dynamik des Actincytoskeletts drastisch verändert werden. Eine weitere plausible Erklärung ist die sterische Hinderung des Actinfilaments aufgrund einer Überladung des Filaments mit gebundenem Lifeact Peptid unter hohen Expressionsbedingungen. In anderen Organismen wurde Lifeact bereits erfolgreich als Marker für das Actincytoskelett eingesetzt. Darunter befanden sich Hefen und filamentöse Pilze (Riedl *et al.*, 2008, Berepiki *et al.*, 2010, Delgado-Alvarez *et al.*, 2010, Böhmer *et al.*, 2009, Coffman *et al.*, 2009), Pflanzen (Era *et al.*, 2009, Smertenko *et al.*, 2010, Vidali *et al.*, 2009), und Säugetiere (Estecha *et al.*, 2009, Riedl *et al.*, 2008, Riedl *et al.*, 2010). In dem Basidiomyceten *Ustilago maydis* konnten dabei durch Lifeact nur Septenringe visualisiert werden, Actinkabel und -patches konnten nicht beobachtet werden (Böhmer *et al.*, 2009). In dem Ascomyceten *Neurospora crassa* hingegen konnten mit Hilfe von Lifeact Actinkabel, -patches und -ringe gezeigt werden (Delgado-Alvarez *et al.*, 2010, Berepiki *et al.*, 2010). Interessanter Weise ist hierbei die Lokalisation in Keimschläuchen unterschiedlich zu derer in Hyphen. In Keimschläuchen wurden Actinkabel und -patches innerhalb der gesamten Zelle beobachtet. In Hyphen lokalisieren Actinpatches vornehmlich subapikal in einer Ringstruktur, die der Endocytose zugeordnet wird. Actinkabel waren in Hyphen lediglich in distalen Bereichen entlang des Kortex zu beobachten. An der Hyphenspitze lokalisierten durch Lifeact markierte Actinkomponenten in einem Punkt am Apex, welcher den Spitzenkörper darstellt (Berepiki *et al.*, 2010, Delgado-Alvarez *et al.*, 2010). Darüber hinaus lokalisierte Lifeact in *N. crassa* Hyphen in entstehenden Septen. Dabei erschien es bevor eine sichtbare Einschnürung der Zellwand vorhanden war und lokalisierte in einer Netzstruktur von Actinkabeln und -patches an der zukünftigen Septierungsstelle. Diese Netzstruktur verschmolz zu einem kontraktilem Ring, der sich letztendlich zusammenschnürte und verschwand (Delgado-Alvarez *et al.*, 2010, Berepiki *et al.*, 2010). Dieses Lokalisierungsmuster weicht teilweise von dem im Zuge der vorliegenden Arbeit beobachteten in *A. nidulans* Hyphen ab. In *A. nidulans* Hyphen lokalisierte Lifeact in Actinpatches, welche über die gesamte Länge des Kompartiments verteilt waren. Zusätzlich konnten stark verzweigte Actinnetzwerke an den Hyphenspitzen und in subapikalen Bereichen der Hyphe beobachtet werden (Abb. 2.4 und 2.5). Der Unterschied in den Lokalisierungsmustern von mit Lifeact visualisierten Actinkabeln in *A. nidulans* und *N. crassa*

könnte darin begründet sein, dass *N. crassa* eine viel schnellere Wachstumsrate aufweist (35  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Riquelme *et al.*, 2000) als *A. nidulans* (0,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Horio & Oakley, 2005)) und dadurch andere Anforderungen an die Organisation des Actincytoskeletts hat. Des Weiteren visualisierte Lifeact-GFP in *A. nidulans*, wie zuvor in *N. crassa* gezeigt (Berepiki *et al.*, 2010, Delgado-Alvarez *et al.*, 2010), entstehende Septen (Abb. 2.25). In *U. maydis* und *N. crassa* wurde kein Stabilisierungseffekt von Lifeact auf die Dynamik des Actincytoskeletts festgestellt (Böhmer *et al.*, 2009, Delgado-Alvarez *et al.*, 2010, Berepiki *et al.*, 2010). Dies könnte darin begründet sein, dass hier andere Promotoren zur Expression der Fluoreszenzgekoppelten Lifeact-Peptide verwendet wurden und diese womöglich eine geringere Expression als der sehr starke *alcA* Promotor in *A. nidulans* aufweisen.

Deshalb sind beide hier verwendeten Actin Marker zwar für die Untersuchung von F-Actin in *A. nidulans* geeignet, doch die hier gezeigten Ergebnisse zeigen womöglich nicht das vollständige Bild des Actincytoskeletts und offenbaren die Notwendigkeit der Behutsamkeit in Zusammenhang mit Inkubationsbedingungen und anderen äußeren Einflüssen.

### 3.2 Actin Organisation und Dynamik in *A. nidulans*

Obwohl die Signifikanz der Actinkabel im polaren Wachstum bereits erkannt wurde und spezifische Markerproteine zur Visualisierung des Actincytoskeletts in filamentösen Pilzen zur Verfügung stehen, konnte die exakte Lokalisierung, die Anzahl, die Länge sowie die Polymerisations- und Depolymerisationsraten der Actinkabel noch nicht bestimmt werden (Delgado-Alvarez *et al.*, 2010, Taheri-Talesh *et al.*, 2008, Berepiki *et al.*, 2010, Pearson *et al.*, 2004, Evangelista *et al.*, 2002). Im Zuge dieser Arbeit wurde die Dynamik von Actinkabeln mit Hilfe von Tropomyosin (TpmA) und Lifeact unter verschiedenen Expressionsbedingungen untersucht. Die Ergebnisse zeigen verschiedene Lokalisationsmuster für die zwei verwendeten Markerproteine. Während GFP-TpmA hoch dynamische Actinkabel an der Hyphenspitze zu visualisieren scheint (Abb. 2.15), lokalisiert Lifeact-GFP in der gesamten Hyphe in Patches und in einem höchst verzweigten Netzwerk von Actinkabeln an der Spitze (Abb. 2.5). Zusätzlich ist die Lokalisation von Lifeact von der verwendeten Kohlenstoffquelle abhängig, was darauf hindeutet, dass ein Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration und der Dynamik der Actinkabel besteht.

Die Unterschiede in der Lokalisation zwischen GFP-TpmA und Lifeact-GFP spiegeln sich auch in der Dynamik der Actinkabel wider. Im Zuge dieser Arbeit konnte ein definitiver Einfluss der Lifeact Expression auf die Dynamik von Actinkabeln beobachtet werden (Ergebnisse Abschnitt 2.1). Es konnte gezeigt werden, dass die Elongationsrate für Lifeact-GFP dekorierte Kabel in

Glycerin Medium um 47% gegenüber derer unter Herabregulation der Expression reduziert war. Ein ähnliches Bild zeichnete sich für die Depolymerisationsrate ab. Wenn Lifeact unter de-reprimierenden Konditionen exprimiert wurde war diese um 65% gegenüber derer unter Herabregulation der Expression verringert. Der Stamm wies 56% weniger Katastrophen auf, wenn er in Glycerin haltigem Medium inkubiert wurde. Zusätzlich war die Länge der Actinkabel vor Beginn einer Katastrophe unter Herabregulation der Expression um 57% reduziert. All diese errechneten Werte deuten stark darauf hin, dass Actinkabel, welche mit einer hohen Anzahl an Lifeact Peptiden dekoriert sind (de-reprimierende Kondition), viel stabiler und weniger dynamisch als unter niedrigeren Expressionsbedingungen (Herabregulation der Expression) sind. Eine quantitative Realtime PCR (qRT PCR) konnte bestätigen, dass die Expression von Lifeact-GFP durch die Zugabe von geringen Mengen an Glucose herab reguliert werden kann. Ein Stabilisierungseffekt von Lifeact in Zusammenhang mit der Expressionsstärke konnte auch für *Arabidopsis thaliana* (van der Honing *et al.*, 2011) und *Physcomitrella patens* (Vidali *et al.*, 2009) gezeigt werden. In *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Pflanzen zwar nicht beeinflusst wird, eine hohe Expression von Lifeact aber den Effekt hatte, dass Actinfilament Bündel nicht mehr reorganisieren konnten. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass dieser Effekt in Zellen, welche eine geringe Lifeact Expression aufwiesen, umgekehrt werden konnte. Interessanterweise konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass die Latrunculin B induzierte Depolymerisation von Actinkabeln unter hoher Expression von Lifeact reduziert war (van der Honing *et al.*, 2011). Eine ähnliche Beobachtung konnte im Zuge dieser Arbeit mit Cytochalasin A gemacht werden. Nach Behandlung mit der Actin destabilisierenden Droge wurden mit TpmA dekorierte Actinkabel depolymerisiert, wohingegen Actinkabel, welche mit Hilfe von Lifeact visualisiert wurden, selbst nach sehr langen Inkubationszeiten noch intakt waren. In *P. patens* konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von Lifeact zu einem langsameren Wachstum, nicht aber zu Actin Artefakten führt (Vidali *et al.*, 2009).

Die im Zuge der Untersuchung der Actindynamik beobachteten Unterschiede zwischen den Datensätzen der GFP-TpmA exprimierenden Stämme könnten durch einen Stabilisierungseffekt von TpmA unter Überexpressions-Bedingungen erklärt werden, da Tropomyosine dafür bekannt sind, dass sie an Actinkabel binden und diese dadurch stabilisieren (Pelham & Chang, 2001, Moseley & Goode, 2006). Für beide Stämme könnte eine Konkurrenz des natürlichen, nicht markierten Proteins mit dem GFP fusionierten TpmA um die Bindung an Kabel vorliegen, was dazu führen würde, dass weniger Dynamik und weniger Kabel an sich detektiert werden könnten. Ein Einfluss der Expressionsstärke im Vergleich der beiden Stämme (SNT147 und SARB6) kann, durch die durchgeführte qRT PCR zur Ermittlung der relativen GFP Expression, ausgeschlossen werden (Abb. 2.23). Denn diese

ergab, dass die Expression unter Kontrolle beider Promotoren annähernd gleich ist. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da TpmA ein abundant vorkommendes Protein ist.

Aus den voranstehenden Gründen werden die nachstehenden Vergleiche mit anderen Organismen immer mit den Daten von GFP-TpmA unter dem regulierbaren *alcA* Promotor und de-reprimierenden Bedingungen herangezogen. Diese scheinen am ehesten die natürlichen Bedingungen in *Aspergillus nidulans* widerzuspiegeln.

Vergleicht man die Elongationsraten aus *S. cerevisiae* ( $0,29 \pm 0,08 \mu\text{m/s}$ , Mittelwert  $\pm$  SD; (Yang & Pon, 2002)) und *S. pombe* ( $0,57 \pm 0,09 \mu\text{m/s}$ , Mittelwert  $\pm$  SD; (Johnson *et al.*, 2014)) mit jenen, welche im Zuge dieser Arbeit für *A. nidulans* ( $0,58 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$ , Mittelwert  $\pm$  SEM) berechnet wurden, so fällt auf, dass diese eher denen in der Spalthefe ähneln. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die Spalthefe im Vergleich zur Bäckerhefe eine stärker ausgeprägte Phase polarisierten Wachstums aufweist, was der Situation in *A. nidulans* eher entspricht. Diese Ähnlichkeit zur Spalthefe kann ebenso für andere Vorgänge der Actin Organisation beobachtet werden, so auch für die Etablierung einer *actin polymerisation site*. Während in *S. cerevisiae* *historical landmarks*, wie Knospungsnarben aus vorangegangenen Knospungen, als örtliche Signale für die Etablierung einer neuen Stelle des Wachstums fungieren und F-Actin vermittelter Vesikel Transport zu diesen Stellen für die Etablierung der Zellpolarität hinreichend ist (Chang & Peter, 2003), ist die Actin Organisation in *S. pombe* und *A. nidulans* beeindruckend ähnlich (Fischer *et al.*, 2008). *A. nidulans* besitzt Homologe zu den *S. pombe* Zellendmarkerproteinen Tea1, Tea2 und Mod5, welche mit TeaA, KipA und TeaR respektive benannt sind (Konzack *et al.*, 2005, Takeshita *et al.*, 2008). Es wird postuliert, dass der Polaritätsfaktor-Komplex Tea1-Tea4 mit Hilfe der Mikrotubuli Plusenden via des +TIP Komplexes, der das Kinesin Tea2 einschließt, an die Hyphenspitze transportiert wird. Auf die Membranverankerung des Tea1-Tea4 Komplexes durch Mod5, folgt die Rekrutierung des Polarisom Komplexes. Dieser beinhaltet das Formin For3 und seine Aktivatoren (Martin *et al.*, 2007, Martin *et al.*, 2005, Rincón *et al.*, 2009). Nach Aktivierung vermittelt For3 eine schnelle und prozessive Actin Assemblierung. Dadurch hat die Spalthefe während der Initiierung von polarem Wachstum und Zell-Septierung eine starke Gewichtung auf die Mikrotubuli und seine assoziierten Motorproteine (Chang & Martin, 2009, Estecha *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte eine tatsächliche Co-Lokalisation des Zellendmarkers TeaA mit dem Ursprung des von Lifeact visualisierten Actin Netzwerkes gezeigt werden (siehe auch Abb. 2.25). Deshalb scheint Actin an der *polarity site* polymerisiert zu werden.

Die typische Länge eines Actinkabels in einer Bäckerhefe Zelle mit großer Knospe beträgt circa  $4 \mu\text{m}$  bei einem Zelldurchmesser von etwa  $10 \mu\text{m}$  (Moseley & Goode, 2006). In *S. pombe* überspannen Actinkabel oft die gesamte Zelllänge von einem Zellpol zum anderen, was eine Länge von etwa  $8-14 \mu\text{m}$ , abhängig vom Stadium des Zellzyklus, bedeutet (Kamasaki *et al.*,

2005). Die hier präsentierten Daten zeigen, dass die Actinkabel Länge in *A. nidulans* im Vergleich zur Länge des Hyphenkompartiments und zu den Längen in Hefezellen verhältnismäßig kurz sind. Dies könnte mit der generellen Annahme, dass Mikrotubuli als Schienen für den Langstreckentransport und Actinkabel nur für den Kurzstreckentransport an der Hyphenspitze fungieren, begründet werden. In der Bäckerhefe ist das Actincytoskelett alleine dafür verantwortlich polares Zellwachstum zu initiieren, spezifische mRNAs in der Zelle zu verteilen und für die Weitergabe der Organellen an die Tochterzelle, wohingegen Mikrotubuli lediglich die Chromosomenteilung regeln und mit Actin kooperieren, um die mitotische Spindel zu orientieren (Pruyne & Bretscher, 2000, Liakopoulos *et al.*, 2003). Deshalb ist es nachvollziehbar, dass die Hefezellen Actinkabel besitzen, welche mindestens die Hälfte der Zelle überspannen, denn die andere Hälfte wird von den Actinkabeln, welche von der Knospungseinschnürung stammen, abgedeckt und dadurch der Transport von Organellen und Vesikeln in die Knospe gewährleistet. In der Spalthefe hingegen wird der Ort der Actin Assemblierung zunächst von Mikrotubuli bestimmt (Estechea *et al.*, 2009, Minc *et al.*, 2009, Terenna *et al.*, 2008, Piel & Tran, 2009, Martin *et al.*, 2005). Dadurch ergibt sich eine starke funktionelle Abhängigkeit von den Mikrotubuli für die Etablierung und Aufrechterhaltung des polarisierten Wachstums in *S. pombe*. Eine weitere Erklärung für, die mit 2-5  $\mu\text{m}$  Länge, eher kurzen Actinkabel in *A. nidulans*, ist die im Vergleich zu den Hefen höhere Disassemblierungs-Rate.

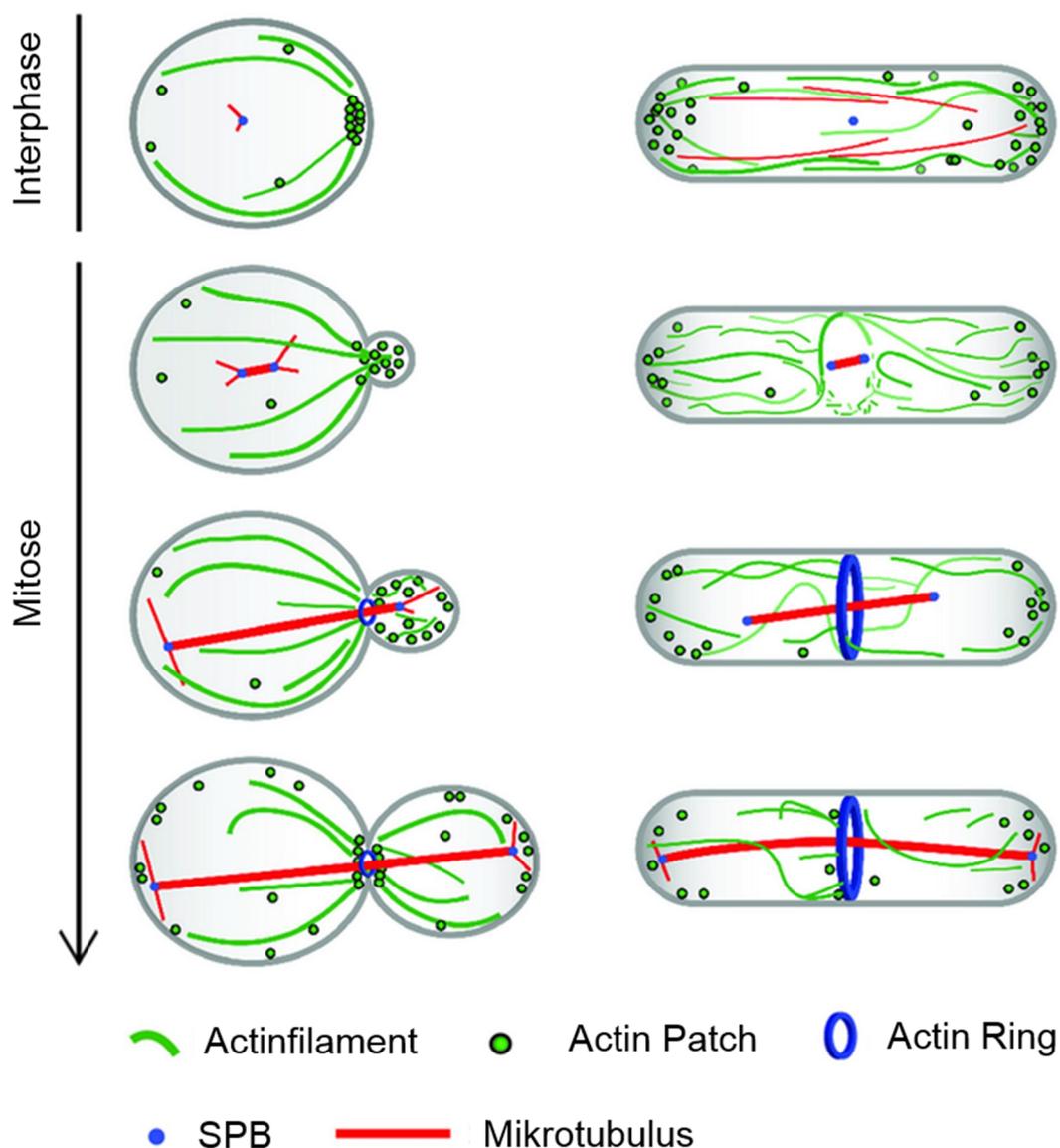
Es gibt keine quantitativen Daten zur Anzahl von Actinkabeln in den Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae*, die Mikroskopie Bilder in den Veröffentlichungen lassen aber vermuten, dass diese zahlreicher sind, als die in der vorliegenden Arbeit errechneten drei Kabel pro Hype in *Aspergillus nidulans*. Diese Beobachtung könnte darauf beruhen, dass in *S. cerevisiae* eine höhere funktionelle Abhängigkeit von Actin besteht und *S. pombe* breitere Zellen ausbildet und dadurch mehr Kabel nötig sind, damit das Actincytoskelett seine Aufgaben erfüllen kann. Hinzu kommt, dass in *A. nidulans* das Cytoskelett generell mehr auf einen spezifischen Punkt an der Hyphenspitze konzentriert zu ist. Dies ist im Einklang mit der Erkenntnis, dass die Mikrotubuli an der Hyphenspitze in einem Punkt konvergieren (Takeshita *et al.*, 2013).

In *S. pombe* ändert sich die Orientierung der Actinkabel im Laufe des Zellzyklus. Während in der Interphase das Formin For3 und die Plusenden der Kabel in Richtung der Zellspitze orientiert sind, sind sie während der Mitose zur Mitte der Zelle orientiert (Kamasaki *et al.*, 2005). In der Bäckerhefe werden Actinkabel von den beiden Forminen Bni1 und Bnr1 hergestellt (Sagot *et al.*, 2002, Evangelista *et al.*, 2002). In knospenden Zellen ist Bni1 hauptsächlich an der Spitze der Knospe lokalisiert, wohingegen Bnr1 an der Knospungseinschnürung zu finden ist. Dieses in sich polarisierte Lokalisierungsmuster ermöglicht einen polaren Transport von Molekülen in die Tochterzelle (Evangelista *et al.*, 2002, Pruynne *et al.*, 2004, Dong *et al.*, 2003, Buttery *et al.*, 2007). In späteren Stadien, kurz vor der

Cytokinese, relokalisiert Bni1 zur Knospungseinschnürung. Daher reorientieren sich die Actinkabel folglich und unterstützen die Cytokinese und wahrscheinlich auch die Abschnürung (Pruyne *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Actinkabel auch während der Mitose an der Spitze von *A. nidulans* Hyphen lokalisieren (siehe auch Abb. 2.28). Die Dynamik dieser Actinkabel war ähnlich derer in Interphase Zellen. Dies ist im Einklang mit dem Ergebnis, dass das Tempo des Hyphenwachstums zwischen Mitose und Interphase nicht unterschiedlich ist (Riquelme *et al.*, 2003). In den Hefen ist die Mitose an eine vollständige Abschnürung der Tochter- von der Mutterzelle gekoppelt, wohingegen in *A. nidulans* das neue Hyphenkompartiment lediglich durch ein Septum vom alten abgetrennt ist, welches den Austausch von Molekülen und Cytoplasma erlaubt. Deshalb muss das Actincytoskelett womöglich keine so drastischen Änderungen in Bezug auf seine Orientierung durchlaufen, um es der Zelle zu ermöglichen die Mitose zu vollziehen. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass Actinkabel von den Septen her assembliert werden, wobei die Lokalisierung an der Hyphenspitze nach wie vor ebenfalls vorhanden war. In den Hefen kann ein solches Phänomen nicht beobachtet werden. Ein möglicher Grund hierfür ist das stetig fortwährende polare Wachstum von *A. nidulans* Hyphen, welches auch während der Septierung und der Mitose weiterhin stattfindet. Hierbei wird das Actin an der Spitze für den Vesikeltransport und die Exocytose benötigt. Ähnlich verhält es sich in *Candida albicans* Hyphen. In diesen ändert sich die Verteilung des Actincytoskeletts über den Zellzyklus hinweg, jedoch polarisieren Actinkabel und -patches über den gesamten Zellzyklus an der Hyphenspitze. Auch hier wurde postuliert, dass dies für das ständig andauernde apikale Wachstum von Nöten ist (Hazan *et al.*, 2002).

Die Lokalisierung des Ursprungs der Actin Polymerisation unterscheidet sich stark zwischen den Hefen und *A. nidulans*. In der Spalthefe werden die Actinkabel zunächst ausschließlich vom sogenannten alten Zellende, welches das wachsende Zellende zu diesem Zeitpunkt des Zellzyklus darstellt, polymerisiert. Später im Zellzyklus, beim sogenannten NETO (*new end take off*), werden die Kabel von beiden Zellenden her polymerisiert. Während der Cytokinese relokalisiert das Actin dann zur Mitte der Zelle, wo es den Actinring formt. Nach der Cytokinese und Abschnürung der Tochter, lokalisieren die Actinkabel erneut am alten Ende der Zellen (Kovar *et al.*, 2011). In der Bäckerhefe werden Actinkabel sowohl von der Spitze der Mutterzelle als auch von der Knospungseinschnürung her polymerisiert und erstrecken sich in Richtung der Knospenspitze, um den Transport von Molekülen zur Fertigstellung der Knospe zu gewährleisten (Pruyne & Bretscher, 2000). In *A. nidulans* werden die Actinkabel von der Spitze her polymerisiert, was für einen filamentösen Pilz sinnvoll erscheint, da das Wachstum ausschließlich an der Spitze stattfindet und hier, für eine effektive und schnelle Vesikel Sekretion, das Actincytoskelett benötigt wird.

Eine schematische Darstellung der Organisation der Cytoskelette in der Bäcker- und Spaltheefe kann der Abbildung 3.1 entnommen werden.



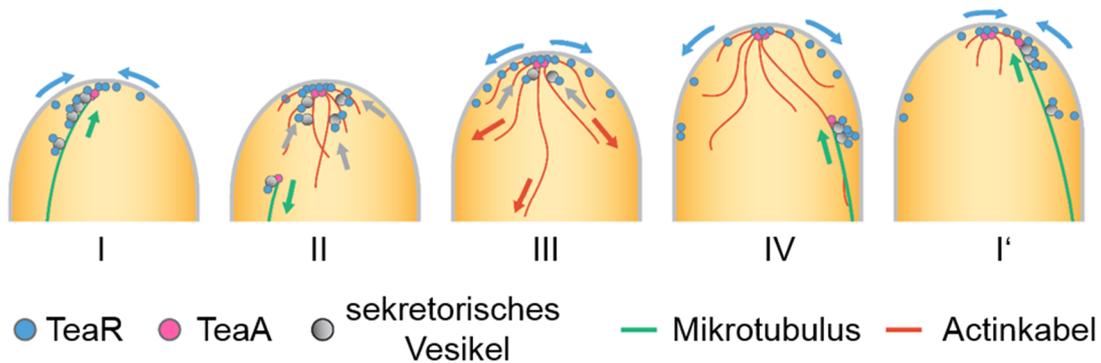
**Abbildung 3.1: Schematische Abbildung der Cytoskelett Organisation in *S. cerevisiae* und *S. pombe* während der Interphase und der Mitose.** Links *S. cerevisiae*, rechts *S. pombe*. Erstes Bild Interphase, andere Bilder Mitose. Für Details siehe Text. Abgeändert nach (Mishra et al., 2014).

### 3.3 Kooperative Polymerisation von Actinkabeln und Mikrotubuli

Die sehr kurzen Actinkabel in *A. nidulans* lassen darauf schließen, dass die Disassemblierungs-Rate des Actincytoskeletts höher ist, als in den Hefen. Hierdurch kommt jedoch die Frage auf, warum sie höher sein sollte. Die gleichzeitige Visualisierung von Actinkabeln und Mikrotubuli zeigte, dass die Assemblierung und Disassemblierung der Actinkabel räumlich und zeitlich mit der Mikrotubuli Dynamik gekoppelt ist (Abschnitt 2.6).

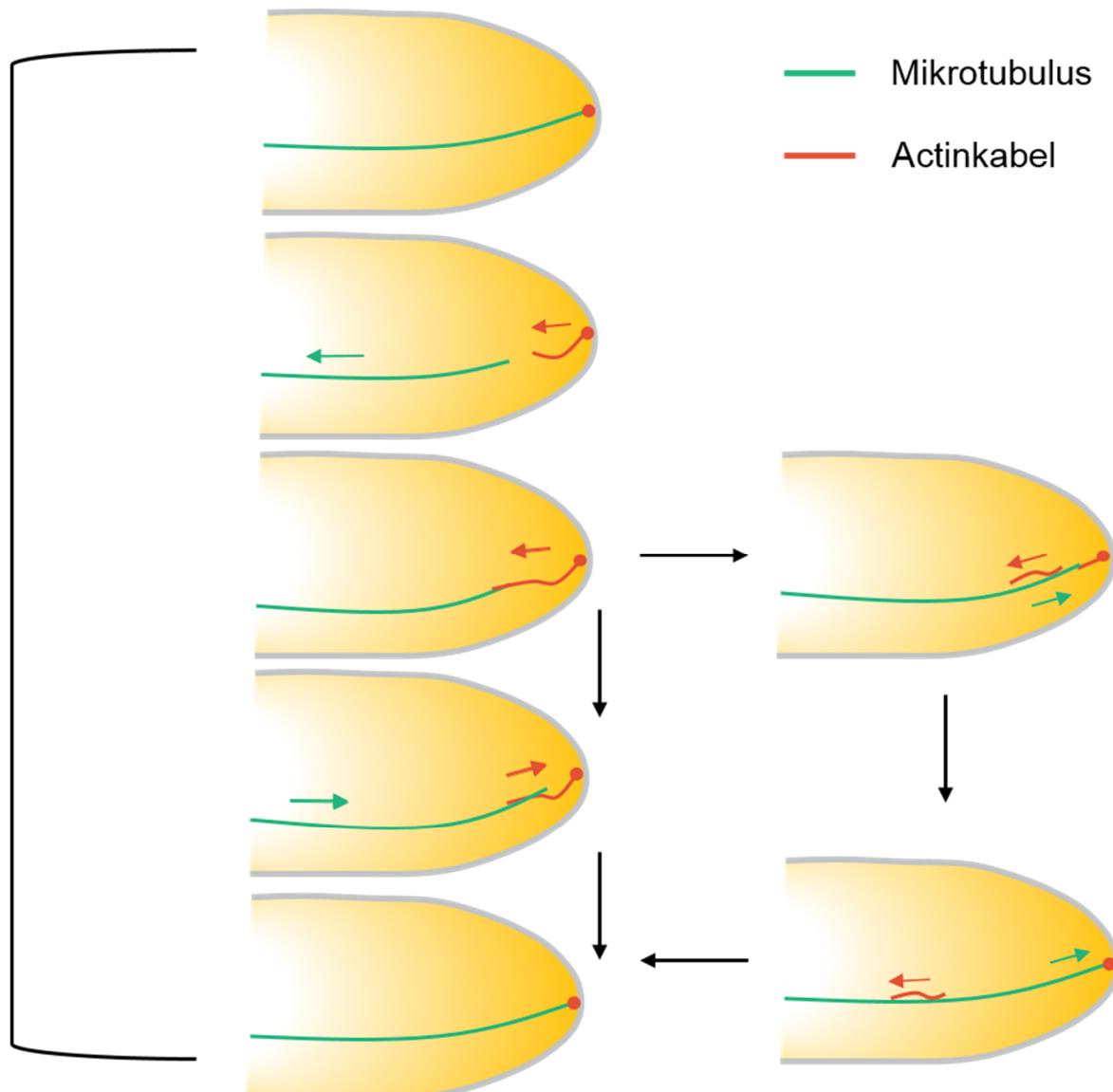
Interphase Mikrotubuli in *A. nidulans* weisen höhere Frequenzen von Polymerisation und Depolymerisation als jene von Hefen auf. In Interphase Zellen von *A. nidulans* berühren 4-8 Mikrotubuli pro Minute den Kortex der Hyphenspitze (Pohlmann *et al.*, 2014), wohingegen Mikrotubuli in *S. cerevisiae* für die Ausbildung der Spindel und die Zellkernwanderung während der Mitose wichtig sind (Huisman & Segal, 2005). In Interphase Zellen von *S. pombe* sind 3-4 Mikrotubuli Bündel entlang der Achse der Zelle organisiert. Die Plusenden erreichen die Zellenden und verweilen dort für 1-2 Minuten bis die Katastrophe stattfindet (Tran *et al.*, 2001). Die hohe Frequenz der Berührung des Zell Kortex von Mikrotubuli in *A. nidulans* ist wahrscheinlich mit der hohen Frequenz der Depolymerisation von Actinkabeln gekoppelt.

Das vorhergehende Modell in *A. nidulans*, auch als „transiente-Polarität-Modell“ bezeichnet (Abb. 3.2), soll im Nachfolgenden kurz beschrieben werden. Die *polarity site* wird vorübergehend von Zellendmarker transportierenden Mikrotubuli an der apikalen Membran etabliert (Abb. 3.2 I). Mikrotubuli Plusenden polymerisieren in Richtung der Hyphenspitze und erreichen dort die Plasmamembran. Hier werden sie durch die Interaktion mit weiteren Proteinen, wie zum Beispiel TeaR, stabilisiert (Takeshita *et al.*, 2013). Sobald die Mikrotubuli die Plasmamembran erreichen, werden weitere hierarchisch untergeordnete Prozesse (*downstream processes*), wie die Actin Polymerisation und Exocytose lokal aktiviert (Abb. 3.2 II). Diese resultiert in der Membranerweiterung an der Spitze und erneuter Bereitstellung (*resupply*) von TeaR an der Plasmamembran (Abb. 3.2 III). Wenn die *polarity site* erst einmal etabliert ist, besteht sie für eine kurze Zeit und währenddessen werden ankommende Mikrotubuli am Verankern gehindert. Der untergeordnete Komplex, welcher Actin beinhaltet bleibt wahrscheinlich länger erhalten, als der Zellendmarker Komplex. Dadurch ist es für neue, die Spitze erreichenden Mikrotubuli möglich ein existierendes Actinkabel als Führungsschiene für die Lieferung einer neuen Ladung an Zellendmarkerproteinen an eine naheliegende Region zu nutzen (Abb. 3.2 IV und I') (Ishitsuka *et al.*, akzeptiert).



**Abbildung 3.2: Modell zur transienten Polarität.** **I:** Die polarity site wird vorübergehend von Zellendmarker transportierenden Mikrotubuli an der apikalen Membran etabliert. **II:** Mikrotubuli Plusenden Polymerisieren in Richtung der Hyphenspitze und erreichen dort die Plasmamembran. Hier werden sie durch die Interaktion mit weiteren Proteinen, wie zum Beispiel TeaR, stabilisiert. Sobald die Mikrotubuli die Plasmamembran erreichen, werden weitere hierarchisch untergeordnete Prozesse (downstream processes), wie die Actin Polymerisation und Exocytose lokal aktiviert. **III:** Diese resultiert in der Membranerweiterung an der Spitze und erneuter Bereitstellung (resupply) von TeaR an der Plasmamembran. **IV und I':** Wenn die polarity site erst einmal etabliert ist, besteht sie für eine kurze Zeit und währenddessen werden ankommende Mikrotubuli am Verankern gehindert. Der untergeordnete Komplex, welcher Actin beinhaltet bleibt wahrscheinlich länger erhalten, als der Zellendmarker Komplex. Dadurch ist es für neue, die Spitze erreichenden Mikrotubuli möglich ein existierendes Actinkabel als Führungsschiene für die Lieferung einer neuen Ladung an Zellendmarkerproteinen an eine nahegelegene Region zu nutzen. Abgeändert nach (Ishitsuka et al. 2015, akzeptiert).

Aus dem vorherigen Modell der transienten Polarität (Abb. 3.2) und den hier präsentierten Ergebnissen resultiert folgendes Modell (Abb. 3.3). Ein wachsender Mikrotubulus erreicht den Zell Kortex, wo Zellendmarker mit dem Ursprung der Actinkabel co-lokalisieren (Abb. 2.25) (Takeshita *et al.*, 2013). Durch das Erreichen der Plasmamembran bringt der Mikrotubulus den Zellendmarker TeaA an die Spitze (Takeshita *et al.*, 2013). Dadurch werden weitere Komponenten des Zellendmarkerkomplexes rekrutiert und der Mikrotubulus transient stabilisiert (Ishitsuka *et al.*, akzeptiert). Durch den Zellendmarker Komplex werden dann, indirekt, infolge der Positionierung des Formins SepA, die Actinkabel polarisiert. Wenn der Mikrotubulus zu depolymerisieren beginnt, fängt ein Actinkabel an vom Kortex her in Richtung des Plusende des depolymerisierenden Mikrotubulus zu polymerisieren, bis beide kurzzeitig überlappen. Die Depolymerisationsrate der Mikrotubuli beträgt  $0,5 \mu\text{m/s}$  (Han *et al.*, 2001), was mit der Polymerisationsrate von Actinkabeln vergleichbar ist. Der Mikrotubulus beginnt erneut entlang des Actinkabels in Richtung des apikalen Kortex zu polymerisieren, während das Actinkabel depolymerisiert. Gelegentlich werden längere Actinkabel geteilt und der hintere Teil des Actinkabels entlang des Mikrotubulus in distale Bereiche der Hyphe transportiert (Abb. 3.3, rechts). Dies stellt die fehlende Komponente im Modell der transienten Polarität dar.

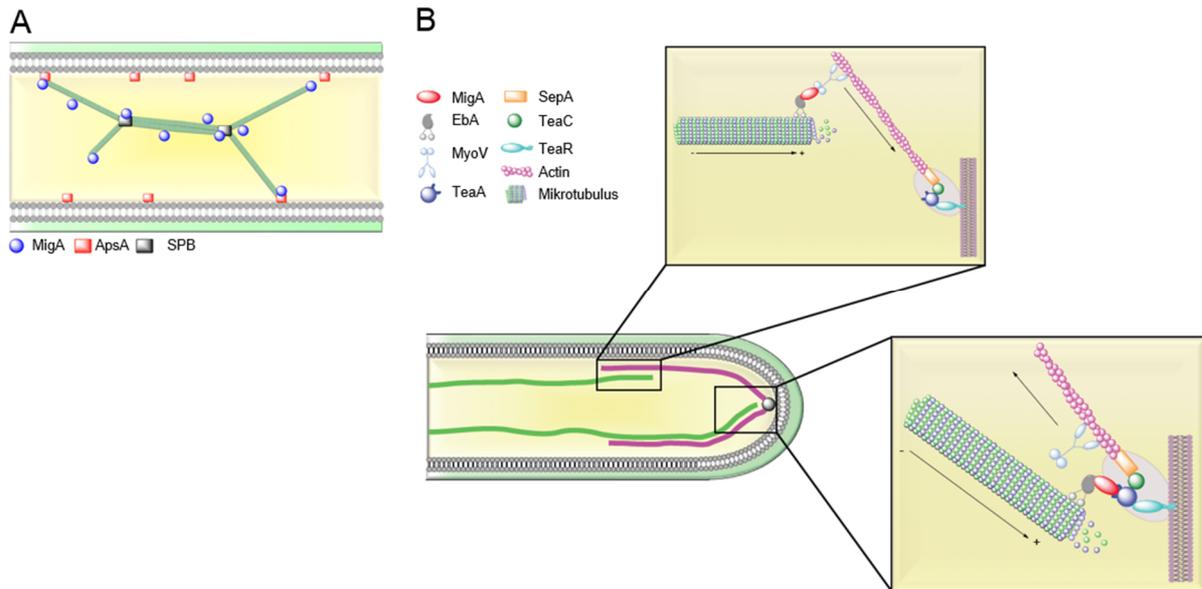


**Abbildung 3.3: Modell für die kooperative Assemblierung von Actinkabeln und Mikrotubuli in *A. nidulans*.** Ein wachsender Mikrotubulus erreicht den Zell Kortex, wo Zellendmarker mit dem Ursprung der Actinkabel colokalisieren. Durch das Erreichen der Plasmamembran bringt der Mikrotubulus den Zellendmarker TeaA an die Spitze. Dadurch werden weitere Komponenten des Zellendmarkerkomplexes rekrutiert und der Mikrotubulus transient stabilisiert. Durch den Zellendmarker Komplex werden dann, indirekt, infolge der Positionierung des Formins SepA, die Actinkabel polarisiert. Wenn der Mikrotubulus zu depolymerisieren beginnt, fängt ein Actinkabel an vom Kortex her in Richtung des Plusende des depolymerisierenden Mikrotubulus zu polymerisieren, bis beide kurzzeitig überlappen. Der Mikrotubulus beginnt erneut entlang des Actinkabels in Richtung des apikalen Kortex zu polymerisieren, während das Actinkabel depolymerisiert. Gelegentlich werden längere Actinkabel geteilt und der hintere Teil des Actinkabels entlang des Mikrotubulus in distale Bereiche der Hyph transportiert.

Anhand des Modells kommt die Frage auf, warum die Assemblierung und Disassemblierung von Mikrotubuli und Actinkabeln in *A. nidulans* kooperativ ist, wohingegen dies in den Hefen nicht der Fall ist. Einer der Gründe für dieses Phänomen ist, dass in *A. nidulans* sowohl Actinkabel als auch Mikrotubuli in den Membran Transport involviert sind. In Hefe spielen die Actinkabel die Hauptrolle im Vesikel Transport (Mishra *et al.*, 2014). In langen Hyphen werden sekretorische Vesikel mit Hilfe des Transports entlang der Mikrotubuli zur Spitze transportiert und fusionieren mit Hilfe des Actin abhängigen Myosin V Transports mit der Membran an der

Hyphenspitze (Taheri-Talesh *et al.*, 2008, Taheri-Talesh *et al.*, 2012, Takeshita *et al.*, 2015, Egan *et al.*, 2012). Wenn sekretorische Vesikel an der Hyphenspitze von Mikrotubuli zu Actin transferiert werden müssen, könnte die Verbindung zwischen Mikrotubuli und Actin den effektiven Transfer und dadurch effektive Vesikel Sekretion gewährleisten. Der kooperative Polymerisations-Mechanismus zwischen den beiden Cytoskeletten trägt womöglich zusätzlich zur richtigen Organisation des Spitzenkörpers bei (Harris *et al.*, 2005, Sanchez-Leon *et al.*, 2011, Riquelme & Sanchez-Leon, 2014).

Außerdem könnten Actinkabel in die Lenkung von Mikrotubuli involviert sein. In der Bäckerhefe lokalisiert Kar9 an Mikrotubuli Plusenden und wird für die korrekte, Actin und Myosin abhängige, Anordnung der Spindel anhand der Mutter-Knospen-Achse benötigt (Yin *et al.*, 2000). In Säugetieren lokalisiert das funktionelle Homolog von Kar9, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), an Mikrotubuli Plusenden und reguliert die Organisation des Mikrotubuli Cytoskeletts (McCartney & Näthke, 2008, Gundersen, 2002). Zusätzlich interagiert APC direkt mit dem Formin mDia1 und stimuliert hierdurch die Assemblierung von Actinkabeln (Okada *et al.*, 2010). Ein funktionelles Homolog von APC und Kar9, MigA, ist auch in *A. nidulans* konserviert (Manck *et al.*, 2015). Hier könnte ein ähnlicher Mechanismus in die Regulierung der Actinkabel Assemblierung involviert sein. Dieser würde auch eine Erklärung für die längeren Actinkabel im *alpA* Deletionsstamm darstellen (siehe Abschnitt 2.7). Das erst kürzlich publizierte Modell für den MigA Signalweg besagt zwei verschiedene Mechanismen der Funktion von MigA einerseits während der Mitose und andererseits in der Interphase. Während der Mitose lokalisiert MigA dynamisch an beiden Spindelpolen und entlang der Spindel. Von den Spindelpolen aus wird MigA auf astrale Mikrotubuli geladen und zu den Mikrotubuli Plusenden transportiert. An der Plasmamembran ermöglicht MigA die Interaktion zwischen astralen Mikrotubuli und ApsA, welches ein kortikales Protein ist und einen Anker für astrale Mikrotubuli darstellt. Dieser Mechanismus ist vornehmlich während der frühen Phase der Mitose wichtig. In der Interphase elongieren Mikrotubuli in Richtung des Apex. MigA bindet unabhängig von anderen Faktoren an TubA, wird EbA abhängig an die Plusenden der Mikrotubuli transportiert und erreicht so die Hyphenspitze. EbA ist ein Homolog des EB1 Proteins, welches ein Interaktionspartner von APC ist (Su *et al.*, 1995). Diese Interaktion ist für die Bindung an Mikrotubuli notwendig (Fodde *et al.*, 2001). An der Spitze interagiert MigA mit MyoE, welches ein Myosin Motor ist und deshalb MigA und somit den an MigA gebundenen Mikrotubulus entlang eines Actinfilaments in Richtung des Zellendmarker Komplexes mitzieht. Sobald MigA den Kortex erreicht hat, interagiert es transient mit dem Zellendmarker TeaA und verankert den Mikrotubulus dadurch kurzzeitig an der *polarisation site* (Manck *et al.*, 2015). Eine schematische Abbildung dieses Modells kann der Abbildung 3.4 entnommen werden.



**Abbildung 3.4: Modell des MigA Signalwegs während der Mitose und Interphase. A:** Mitose. MigA lokalisiert dynamisch an beiden Spindelpolen und entlang der Spindel. Von den Spindelpolen aus wird MigA auf astrale Mikrotubuli geladen und zu den Mikrotubuli Plusenden transportiert. An der Plasmamembran ermöglicht MigA die Interaktion zwischen astralen Mikrotubuli und ApsA. Dieser Mechanismus ist vornehmlich während der frühen Phase der Mitose wichtig. **B:** Interphase. Mikrotubuli elongieren in Richtung des Apex. MigA bindet unabhängig von anderen Faktoren an TubA, wird EbA abhängig an die Plusenden der Mikrotubuli transportiert und erreicht so die Hyphenspitze. An der Spitze interagiert MigA mit MyoE, welches MigA mitzieht und somit den an MigA gebundenen Mikrotubulus entlang eines Actinfilaments in Richtung des Zellendmarker Komplexes. Sobald MigA den Kortex erreicht hat, interagiert es transient mit dem Zellendmarker TeaA und verankert den Mikrotubulus dadurch kurzzeitig an der polarisation site. Abgeändert nach (Manck et al., 2015).

### 3.4 Calciumoszillationen

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) übersetzt externe Stimuli in spezifische zelluläre oder entwicklungs-relevante Antworten in Organismen von einzelligen Mikroben, über Tiere, bis hin zu Pflanzen (Clapham, 1995, Nguyen *et al.*, 2008, Dodd *et al.*, 2010). Es wurde postuliert, dass der Influx und Efflux von  $\text{Ca}^{2+}$  in Antwort auf spezifische externe Stimuli über Organellen- und Plasmamembranen mit Hilfe von verschiedenen Kanälen und Transportern die zeitliche und räumliche Verteilung von cytoplasmatischem  $\text{Ca}^{2+}$  definiert. Die resultierenden „Calcium-Signaturen“ werden durch die koordinierte Arbeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteinen, wie Calmodulin, Calmodulin-ähnlichen Proteinen, Calcineurin,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinasen, bestimmten Elementen des Cytoskeletts und Proteinen, die direkt oder indirekt mit Calcium-Bindeproteinen interagieren, in spezifische zelluläre Antworten übersetzt (Clapham, 1995, Dodd *et al.*, 2010). Dieser Calcium-Signalweg kontrolliert Sporulation und Auskeimung (Choi *et al.*, 2009, Shaw & Hoch, 2000), Hyphenwachstum und Differenzierung (Brand *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2011), sexuelle Entwicklung (Cavinder *et al.*, 2011, Hallen *et al.*, 2007), circadiane Rhythmen (Yang *et al.*, 2001), Toxin Biosynthese (Chung, 2003), Appressorien Bildung (Choi *et al.*, 2009, Choi *et al.*, 2011) und Pathogenese in Pflanzen und Tieren (Bowman *et al.*, 2009, Nguyen *et al.*, 2008, Steinbach *et al.*, 2006). Zusätzlich reguliert die intrazelluläre Calciumkonzentration die Actin

Assemblierung und Vesikel Fusion (Janmey, 1994, Schneggenburger & Neher, 2005). Im Zuge dieser Arbeit wurde die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration in lebenden *A. nidulans* Hyphen mit Hilfe des Calcium-Biosensors Cameleon in FRET Experimenten untersucht. Diese zeigten  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillationen an Hyphenspitzen. Die Frequenz dieser Oszillationen ist mit derer der Disassemblierung von Actinkabeln und jener des Berührens des Kortex von Mikrotubuli vergleichbar. Obgleich innerhalb dieses Systems keine direkten Beweise für eine Verknüpfung dieser Ereignisse bestehen, konnte in pflanzlichen Pollenschläuchen und Wurzelhaaren eine Verknüpfung der Calciumoszillation mit einer Änderung der Wachstumsrate gezeigt werden (Monshausen *et al.*, 2008, Holdaway-Clarke *et al.*, 1997). In Säugetier Zellen korrelieren Oszillationen der kortikalen Actin und Calcium Konzentrationen mit den Zyklen der Vesikel Sekretion (Wollman & Meyer, 2012). Hierbei beginnt die Vesikel Sekretion mit der Erfassung von Vesikeln durch Actin, wobei die Konzentration an kortikalem Actin hoch ist. Sinkt die Actin Konzentration daraufhin ab, können die Vesikel den Kortex passieren. Letztlich sorgt ein Anstieg in der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration für die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran (Wollman & Meyer, 2012). Koordinierte Zyklen des Zellwachstums scheinen ein konserviertes Phänomen in einer Vielzahl von Organismen zu sein, darunter auch filamentöse Pilze (Lopez-Franco *et al.*, 1994), Säugetier Zellen (Wollman & Meyer, 2012) und Spaltheife (Das *et al.*, 2012). Zu den filamentösen Pilzen mit nachgewiesenen Calciumoszillationen an der Hyphenspitze gehören *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium graminearum* und *Fusarium oxysporum* (Kim *et al.*, 2012a). Calciumoszillationen spielen höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Regulation der Actin Polymerisation und im Triggern der synchronisierten Fusion von akkumulierten sekretorischen Vesikeln innerhalb eines bestimmten Areal. Möglicherweise auch in *A. nidulans*. Um jedoch eine definitive Aussage über diese Vorgänge treffen zu können, wären weitere Experimente nötig. Denkbar wäre zum Beispiel eine Untersuchung des Zusammenhangs der Calcium Konzentration und der Vesikel Fusion mit der Plasmamembran, durch co-Expression von Cameleon und einem Vesikel Marker, wie SynA. Zusätzlich könnte die Wachstumsrate von Cameleon exprimierenden Zellen bestimmt werden, um einen möglichen Zusammenhang zu bestätigen. Darüber hinaus wäre die co-Expression von Actinmarkern und Cameleon, beziehungsweise fluoreszenzgekoppeltem TubA und Cameleon sowie eine Expression aller drei Komponenten hilfreich, um die Zusammenhänge dieser Prozesse zu verstehen.

### 3.5 Der Actinring und der Zellendmarker TeaR in Septinmutanten

Mit Hilfe der Deletionsmutanten von *aspA* und *aspB* konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass Septine für die korrekte Lokalisation des Zellendmarkers TeaR und des von AbpA visualisierten Actinrings verantwortlich sind. Im Falle der *aspB* Deletion konnte eine

Dislokalisierung beider Proteine beobachtet werden, welche in einem weitreichenderen Signal für TeaR und stärker verteilten Actinpatches resultierte. Im Wildtyp Hintergrund bildete das AbpA Signal eine Grenze für das TeaR Signal. Im Falle der *aspA* Deletion konnten eine sehr ähnliche Dislokalisierung beobachtet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass auch in *A. nidulans*, Septine daran beteiligt sind die Zellendmarker und andere für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Polarität wichtige Faktoren, in bestimmten Arealen der Membran zu halten. Diese Restriktion in spezifischen Membrandomänen konnte bereits in der Bäckerhefe und Säugern gezeigt werden (Barral *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 1999). Das Säuger Septin H5 interagiert direkt mit den Phosphatidylinositolen aus der Membran (Zhang *et al.*, 1999). Die Sequenz, welche für diese Bindung verantwortlich ist, ist in Hefen konserviert, weshalb es wahrscheinlich ist, dass Hefe Septine auch mit Lipiden interagieren (Barral *et al.*, 2000). Septin Filamente rekrutieren und immobilisieren diese Lipide womöglich und beeinflussen so die Fluidität der Membran (Barral *et al.*, 2000). Lösliche kortikale Proteine wären von diesem Effekt nicht betroffen und könnten somit frei durch die Zone der Knospungseinschnürung diffundieren und sich uneingeschränkt zwischen Mutter und Knospe bewegen. Wohingegen andere Komponente, wie zum Beispiel Actinpatches, sich unbeschränkt zwischen den beiden Kompartimenten bewegen können. Diese kortikale Grenze ermöglicht es den Septinen den zellulären Kortex in Domänen zu unterteilen. Zusätzlich sind Septine für die korrekte Lokalisierung des endocytotischen Actinrings wichtig zu sein. Dies geht Hand in Hand mit der Beobachtung, dass Septine in Hefen dazu notwendig sind das Actincytoskelett korrekt zu organisieren. Die Septine könnten hier eine Funktion als Gerüst für die korrekte Assemblierung des Rings haben. Im Wildtyp lokalisieren Spa2, Sec3 und Sec5 am Kortex isotrop wachsender Knospen und die Proteine können nicht in der Mutter Zelle detektiert werden (Barral *et al.*, 2000). Die Proteine Spa2, Sec3 und Sec5, welche Komponenten des Polarisoms (Spa2, (Snyder, 1989, Sheu *et al.*, 1998)) beziehungsweise des Exocyst Komplexes (Sec3 und Sec 5, (TerBush *et al.*, 1996, Finger *et al.*, 1998)) sind, depolarisieren sehr schnell nach Verlust des Septin Rings und verteilten sich zwischen Mutter Zelle und Knospe, wohingegen Spa2, Sec3 und Sec5 am Kortex isotrop wachsender Knospen im Wildtyp lokalisieren und nicht in der Mutter Zelle detektiert werden können (Barral *et al.*, 2000). Während des apikalen Wachstums beeinflussen Septin Defekte die Lokalisierung kortikaler Marker nicht (Adams & Pringle, 1984, Snyder *et al.*, 1991), doch während des isotropen Wachstums der Knospe ist der Septin Ring für die richtige Verteilung der Proteine Spa2, Sec3 und Sec5 notwendig und verhindert, dass diese kortikalen Proteine von der Knospe in die Mutter Zelle wandern. Außerdem hält der Septin Ring die Actin Polarisierung während des isotropen Wachstums aufrecht (Barral *et al.*, 2000). Es ist möglich, dass dies auch in *A. nidulans* der Fall ist, jedoch wären weitere Experimente nötig, um eine eindeutige Zuordnung dieser Funktionen zu den Aufgaben der Septine zu treffen.

### 3.6 Photo Activated Light Microscopy (PALM) von Mikrotubuli

Durch die Verwendung von hochauflösender Mikroskopie in Form von PALM Experimenten, sollten im Zuge der vorliegenden Arbeit das Mikrotubuli Cytoskelett in *A. nidulans* genauer untersucht werden. Hierbei war vor allem von Interesse zu determinieren, ob Bündel oder einzelne Mikrotubuli in der Zelle vorliegen. Hierzu wurde zunächst eine Fusion des fotokonvertierbaren Fluorophors *mEosFPthermo* an das *A. nidulans*  $\alpha$ -Tubulin Gen *tubA* hergestellt. Dieser Stamm stellte sich jedoch als ungeeignet heraus, da der cytoplasmatische Hintergrund viel zu hoch war, um zusammenhängende Mikrotubuli Strukturen zu visualisieren (Abb. 2.39). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass mit Hilfe von PALM Experimenten einzelne Moleküle dargestellt werden und TubA, zusätzlich zu seiner Lokalisation in Mikrotubuli, auch monomer im Cytoplasma vorliegt. Aus diesem Grund wurden die Rigor Motormutanten KinA<sup>rigor</sup> und UncA<sup>rigor</sup>short, welches eine kurze Version von UncA darstellt, die an alle Mikrotubuli bindet (Seidel *et al.*, 2012), an *mEosFPthermo* fusioniert. Die hier durch PALM Experimente ermittelten Durchmesser für Mikrotubuli stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit einzelne Mikrotubuli dar, da die errechneten Werte (KinA<sup>rigor</sup>: 42,04  $\pm$  3,86 nm, Mittelwert  $\pm$  SD; UncA<sup>rigor</sup>short: 32,95  $\pm$  16,80 nm, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) eher dem theoretischen Wert des Durchmessers eines Mikrotubulus (25 nm, (Hawkins *et al.*, 2010)), als dem eines Bündels ähneln. Hierbei unterscheiden sich die Werte für die KinA und die UncA Mutante nur geringfügig. Es wäre interessant diese Methode zum Vergleich des Durchmessers von Bündeln und einzelnen Mikrotubuli zu nutzen. Die Epifluoreszenzmikroskopie ist hingegen gänzlich ungeeignet solche Experimente durchzuführen, da die hier errechneten Werte mindestens um den Faktor einhundert höher waren, als die in den PALM Experimenten ermittelten Werte. Einen Nachteil birgt diese Methode jedoch, denn die Zellen müssen, um eine solche hohe Auflösung erzielen zu können, fixiert werden. Hierdurch könnten Artefakte entstehen. Zusätzlich ist es dadurch nicht möglich die Dynamik der Mikrotubuli zu beobachten. Die Auflösung wird in PALM Experimenten von motilen Molekülen nochmal bis zu um den Faktor zehn schlechter (Yuji Ishitsuka, persönliche Kommunikation). Die hier gezeigte simultane Anfärbung der Zellwand durch WGA-FITC (siehe Abb.2.42) könnte für Experimente genutzt werden, in denen die Distanz der Mikrotubuli zur Zellwand errechnet werden soll. Dies könnte im Zusammenhang mit Mutanten, die Defekte in der Mikrotubuli Organisation haben interessant sein. Ein Beispiel hierfür wäre die Deletion des kortikalen MpmA Proteins, dessen Funktion vermutlich die Verankerung der Mikrotubuli an der Plasmamembran ist (Norio Takeshita, persönliche Kommunikation). Denkbar wären auch Experimente in lebenden Zellen, welche, unter Verlusten der Auflösung, Aufschluss über das Berühren der Mikrotubuli des Kortex geben könnten.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Kits wurden von 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) und Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

### 4.2 Verwendete Organismen und Kultivierungen

#### 4.2.1 Kultivierung von *Aspergillus nidulans* und verwendete Stämme

Die Stämme von *Aspergillus nidulans* wurden auf Platten mit Minimal Medium (4.1) oder in flüssigem Minimal Medium inokuliert. Das Minimal Medium wurde je nach Bedarf des *A. nidulans* Stammes mit entsprechenden Auxotrophiemarkern versehen. Die Expression der Proteine unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors wurde mit 2 % Glycerin (De-Reprimierung), 2 % Threonin (Überexpression) oder 2 % Glucose (Reprimierung) induziert. Für Festmedien wurde zusätzlich 1,5 % Agar eingewogen. Die Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben über Nacht bei 180 rpm im Schüttler inkubiert. Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, bei 37°C.

Tabelle 4.1: Medien für die Kultivierung von *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung für 1l Medium
Minimal Medium (MM)	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

Medium	Zusammensetzung für 1l Medium
	10 ml Ammoniumtartrat 100 ml Glucose pH 6,8; 15 g Agar
MMR-Top-Agar	20 ml Salzstammlösung ohne Stickstoff 1 ml Spurenelemente Lösung 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 $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ ; 5 g $MnCl_2 \times 4 H_2O$ ; 5 g $FeSO_4 \times 7 H_2O$ ; 1,6 g $CoCl_2 \times 5 H_2O$ ; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$ ; 50 g $Na_4EDTA$ ; mit 4 N KOH-Lösung auf pH 6,5-6,8 einstellen
Salzstammlösung (20 x)	120 g $NaNO_3$ ; 10,4 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ; 30,4 g $KH_2PO_4$
Stickstoff-freie Salzstammlösung (50 x)	26,0 g $KCl$ ; 26,0 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ; 76,0 g $KH_2PO_4$ pH ~ 4,0

Tabelle 4.1: 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 4.2: Verwendete *A. nidulans* Stämme

Name	Genotyp	Referenzen oder Quellen
ASH5	<i>pyrG89 ΔaspB::AfpYrG; biA1; methG1</i>	(Lindsey <i>et al.</i> , 2010)
AYR1	<i>pyrG89 ΔaspB::AfpYrG; pyroA4; riboB2</i>	(Hernandez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2012)
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4</i>	(Waring <i>et al.</i> , 1989)
MAD1420	<i>pabaA1; pyrG89; abpA::GFP; AfpYrG</i>	(Araujo-Bazan <i>et al.</i> , 2008)
RMS011	<i>pabaA1; yA; 2ΔargB::trpCΔB</i>	(Stringer <i>et al.</i> , 1991)
SARB1	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4; [alcA(p)-meosthermofp-tpmA, pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SARB44	(SSH62 gekreuzt mit SARB6) <i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4; [alcA(p)-gfp-tpmA; pyr-4][alcA(p)-mcherry-tubA; pyroA]</i>	Diese Arbeit
SARB6	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4; [tpmA(p)-gfp-tpmA; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SARB7	(SNT147 gekreuzt mit RMS011) <i>pabaA1; pyrG89; ΔargB::trpCΔB; argB2; ΔnkuA::argB; [alcA(p)-gfp-tpmA; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SCS13a	<i>pyrG89; argB2; pyroA4; ΔnkuA::argB; ΔalpA; pyr-4</i>	(Enke <i>et al.</i> , 2007)

Name	Genotyp	Referenzen oder Quellen
SNT127	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4;</i>  <i>[alcA(p)::mEosFPthermo::tear; pyr-4]</i>	Ishitsuka et al., eingereicht.
SNT147	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4; [alcA(p)-gfp-tpmA; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SNT148	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4; [alcA(p)-lifeact-mruby; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SNT149	(SARB7 gekreuzt mit SNT148) <i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; [alcA(p)-gfp-tpmA::pyr-4][alcA(p)-lifeact-mRuby; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SNT150	(SNT52 gekreuzt mit SNT95) <i>pyrG89?; argB2; ΔnkuA::argB; [alcA(p)-lifeact-gfp::pyr-4] [teaA(p)-mrfp1-teaA; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SNT152	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4; [alcA(p)-cameleon; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SNT153	<i>pyrG89; ΔaspB::AfpG; pyroA4;</i>  <i>alcA(p)::mEosFPthermo::tear; pyr-4</i>  (AYR1 crossed with SNT127)	Diese Arbeit
SNT154	<i>pyrG89; ΔaspB::AfpG; abpA::GFP; AfpG;</i>  <i>alcA(p)::mEosFPthermo::tear; pyr-4</i>  (SNT153 crossed with MAD1420)	Diese Arbeit

Name	Genotyp	Referenzen oder Quellen
SNT155	<i>pyrG89; abpA::GFP; AfpyrG;</i> <i>alcA(p)::mEosFPthermo::teaR; pyr-4</i>	Diese Arbeit
SNT156	(SNT127 crossed with MAD1420) <i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4;</i> <i>[alcA(p)::mEosFPthermo::KinA<sup>rigor</sup>; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SNT157	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4;</i> <i>[alcA(p)::mEosFPthermo::UncA<sup>rigor</sup>1-445; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SNT52	<i>paba1; pyrG89?; argB2; [teaA(p)::mrfp1::teaA; pyr-4]</i>	(Takeshita <i>et al.</i> , 2008)
SNT95	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4; [alcA(p)-lifeact-gfp; pyr-4]</i>	Diese Arbeit
SSH62	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4;</i> <i>[alcA(p)::mcherry::tubA; pyroA]</i>	(Takeshita <i>et al.</i> , 2013)
TN02A3	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
SNT132	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4;</i> <i>[alcA(p)::mEosFPthermo::TubA; pyroA]</i>	Diese Arbeit
sCS5-NZ	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4;</i> <i>[alcA(p)::KinA<sup>rigor</sup>::RFP; pyrG]</i>	(Zekert & Fischer, 2009)
sCoS11	<i>pyrG89; argB2; ΔnkuA::argB; pyroA4;</i> <i>[alcA(p)::sGFP::UncA1-445<sup>rigor</sup>]</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)

Tabelle 4.3: Liste der Auxotrophie Marker 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

#### 4.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli* und verwendete Stämme

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

Tabelle 4.4: Verwendete *E. coli* Stämme

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

Tabelle 4.5: 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;

Medium	Zusammensetzung für 1l Medium
	2,03 g MgCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O;
	2,46 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O;
	3,6 g Glukose

Tabelle 4.6: Antibiotikum für *E. coli* Medien

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	1 µg / ml

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

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

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte, je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente, 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 1 kb DNA Marker (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-Licht Bestrahlung (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.

Restriktionsverdauungen wurden zur Überprüfung der richtigen Klone in einem 10 µl Ansatz und für Klonierungen in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Die Ansätze enthielten etwa 0,3-1 µl (5-100 U/µl) des jeweiligen Restriktionsenzymes (New England Biolabs, Frankfurt). Nach den Herstellerempfehlungen wurden die Zusammensetzung für die Ansätze und die Reaktionstemperatur 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 erfolgte in einem Verhältnis von 3:1. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16 °C oder 1 h bei Raumtemperatur mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt). Teilweise waren Zwischenklonierungen in den Vektor pJET1.2/*blunt Cloning Vector* nötig und diese wurden nach Herstellerangaben mit Hilfe des CloneJET™ PCR Cloning Kits (Fermentas) durchgeführt.

### 4.3.2 PCR, verwendete Oligonukleotide und Herstellung DIG-markierter Sonden

PCR-Reaktionen wurden entweder mit der *Taq*-, Phusion- oder Q5-Polymerase durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH in Erlangen bezogen. Das Gesamtvolumen einer Standardreaktion betrug 50 µl mit 200 µM dNTPs und 0,2 µM Primern. Die Durchführung der PCR wurde für die jeweiligen Polymerasen nach Herstellerangaben angewendet und die Primer Schmelztemperatur sowie die Elongationszeit der Fragmentlänge der PCR Produkte 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 DNA Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit oder innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena).

**Tabelle 4.8 : Verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
Cameleon-f-kpn4	<u>ggtacc</u> GTCGAATTCAAGCTGCTAGC	Lokalisierung
Cameleon-r-pac4	<u>ttaatt</u> AATGATTATCGATAAGCTTGCG	Lokalisierung
Eos-st-r-pac	<u>ttaatt</u> AACCGTCTGGCATTGTCAG	Lokalisierung
GFP_fw	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTT	Southern Blot Sonde
GFP_rev	TTTGTATAGTTCATCCATGCC	Analytische PCR
GFP_sto_Pacl_rev	<u>TTAATTAA</u> attTTTGTATAGTTCATCCATGCC	Lokalisierung
H2B FW-qRT	CTGCCGAGAAGAAGCCTAGCAC	qRT-PCR
H2B Rev-qRT	GAAGAGTAGGTCTCCTTCCTGGTC	qRT-PCR
IrisEos_KpnI_fwd	<u>Tggtacc</u> ATGAGTGCGATTAAGCCAGAC	Lokalisierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
Lifeact_fw	ATGGGAGTAGCAGATCTAAT	Analytische PCR
lifeact_mRuby_f2	CATGGTACCATGGGAGTAGCAGATCTAAT	Lokalisierung
lifeact_mRuby_rev_Pacl	TC <u>Attaattaa</u> TCACCCTCCGCcCAGG	Lokalisierung
lifeact-f-kpn	<u>ggtacc</u> ATGGGAGTAGCAGATCTAAT	Lokalisierung
qRT_GFP_fw	GGCCAACACTTGTCACTACT	qRT PCR
qRT_GFP_rev	CACGTGTCTTGTAGTTCCC	qRT PCR
tpmA(P)_for	CGA <u>gaattc</u> ACCGGCCTGGTTCGAAAT	Lokalisierung
tpmA(P)_rev	CAT <u>ggtacc</u> GGTGGAGGGCTAGCAGC	Lokalisierung
tpmA_fw	GGCGCGCCcatGGACAGAATCAAGGAG	Lokalisierung
tpmA_rev	<u>ttaatt</u> AAACACTGTTCAAGGAG	Lokalisierung
TpmA_rev	ATTGAAAAGCCATTGAGGTC	Southern Blot Sonde

Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen.

### 4.3.3 Hergestellte und verwendete Plasmide

Folgende Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit hergestellt oder verwendet.

**Tabelle 4.9: Verwendete und hergestellte Plasmide**

Plasmid	Beschreibung	Referenzen oder Quellen
pARB1	<i>alcA(p)::meosFPthermo::tpmA; pyr-4</i>	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenzen oder Quellen
pARB10	<i>alcA(p)::cameleon; pyr-4</i>	Diese Arbeit
pARB7	<i>tpmA(p)::gfp::tpmA; pyr-4</i>	Diese Arbeit
pCMB17apx	<i>alcA(p)::gfp</i> , for N-terminal tagging of GFP to proteins of interest; contains <i>Neurospora crassa pyr-4</i>	(Efimov <i>et al.</i> , 2006)
pCos25	<i>uncA(p)::GFP::UncA<sup>rigor</sup> 1-445; pyr-4</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
pCS4	<i>alcA(p)::GFP::KinA<sup>rigor</sup>; pyr-4</i>	(Zekert & Fischer, 2009)
pEGFP-N1-Lifeact	Lifeact Sequenz kloniert in pEGFP-N1 (Clontech)	(Riedl <i>et al.</i> , 2008)
pEGFP-N1-Lifeact	Lifeact Sequenz kloniert in pEGFP-N1 (Clontech)	(Riedl <i>et al.</i> , 2008)
pmRFPRuby-N1-Lifeact	Lifeact Sequenz kloniert in pmRFPRuby-N1 (Clontech)	Rusty Lansford
pmRFPRuby-N1-Lifeact	Lifeact Sequenz kloniert in pmRFPRuby-N1 (Clontech)	Rusty Lansford
pNT51	<i>alcA(p)::lifeact::mruby; pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNT52	<i>alcA(p)::lifeact::egfp; pyr-4</i>	Diese Arbeit
pNT75	<i>alcA(p)::mEosFPthermo::KinA<sup>rigor</sup>; pyr-4</i> GFP in pCS4 ausgetauscht gegen mEosFPthermo	Diese Arbeit
pNT76	<i>uncA(p)::mEosFPthermo:: UncA<sup>rigor</sup> 1-440; pyr-4</i> GFP in pCos25 ausgetauscht gegen mEosFPthermo	Diese Arbeit
pYH27	<i>alcA(p)::gfp::tpmA; pyr-4</i>	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenzen oder Quellen
pNT67	<i>alcA(p)::mEosFPthermo::TubA; pyroA</i> Austausch des <i>teaR</i> Gens in pNT65, durch <i>tubA</i> aus pSH44	Diese Arbeit
pCS5-NZ	<i>alcA(p)::KinA<sup>rigor</sup>::mRFP; pyroA</i>	(Zekert & Fischer, 2009)
pCos25	<i>alcA(p)::sGFP::UncA1-445<sup>rigor</sup></i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2012)
pNT65	<i>alcA(p)::mEosFPthermo::TeaR; pyr-44</i>	Diese Arbeit
pSH44	<i>alcA(p)::mCherry::TubA, pyroA</i>	(Takeshita <i>et al.</i> , 2013)
pJET1.2/blunt	Klonierungsvektor	Fermentas
AAV-6P-SEW-YC3.6	Cameleon sequence cloned in AAV-6P-SEWB	(Minderer <i>et al.</i> , 2012)
AAV-6P-SEW-YC3.6	Cameleon Sequenz kloniert in AAV-6P-SEWB	(Minderer <i>et al.</i> , 2012)

#### 4.3.4 *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 Ligations Ansatz wurde zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Im Anschluss inkubierten die Zellen für 30 min auf Eis. Der Hitzeschock wurde für 50 Sek. in einem 42 °C warmen Wasserbad 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 LB-Medium mit entsprechender Antibiotikakonzentration.

**Tabelle 4.10: Lösungen für Plasmid-DNA-Präparation**

Lösung	Zusammensetzung
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym; 10 mM Tris-Cl pH 8,0; in H <sub>2</sub> O bid.
Minilysat(III)-Lösung	3 M NaAc pH 4,8; in H <sub>2</sub> O bid.

Lösung	Zusammensetzung
STET-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA; 8% (w/v) Saccharose; 5% (v/v) Triton X-100; in H <sub>2</sub> O bid.
TE RNase-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 5 µg/ml RNase A; in H <sub>2</sub> O bid.

Die Isolierung der Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Minipräparation) erfolgte durch "Lyse durch Kochen" (nach (Sambrook *et al.*, 1989)). 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 60 sec bei 13.000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 30 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt, zur Vorinkubation 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 60 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert.

Die so lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden anschließend 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und danach die Proteine mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 30 µl Minilysat(III)-Lösung und 500 µl Isopropanol für 5 min bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur in 100 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNaseA aufgenommen.

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

### 4.3.5 *A. nidulans* Protoplastentransformation

Tabelle 4.12: Medien und Medienzusätze für die Protoplastentransformation

Lösung	Zusammensetzung
Flüssig Medium	10 ml Salz Stammlösung 200 µl Microelement Stammlösung 4 g Glucose 0.2 g Uridin 0.2 g Uracil pH auf 6.5 mit 10 M NaOH einstellen auffüllen auf 200 ml autoklavieren
MMR	25 ml Salz Stammlösung 500 µl Microelement Stammlösung 10 g Glucose 171 g Sucrose pH auf 6.5 mit 10 M NaOH einstellen 7,5 g Agar auffüllen auf 500 ml autoklavieren
MMR-Top Agar	10 ml Salz Stammlösung 200 µl Microelement Stammlösung 68 g Sucrose pH auf 6.5 mit 10 M NaOH einstellen 1,2 g Agar auffüllen auf 200 ml autoklavieren

Lösung	Zusammensetzung
20 x Salt Stammlösung	120 g NaNO <sub>3</sub> 10,4 g KCl 10,4 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 30.4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1000 x Microelement Stammlösung	22 g ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 11 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 5 g MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O 5 g FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 1,6 g CoCl <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O 1,6 g CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O 1,1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O 50 g Na <sub>4</sub> EDTA pH auf 6,5-6,8 mit 10 M KOH einstellen

Tabelle 4.13: Puffer und Lösungen für die Protoplasten Transformation

Lösung	Zusammensetzung
Lösung 2 (50 ml)	14,9 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 1,8 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2M 0,7 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2M pH auf 5,5 einstellen steril filtrieren bei 4°C aufbewahren
Lösung 5 (100 ml)	10,9 g Sorbitol (0,6 M) 10 ml TrisCl 1M pH 7,5 (0,1 M) autoklavieren

Lösung	Zusammensetzung
Lösung 6 (100 ml)	18,22 g Sorbitol 1 M 1 ml TrisCl 1M pH 7,5 Autoklavieren
Lösung 7 (100 ml)	18,22 g Sorbitol (1 M) 1 ml TrisCl 1M pH 7,5 1 ml CaCl <sub>2</sub> 1M autoklavieren
Lösung 8 (50 ml)	30 g PEG4000 0,5 ml TrisCl 1M pH 7,5 0,5 ml CaCl <sub>2</sub> 1M autoklavieren

Sporen einer dicht bewachsenen Platte wurden zur Inokulation eines 500 ml Erlenmeyerkolbens mit Minimalmedium und den benötigten Vitaminen benutzt. Diese Kultur wurde 12-16 Stunden bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Das Mycel wurde durch steriles Miracloth filtriert, mit sterilem Wasser gewaschen und trocken getupft. Das Mycel wurde in 50 ml Greiner Röhrchen überführt und mit 10 ml Lösung 2 versetzt. Das Gemisch wurde gut gevortext. Es wurden 150 mg GlucanX (Novozym) hinzugegeben und für anderthalb Stunden bei 30°C und 70 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 10 ml Lösung 5 überschichtet und für 15 Minuten bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Protoplasten wurden aus der mittleren Phase mit einer sterilen Pasteur Pipette entnommen und in ein frisches 50 ml Greiner Röhrchen überführt. Das Zweifache Volumen an vorgekühlter Lösung 6 wurde zu den Protoplasten gegeben. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 4°C und 2.800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in vorgekühlter Lösung 7 resuspendiert.

In einem 15 ml Greiner Röhrchen wurden 200 µl Protoplasten mit 2-10 µg DNA gemischt. Es wurden 50 µl Lösung 8 zugegeben und das Gemisch vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde 1 ml Lösung 8 hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Diese Lösung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde mit vorgekühlter Lösung 7 auf 5 ml aufgefüllt und 10 ml MMR-Top Agar hinzugegeben. Diese Mischung wurde dann auf zur Selektion geeigneten Platten ausgebracht und 3-5 Tage bei 32°C inkubiert.

### 4.3.6 Präparation von genomischer DNA aus *A. nidulans* Stämmen

Tabelle 4.14: 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 <sub>2</sub> O lösen 11,5 ml Eisessig zugeben pH 4,2 mit konzentrierter HCl einstellen auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> 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 Minimal Medium 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 gemörsert oder über Nacht lyophilisiert. Das fein gemörserte Myzel wurde in ein Eppendorf Gefäß mit 1-2 ml Extraktionspuffer, je nach Myzel Menge, überführt, gut gevortext und 1,5 h bei 68 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dem fünfminütigen Abzentrifugieren bei 13.000 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und 60 µl pro ml Extraktionspuffer einer 8M Kalium-Acetat-Lösung zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert, um die Proteine zu fällen. Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Das gleiche Volumen an Isopropanol wurde zur Fällung der gDNA 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 RNase (20 mM) Puffer für circa 20 Minuten bei 68 °C und 800 rpm gelöst.

### 4.3.7 Southern Blot

Tabelle 4.15: 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)

Lösung	Zusammensetzung für 1l Lösung
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-Citrat*2H <sub>2</sub> O (0,3 M) pH 7,0
Southern Hybridisierungspuffer	500 ml 1M Na-Phosphat Puffer (0,5 M); pH 7,0 70 g SDS (7 %) autoklavieren
1M Natriumphosphat Puffer	Lösung 1: 177,99 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (1M) bei allen überprüfen  Lösung 2: 156,01 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O (227 mM) 7,4 g/l Na <sub>2</sub> -EDTA*2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> 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 wurde 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 Renaturierungs-Lösung für 20 min auf einem Schüttler gewaschen. Der Blot wurde aufgebaut und über Nacht wurde die DNA auf eine Nylonmembran geblottet. Um nach dem Abbau des Blots 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 Hybridisierungsofen 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 mit 15 ml Southern Hybridisierungspuffer und 30 µl DIG-markierter Sonde für 16 h bei 65 °C. Die Sonde wurde bei – 20 °C gelagert und konnte bei Bedarf 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 (Roche) inkubiert. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit Hilfe des Chemi-Smart Chemilumineszenzsystems (Peglabor) um die Signale zu detektieren.

#### **4.3.8 Isolierung von RNA aus *A. nidulans* Stämmen und Quantitative Real-time PCR**

Für die RNA Isolierung wurde von jedem Stamm Sporen in einer Petrischale mit entsprechendem Medium inokuliert 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 der GFP-TpmA exprimierenden Stämme wurden die Stämme über Nacht in Flüssigmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle bei 37 °C statisch inkubiert. Für Lifeact-GFP wurde der Stamm jeweils über Nacht in Flüssigmedium mit 2% Glucose bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Das Mycel wurde anschließend durch zwei Lagen Miracloth filtriert und mit Seradest Wasser gewaschen. Die Induktion erfolgte für drei Stunden bei 30°C und 180 rpm in Minimalmedium mit 2% Glycerin, 2% Threonin, 2% Threonin plus 0,1% Dextrose oder 2% Threonin und 0,01% Dextrose als Kohlenstoffquelle.

Die RNA Isolation wurde für alle Myzelien gleich durchgeführt. Dazu wurde das Myzel in flüssigem Stickstoff gemörsert und das feine Pulver in 500 µl RB-Puffer aus dem E.Z.N.A Fungal RNA Mini Kit (OMEGA bio-tek, Norcross, USA) gegeben und gut gevortext. Das Gemisch wurde 5 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß mit einer grünen Säule aus dem Kit transferiert und bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, mit 250 µl 100 % Ethanol versehen und vortext. Die Lösung wurde auf eine orangene Säule überführt, bei 10.000 rpm für 30 s abzentrifugiert. Auf die Säule wurden 500 µl Wasch-Puffer I gegeben und erneut wie zuvor zentrifugiert. Im Anschluss wurden zwei Waschschrte mit Wasch-Puffer II (700 bzw. 500 µl) durchgeführt. Anschließend wurde die Säule leer für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, um eventuelle Pufferreste zu entfernen. Danach wurde die Säule auf ein frisches Eppendorf Gefäß transferiert. 50 µl RNase-freies Wasser wurde direkt auf die Membran der Säule pipettiert und zum Eluieren der RNA für 1 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Von dem Eluat wurden 5 µl für eine spätere Auftrennung in einem Agarosegel entnommen.

Um die noch vorhandene genomische DNA aus der RNA-Lösung zu entfernen wurde das Eluat mit dem Ambion Turbo DNA Free Kit (Invitrogen) verdaut. Als Gesamtvolumen wurden 50 µl verwendet. 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 5 µl DNase Inaktivierungslösung gut gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die Lösung ab und zu gemischt und bei 10.000 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 0,8%-iges Agarosegel geladen, welches mit DEPC-H<sub>2</sub>O-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 wurde 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.

## 4.4 Mikroskopische Methoden

### 4.4.1 Epifluoreszenz Mikroskopie

Die Stämme wurden zur Mikroskopie in Minimal Medium mit entsprechenden Auxotrophie Markern über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die Hyphen wurden dabei entweder in Fluorodishes

(FD35-100, WPI, Berlin, Germany), auf Deckgläschen (18 x 18 mm, Carl Roth, Karlsruhe) oder 8 well Glasboden Kammern ( $\mu$ -Slide 8 well, ibidi GmbH, München) angezogen. Wenn das Gen, welches untersucht werden sollte, unter Kontrolle des induzierbaren *alcA* Promotors stand, wurde zur Anzucht Minimal Medium mit 2 % Glycerin (De-Repression) oder 2% Threonin (Überexpression) verwendet. Die Deckgläschen wurden mit den Hyphen nach unten auf Objektträger gelegt, mit Immersionsöl beschichtet und mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Axiophot Mikroskop mit einem Planapochromatischen 63 Fach Öl-Immersion Objektiv, einer Zeiss Axio Cam MRM und einer HBO103 Quecksilber Dampfampe oder einer Zeiss HXP120 Lampe angefertigt. Die Bilder wurden mit der AxioVision bzw. Zen Software von Zeiss aufgenommen und entweder mit dieser Software oder mit Hilfe von Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) bearbeitet.

#### 4.4.2 Fotokonversion von mEos-FPthermo

Die Bilder von mit dem fotokonvertierbaren mEos-FPthermo fusionierten TpmA wurden bei RT mit einem modifizierten inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) mit einem Wasser Immersionsobjektiv mit hoher N.A. (C-Apochromat, 63x, N.A. 1.2, Zeiss) aufgenommen. Es wurden drei *diode pumped solid-state* Laser mit den Wellenlängen 561 nm (Cobolt Jive, Cobolt, Solna, Schweden), 473 nm (LSR473-200-T00, Laser light, Berlin) und 405 nm (CLASII 405-50, Blue Sky Research, Milpitas, CA) für die Anregung und Fotoaktivierung der Fluorophore verwendet. Die Laserstrahlquellen wurden durch dichromatische Spiegel (AHF, Tübingen) gebündelt und durch einen AOTF (AOTFnC- 400.650, A-A, Opto-Electronic, Orsay Cedex, Frankreich) geführt, um die Laser Intensitäten an der Probe zu kontrollieren, bevor sie in eine Einzelfaser (OZ Optics, Ottawa, Ontario, Kanada) eingespeist wurden. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben in einer Glas Anzuchtammer über Nacht bei 28 °C angezogen. Die Fluoreszenzproteine wurden mit niedrigen Intensitäten (0 – 50 W/cm<sup>2</sup>) 405 nm Licht von ihrer grün zur rot leuchtenden Form konvertiert und simultan mit 561 nm angeregt (200 – 400 W/cm<sup>2</sup>). Nachdem sie durch einen dichromatischen Filter gelenkt wurde (z 405/473/561/635, AHF, Tübingen), wurde die Fluoreszenz Emission durch einen 607/50 Bandpassfilter (AHF,

Tübingen) gefiltert und mit einer Rückbeleuchteten EMCCD Kamera (Ixon Ultra 897, Andor, Belfast, Nordirland) typischerweise mit 50 ms Zeitauflösung, wenn nicht anders erwähnt, aufgenommen. Die Spitze der Hyphe wurde zunächst 10 s mit 405 nm Licht bestrahlt, um eine kleine Zahl an mEosFP<sub>thermo</sub> Molekülen für normale Epifluoreszenz Aufnahmen anzuregen. Danach erfolgte die Bestrahlung mit 561 nm Licht, um die roten Fluoreszenzsignale mit 200 ms Anregungszeit aufzunehmen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe von Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) bearbeitet.

#### 4.4.3 Konfokal Mikroskopie

Zur Aufnahme des Calciumsensors Cameleon wurde Konfokal Mikroskopie benutzt. Die Bilder wurden bei 21 °C mit einem Leica HCX PL APO 63x/1.20W Corr Objektiv eingebaut an einem Leica TCS SP5 (DM5000) und konventionellen PMT Detektoren (Leica, Wetzlar) gemacht. Wenn nicht anders vermerkt, wurde die Größe der Lochblende auf 1 AU eingestellt und ein 458/514 nm oder 488/561/633 Notch Filter genutzt. Die Bilder wurden mit der LAS AF v2.6 Software (Leica, Wetzlar, Germany) und Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) akquiriert und bearbeitet.

Für FRET Experimente wurde der Leica FRET Wizard genutzt. Dieser machte es möglich simultane Aufnahmen der Donor und Akzeptor Emission sowie einer Kontrolle zu machen. Der FRET Donor (CFP) wurde mit 430 nm angeregt und seine Emission mit Hilfe eines 480 nm Filters aufgenommen. Der Akzeptor wurde zur Kontrolle mit 527 nm angeregt und seine Emission mit Hilfe eines 535 nm Filters aufgenommen. Simultan wurde das FRET Signal durch Anregung des Donors mit 430 nm und die Emission des Akzeptors durch Nutzung des 535 nm Filters aufgenommen. Diese drei Bilder wurden für jeden Zeitpunkt der Zeitreihe automatisiert aufgenommen. Mit Hilfe des Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) *FRET Analyzer Plugins* wurden FRET Bilder konstruiert. Diese wurden dann zu einer Bildsequenz zusammengefügt.

#### 4.4.4 Spinning Disk Konfokal Mikroskopie

Die Stämme wurden zur Mikroskopie in Minimal Medium mit entsprechenden Auxotrophie Markern über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die Hyphen wurden dabei entweder in Fluorodishes (FD35-100, WPI, Berlin) oder 8 well Glasboden Kammern ( $\mu$ -Slide 8 well, ibidi GmbH, München) angezogen. Wenn das Gen, welches untersucht werden sollte, unter Kontrolle des induzierbaren *alcA* Promotors stand, wurde zur Anzucht Minimal Medium mit 2 % Glycerin (De-Repression) oder 2% Threonin (Überexpression) verwendet. Die Zellen wurden bei 28 °C über Nacht angezogen. Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konventionellen inversen AxioObserver Z1 Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Öl Ph3 M27 (Zeiss, Wetzlar) Objektiv, einem Zeiss Multi Laser Modul mit einem 488 Dioden Laser und einem 561nm OPSL Laser und einem CSU-X1M 5000 Spinning Disk Modul angefertigt. Die Aufnahmen wurden entweder mit einer AxioCam MRM (Zeiss, Wetzlar) oder einer Evolve 512 Kamera (Photometrics, Tucson AZ, USA) gemacht. Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Axiovision 2012 (Zeiss, Wetzlar) und Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

#### 4.4.5 Photo-Activated Light Microscopy (PALM)

PALM Bilder wurden bei Raumtemperatur mit Hilfe eines modifizierten inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss), welches mit einem hochauflösenden Wasser-Immersion Objektiv (C-Apochromat, 63x, N.A. 1,2, Zeiss) ausgestattet war, gemacht. Es wurden drei *diodepumped solid-state* Laser mit den Wellenlängen 561 nm (Cobolt Jive, Cobolt, Solna, Schweden), 473 nm (LSR473-200-T00, Laserlight, Berlin, Deutschland) und 405 nm (CLASII 405-50, Blue Sky Research, Milpitas, CA) zur Anregung und Fotoaktivierung der Fluorophore genutzt. Die Laserstrahlen wurden durch dichromatische Spiegel (AHF, Tübingen, Deutschland) gebündelt und durch einen AOTF (AOTFnC-400.650, A-A, Opto-Electronic, Orsay Cedex, Frankreich) geleitet, um die Laserintensitäten zu regulieren. Danach wurden sie in eine *single mode fibre* (OZ Optics, Ottawa, Ontario, Kanada) geleitet. Die Zellen wurden über Nacht bei 28°C in 8 well Glasboden Kammern ( $\mu$ -Slide 8 well, ibidi GmbH, München) angezogen. Die Fluorophore wurden, durch Bestrahlung mit einer niedrigen Intensität an (0 – 50 W/cm<sup>2</sup>) 405 nm Licht, von ihrer Grünen in ihre Rote Form konvertiert und durch gleichzeitige Bestrahlung mit 561 nm (200 – 400 W/cm<sup>2</sup>) angeregt. Nachdem die Fluoreszenz Emission den dichromatischen Spiegel für die Anregung (z 405/473/561/635, AHF, Tübingen, Deutschland) passiert hatte wurde sie von einem 607/50 *band-pass* Filter (AHF, Tübingen, Deutschland) gefiltert. Die

Fluoreszenz Emission wurde schlussendlich mit einer EMCCD Kamera (Ixon Ultra 897, Andor, Belfast, Nordirland) typischerweise mit 50 ms Zeitauflösung, wenn nicht anders gekennzeichnet, aufgenommen.

Alle PALM Daten wurden mit einer von der AG Nienhaus geschriebenen Analyse Software, a-livePALM, welche unter MATLAB R2010b (The Mathworks, USA) lief, analysiert. Weitere Analysen erfolgten mit und Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

#### **4.4.6 Behandlung mit Cytochalasin A**

Zur Behandlung von *A. nidulans* Hyphen mit Cytochalasin A wurde eine 10 mM Stocklösung in DMSO hergestellt. Die Hyphen wurden auf Deckgläschen mit 500 µl Minimalmedium über Nacht bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bis eine Stunde zur Akklimatisierung im Mikroskopie Raum auf die Raumtemperatur gebracht. Die Hyphen wurden vom Medium befreit und anschließend mit 250 µl einer 1 µg/ml konzentrierten Cytochalasin A Lösung in Minimalmedium benetzt. Die Inkubationszeit betrug zwischen fünf Minuten und einer Stunde. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abgetropft und die Deckgläschen umgekehrt auf Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop analysiert.

#### **4.4.7 Behandlung mit Benomyl**

Zur Behandlung von *A. nidulans* Hyphen mit Benomyl wurde eine 10 mM Stocklösung in DMSO hergestellt. Die Hyphen wurden auf Deckgläschen mit 500 µl Minimalmedium über Nacht bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bis eine Stunde zur Akklimatisierung im Mikroskopie Raum auf die Raumtemperatur gebracht. Die Hyphen wurden vom Medium befreit und anschließend mit 250 µl einer 1 µg/ml konzentrierten Benomyl Lösung in Minimalmedium benetzt. Die Inkubationszeit betrug zwischen fünf Minuten und einer Stunde. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abgetropft und die Deckgläschen umgekehrt auf Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop analysiert.

#### 4.4.8 Fixierung von *A. nidulans* Zellen für die Mikroskopie

Tabelle 4.16: Lösungen zur Fixierung von *A. nidulans* Zellen

Lösung	Zusammensetzung
Fixierungslösung	200 mM PIPES pH 6,7 500 mM EGTA pH 8,5 10 mM MgSO <sub>4</sub> DMSO 10% Formaldehyde 37%
PBS Puffer (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH auf 7,4 einstellen, auf 1 L auffüllen und autoklavieren.

Für die Fixierung zur Mikroskopie wurden die Zellen, wie normalerweise auch, über Nacht in Minimalmedium auf Deckgläschen bei 28°C oder Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden mindestens eine halbe Stunde vor der Fixierung aus dem Inkubator genommen, um Temperatur-bedingte Änderungen des Cytoskeletts zu vermeiden. Anschließend wurden die Deckgläschen mit 500 µl der Fixierungslösung benetzt und für 10-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten drei zehninütige Waschschrte in PBS Puffer. Im letzten Schritt wurde das Deckgläschen sorgfältig abgetropft und in eine frische Petrischale überführt. Die Deckgläschen wurden dann auf einen Objektträger gegeben und mit Nagellack fixiert.

#### 4.4.9 WGA-FITC Färbung

Tabelle 4.17: Lösungen für die WGA-FITC Färbung

Lösung	Zusammensetzung
1% HCl	
1x PBS Puffer	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
Verdaulösung	1% Cellulase 0,3% Pectinase 0,3% Pectolyase 0,1% BSA In 1x PBS
WGA-FITC	2,5 µg/ml WGA-FITC 0,02% Tween in 1xPBS Puffer Lagerung bei -20°C

Zur Anfärbung der Zellwände mit WGA-FITC wurden die Zellen über Nacht bei 28°C in Minimalmedium in einer Mikroskopiekammer angezogen. Die Hyphen wurden für 15 Minuten in 1x PBS versetzt mit 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie drei Mal für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte der enzymatische Verdau der Zellwand für ein bis zwei Stunden in der Verdaulösung. Daraufhin wurden die Hyphen erneut zwei Mal für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Zur Ansäuerung der Proben wurden diese für fünf Minuten in einer 1% HCl Lösung inkubiert und mit 1x PBS gespült. Die Färbung erfolgte über Nacht bei 4°C in der Färbelösung. Am darauffolgenden Tag wurde die Färbelösung durch Spülen mit 1x PBS entfernt und die Proben mikroskopiert.

## 5. Referenzen

- Abenza, J.F., A. Pantazopoulou, J.M. Rodríguez, A. Galindo & M.A. Peñalva, (2009) Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* **10**: 57-75.
- Adams, A. & J.R. Pringle, (1984) Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **98**: 934-945.
- Aizawa, H., M. Sameshima & I. Yahara, (1997) A green fluorescent protein-actin fusion protein dominantly inhibits cytokinesis, cell spreading, and locomotion in *Dictyostelium*. *Cell Struct. Funct.* **22**: 335-345.
- Akhmanova, A. & C.C. Hoogenraad, (2005) Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 47-54.
- Akhmanova, A. & M.O. Steinmetz, (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 309-322.
- Amberg, D.C., (1998) Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol. Biol. Cell* **9**: 3259-3262.
- Araujo-Bazan, L., M.A. Penalva & E.A. Espeso, (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.
- Asakura, T.S., Takuya; Nagano, Fumiko; Satoh, Ayako; Obaishi, Hiroshi; Nishioka, Hideo; Imamura, Hiroshi; Hotta, Kazuhiko; & K.N. Tanaka, Hiroyuki; Takai, Yoshimi (1998) Isolation and characterization of a novel actin filament-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* **16**: 121-130.
- Baas, P.W., T.P. Pienkowski, K.A. Cimbalnik, K. Toyama, S. Bakalis, F.J. Ahmad & K.S. Kosik, (1994) Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells. *J. Cell Sci.* **107**: 135-143.
- Baas, P.W. & L. Qiang, (2005) Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock. *Trends Cell. Biol.* **15**: 183-187.
- Bach, C.T.T., S. Creed, J. Zhong, M. Mahmassani, G. Schevzov, J. Stehn, L.N. Cowell, P. Naumanen, P. Lappalainen, P.W. Gunning & G.M. O'Neill, (2009) Tropomyosin Isoform Expression Regulates the Transition of Adhesions To Determine Cell Speed and Direction. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 1506-1514.
- Barral, Y., V. Mermall, M.S. Mooseker & M. Snyder, (2000) Compartmentalization of the Cell Cortex by Septins Is Required for Maintenance of Cell Polarity in Yeast. *Mol. Cell* **5**: 841-851.
- Bartnicki-Garcia, S., D.D. Bartnicki, G. Gierz, R. Lopez-Franco & C.E. Bracker, (1995) Evidence that Spitzenkorper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp. Mycol.* **19**: 153-159.
- Basu, R. & F. Chang, (2007) Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**: 88-94.
- Berepiki, A., (2013) Function and organisation of actin and septins in *Neurospora crassa*.
- Berepiki, A., A. Lichius & N.D. Read, (2011) Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 876-887.

- Berepiki, A., A. Lichius, J.Y. Shoji, J. Tilsner & N.D. Read, (2010) F-actin dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **9**: 547-557.
- Bertin, A., M.A. McMurray, P. Grob, S.-S. Park, G. Garcia, I. Patanwala, H.-I. Ng, T. Alber, J. Thorner & E. Nogales, (2008) *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 8274-8279.
- Bi, E., P. Maddox, D.J. Lew, E.D. Salmon, J.N. McMillan, E. Yeh & J.R. Pringle, (1998) Involvement of an Actomyosin Contractile Ring in *Saccharomyces cerevisiae* Cytokinesis. *J. Cell Biol.* **142**: 1301-1312.
- Böhmer, C., C. Ripp & M. Bölker, (2009) The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **74**: 1484-1496.
- Bowman, B.J., M. Draskovic, M. Freitag & E.J. Bowman, (2009) Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **8**: 1845-1855.
- Brand, A., K. Lee, V. Veses & N.A. Gow, (2009) Calcium homeostasis is required for contact-dependent helical and sinusoidal tip growth in *Candida albicans* hyphae. *Mol. Microbiol.* **71**: 1155-1164.
- Brent Heath, I., M. Bonham, A. Akram & G.D. Gupta, (2003) The interrelationships of actin and hyphal tip growth in the ascomycete *Geotrichum candidum*. *Fungal Genet. Biol.* **38**: 85-97.
- Brouhard, G.J., J.H. Stear, T.L. Noetzel, J. Al-Bassam, K. Kinoshita, S.C. Harrison, J. Howard & A.A. Hyman, (2008) XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132**: 79-88.
- Bryce, N.S., G. Schevzov, V. Ferguson, J.M. Percival, J.J.-C. Lin, F. Matsumura, J.R. Bamburg, P.L. Jeffrey, E.C. Hardeman, P. Gunning & R.P. Weinberger, (2003) Specification of Actin Filament Function and Molecular Composition by Tropomyosin Isoforms. *Mol. Biol. Cell* **14**: 1002-1016.
- Burkel, B.M., G. von Dassow & W.M. Bement, (2007) Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin. *Cell Motil. Cytoskeleton* **64**: 822-832.
- Buttery, S.M., S. Yoshida & D. Pellman, (2007) Yeast formins Bni1 and Bnr1 utilize different modes of cortical interaction during the assembly of actin cables. *Mol. Biol. Cell* **18**: 1826-1838.
- Cassimeris, L. & C. Spittle, (2001) Regulation of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* **210**: 163-226.
- Cavinder, B., A. Hamam, R.R. Lew & F. Trail, (2011) Mid1, a mechanosensitive calcium ion channel, affects growth, development, and ascospore discharge in the filamentous fungus *Gibberella zeae*. *Eukaryot. Cell* **10**: 832-841.
- Chang, F. & S.G. Martin, (2009) Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**: a001347.
- Chang, F. & M. Peter, (2003) Yeasts make their mark. *Nat. Cell. Biol.* **5**: 294-299.
- Chant, J., M. Mischke, E. Mitchell, I. Herskowitz & J.R. Pringle, (1995) Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *J. Cell Biol.* **129**: 767-778.
- Chen, Y.-L., A. Brand, E.L. Morrison, F.G.S. Silao, U.G. Bigol, F.F. Malbas, J.E. Nett, D.R. Andes, N.V. Solis & S.G. Filler, (2011) Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*. *Eukaryot. Cell* **10**: 803-819.

- Choi, J., K.S. Kim, H.-S. Rho & Y.-H. Lee, (2011) Differential roles of the phospholipase C genes in fungal development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **48**: 445-455.
- Choi, J., Y. Kim, S. Kim, J. Park & Y.-H. Lee, (2009) MoCRZ1, a gene encoding a calcineurin-responsive transcription factor, regulates fungal growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **46**: 243-254.
- Chung, K.-R., (2003) Involvement of calcium/calmodulin signaling in cercosporin toxin biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1187-1196.
- Clapham, D.E., (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.
- Coffman, V.C., A.H. Nile, I.-J. Lee, H. Liu & J.-Q. Wu, (2009) Roles of formin nodes and myosin motor activity in Mid1p-dependent contractile-ring assembly during fission yeast cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **20**: 5195-5210.
- Conde, C. & A. Caceres, (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**: 319-332.
- Cooper, J.A., (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* **105**: 1473-1478.
- Coulton, A.T., D.A. East, A. Galinska-Rakoczy, W. Lehman & D.P. Mulvihill, (2010) The recruitment of acetylated and unacetylated tropomyosin to distinct actin polymers permits the discrete regulation of specific myosins in fission yeast. *J. Cell Sci.* **123**: 3235-3243.
- D'Agostino, J.L. & B.L. Goode, (2005) Dissection of Arp2/3 complex actin nucleation mechanism and distinct roles for its nucleation-promoting factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **171**: 35-47.
- Das, M., T. Drake, D.J. Wiley, P. Buchwald, D. Vavylonis & F. Verde, (2012) Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth. *Science* **337**: 239-243.
- De Virgilio, C., D. DeMarini & J. Pringle, (1996) SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology* **142 ( Pt 10)**: 2897 - 2905.
- Delgado-Alvarez, D.L., S. Bartnicki-Garcia, S. Seiler & R.R. Mourino-Perez, (2014) Septum development in *Neurospora crassa*: the septal actomyosin tangle. *PLoS One* **9**: e96744.
- Delgado-Alvarez, D.L., O.A. Callejas-Negrete, N. Gomez, M. Freitag, R.W. Roberson, L.G. Smith & R.R. Mourino-Perez, (2010) Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 573-586.
- Desai, A. & T.J. Mitchison, (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 83-117.
- Desmyterl, A., T.R. Transuei, M.A. Ghahroudil, M.-H.D. Thil, F. Poortmans, R. Hamersz, S. Muyldermans & L. Wyns, (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex. *Nat. Struct. Biol.* **3**.
- Dobbelaere, J. & Y. Barral, (2004) Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science* **305**: 393-396.
- Dodd, A.N., J. Kudla & D. Sanders, (2010) The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Microbiol.* **61**: 593-620.
- Dominguez, R. & K.C. Holmes, (2011) Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* **40**: 169-186.
- Dong, Y., D. Pruyne & A. Bretscher, (2003) Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J. Cell Biol.* **161**: 1081-1092.

- Doyle, T. & D. Botstein, (1996) Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Sciences* **93**: 3886-3891.
- Drubin, D.G., K.G. Miller & D. Botstein, (1988) Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J. Cell Biol.* **107**: 2551-2561.
- Efimov, V.P., J. Zhang & X. Xiang, (2006) CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **17**: 2021-2034.
- Egan, M.J., M.A. McClintock & S.L. Reck-Peterson, (2012) Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**: 637-645.
- Engqvist-Goldstein, A.E. & D.G. Drubin, (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 287-332.
- Enke, C., N. Zekert, D. Veith, C. Schaaf, S. Konzack & R. Fischer, (2007) *Aspergillus nidulans* Dis1/XMAP215 protein AlpA localizes to spindle pole bodies and microtubule plus ends and contributes to growth directionality. *Eukaryot. Cell* **6**: 555-562.
- Era, A., M. Tominaga, K. Ebine, C. Awai, C. Saito, K. Ishizaki, K.T. Yamato, T. Kohchi, A. Nakano & T. Ueda, (2009) Application of Lifeact reveals F-actin dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1041-1048.
- Erickson, H.P. & D. Stoffler, (1996) Protofilaments and Rings, Two Conformations of the Tubulin Family Conserved from Bacterial FtsZ to  $\alpha$ -Tubulin. *J. Cell Biol.* **135**: 5-8.
- Estechea, A., L. Sánchez-Martín, A. Puig-Kröger, R.A. Bartolomé, J. Teixidó, R. Samaniego & P. Sánchez-Mateos, (2009) Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J. Cell Sci.* **122**: 3492-3501.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone & A. Bretscher, (2002) Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* **4**: 32-41.
- Fang, X., J. Luo, R. Nishihama, C. Wloka, C. Dravis, M. Travaglia, M. Iwase, E.A. Vallen & E. Bi, (2010) Biphasic targeting and cleavage furrow ingression directed by the tail of a myosin II. *J. Cell Biol.* **191**: 1333-1350.
- Fares, H., L. Goetsch & J. Pringle, (1996) Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **132**: 399 - 411.
- Fehrenbacher, K.L., I.R. Boldogh & L.A. Pon, (2003) Taking the A-train: actin-based force generators and organelle targeting. *Trends Cell Biol.* **13**: 472-477.
- Finger, F.P., T.E. Hughes & P. Novick, (1998) Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* **92**: 559-571.
- Fischer, R., N. Zekert & N. Takeshita, (2008) Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol. Microbiol.* **68**: 813-826.
- Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J.H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant & R.H. Giles, (2001) Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.* **3**: 433-438.
- Freitag, J., J. Ast & M. Bölker, (2012) Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**: 522-525.
- Fuchs, F., H. Prokisch, W. Neupert & B. Westermann, (2002) Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J. Cell Sci.* **115**: 1931-1937.

- Fuchs, U., I. Manns & G. Steinberg, (2005) Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2746-2758.
- Garcia, G., A. Bertin, Z. Li, Y. Song, M.A. McMurray, J. Thorner & E. Nogales, (2011) Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J. Cell Biol.* **195**: 993-1004.
- Gard, D.L. & M.W. Kirschner, (1987) A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* **105**: 2203-2215.
- Gladfelter, A.S., J.R. Pringle & D.J. Lew, (2001) The septin cortex at the yeast mother–bud neck. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 681-689.
- Goode, B.L. & M.J. Eck, (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 593-627.
- Grove, S.N. & C.E. Bracker, (1970) Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *J. Bacteriol.* **104**: 989.
- Gundersen, G.G., (2002) Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 296-304.
- Gunning, P.W., E.C. Hardeman, P. Lappalainen & D.P. Mulvihill, (2015) Tropomyosin–master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **128**: 2965-2974.
- Gunning, P.W., G. Schevzov, A.J. Kee & E.C. Hardeman, (2005) Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell Biol.* **15**: 333-341.
- Hallen, H.E., M. Huebner, S.-H. Shiu, U. Güldener & F. Trail, (2007) Gene expression shifts during perithecium development in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*), with particular emphasis on ion transport proteins. *Fungal Genet. Biol.* **44**: 1146-1156.
- Han, G., B. Liu, J. Zhang, W. Zuo, N.R. Morris & X. Xiang, (2001) The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr. Biol.* **11**: 719-724.
- Harispe, L., C. Portela, C. Scazzocchio, M.A. Peñalva & L. Gorfinkiel, (2008) Ras GTPase-activating protein regulation of actin cytoskeleton and hyphal polarity in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **7**: 141-153.
- Harris, S.D., (2001) Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 736-739.
- Harris, S.D., L. Hamer, K.E. Sharpless & J.E. Hamer, (1997) The *Aspergillus nidulans sepA* gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *EMBO J.* **16**: 3474-3483.
- Harris, S.D., J.L. Morrell & J.E. Hamer, (1994) Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136**: 517.
- Harris, S.D., N.D. Read, R.W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann & M. Momany, (2005) Polarisome Meets Spitzenkörper: Microscopy, Genetics, and Genomics Converge. *Eukaryot. Cell* **4**: 225-229.
- Hartwell, L., (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast: IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell. Res.* **69**: 265-276.
- Hasson, T. & M.S. Mooseker, (1995) Molecular motors, membrane movements and physiology: emerging roles for myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 587-594.
- Hawkins, T., M. Mirigian, M.S. Yasar & J.L. Ross, (2010) Mechanics of microtubules. *J. Biomechan.* **43**: 23-30.

- Hazan, I., M. Sepulveda-Becerra & H. Liu, (2002) Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **13**: 134-145.
- Heald, R. & E. Nogales, (2002) Microtubule dynamics. *J. Cell. Sci.* **115**: 3-4.
- Hernandez-Rodriguez, Y., S. Hastings & M. Momany, (2012) The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot. Cell* **11**: 311-323.
- Hernandez-Rodriguez, Y., S. Masuo, D. Johnson, R. Orlando, A. Smith, M. Couto-Rodriguez & M. Momany, (2014) Distinct septin heteropolymers co-exist during multicellular development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **9**: e92819.
- Higashitsuji, Y., S. Herrero, N. Takeshita & R. Fischer, (2009) The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **8**: 957-967.
- Hirokawa, N., (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**: 519-526.
- Hirose, K. & L.A. Amos, (2007) High-resolution structural analysis of the kinesin-microtubule complex by electron cryo-microscopy. In: *Molecular Motors*. Springer, pp. 213-230.
- Hoch, H. & R. Howard, (1980) Ultrastructure of freeze-substituted hyphae of the basidiomycete *Laetisaria arvalis*. *Protoplasma* **103**: 281-297.
- Holdaway-Clarke, T.L., J.A. Feijo, G.R. Hackett, J.G. Kunkel & P.K. Hepler, (1997) Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell* **9**: 1999-2010.
- Horio, T. & B.R. Oakley, (2005) The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 918-926.
- Horio, T., S. Uzawa, M.K. Jung, B.R. Oakley, K. Tanaka & M. Yanagida, (1991) The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J. Cell Sci.* **99**: 693-700.
- Howard, R.J., (1981) Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkorper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J. Cell Sci.* **48**: 89-103.
- Huckaba, T.M., A.C. Gay, L.F. Pantalena, H.-C. Yang & L.A. Pon, (2004) Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **167**: 519-530.
- Huisman, S.M. & M. Segal, (2005) Cortical capture of microtubules and spindle polarity in budding yeast-where's the catch? *J. Cell Sci.* **118**: 463-471.
- Hunsley, D. & G. Gooday, (1974) The structure and development of septa in *Neurospora crassa*. *Protoplasma* **82**: 125-146.
- Hwang, E., J. Kusch, Y. Barral & T.C. Huffaker, (2003) Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J. Cell Biol.* **161**: 483-488.
- Janmey, P.A., (1994) Phosphoinositides and Calcium as Regulators of Cellular Actin Assembly and Disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* **56**: 169-191.
- Johnson, M., D.A. East & D.P. Mulvihill, (2014) Formins determine the functional properties of actin filaments in yeast. *Curr. Biol.* **24**: 1525-1530.
- Joshi, H.C., M.J. Palacios, L. McNamara & D.W. Cleveland, (1992)  $\gamma$ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation.

- Justa-Schuch, D., Y. Heilig, C. Richthammer & S. Seiler, (2010) Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* **76**: 220-235.
- Kaksonen, M., Y. Sun & D.G. Drubin, (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**: 475-487.
- Kaksonen, M., C.P. Toret & D.G. Drubin, (2005) A modular design for the clathrin-and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**: 305-320.
- Kamasaki, T., R. Arai, M. Osumi & I. Mabuchi, (2005) Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat. Cell Biol.* **7**: 916-917.
- Kim, H.S., K.J. Czymmek, A. Patel, S. Modla, A. Nohe, R. Duncan, S. Gilroy & S. Kang, (2012a) Expression of the Cameleon calcium biosensor in fungi reveals distinct Ca<sup>2+</sup> signatures associated with polarized growth, development, and pathogenesis. *Fung. Genet. Biol.* **49**: 589-601.
- Kim, M.S., C.D. Froese, H. Xie & W.S. Trimble, (2012b) Uncovering principles that control septin-septin interactions. *J. Biol. Chem.* **287**: 30406-30413.
- Kim, S. & R. Flavell, (2008) Myosin I: from yeast to human. *Cell Mol. Life Sci.* **65**: 2128-2137.
- Kinoshita, M., C.M. Field, M.L. Coughlin, A.F. Straight & T.J. Mitchison, (2002) Self-and actin-templated assembly of mammalian septins. *Dev. Cell* **3**: 791-802.
- Kirk, K.E. & N.R. Morris, (1993) Either alpha-tubulin isogene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* **13**: 4465-4476.
- Konzack, S., P.E. Rischitor, C. Enke & R. Fischer, (2005) The Role of the Kinesin Motor KipA in Microtubule Organization and Polarized Growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 497-506.
- Kovar, D.R., J.R. Kuhn, A.L. Tichy & T.D. Pollard, (2003) The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J. Cell. Biol.* **161**: 875-887.
- Kovar, D.R., V. Sirotkin & M. Lord, (2011) Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **21**: 177-187.
- Kovar, D.R., J.-Q. Wu & T.D. Pollard, (2005) Profilin-mediated competition between capping protein and formin Cdc12p during cytokinesis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2313-2324.
- Kübler, E. & H. Riezman, (1993) Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J.* **12**: 2855.
- Lee, S.C., S.N. Schmidtke, L.J. Dangott & B.D. Shaw, (2008) *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryot. Cell* **7**: 1278-1288.
- Lehman, W. & R. Craig, (2008) Tropomyosin and the Steric Mechanism of Muscle Regulation. In: Tropomyosin. P. Gunning (ed). Springer New York, pp. 95-109.
- Lemieux, M.G., D. Janzen, R. Hwang, J. Roldan, I. Jarchum & D.A. Knecht, (2014) Visualization of the actin cytoskeleton: different F-actin-binding probes tell different stories. *Cytoskeleton (Hoboken)* **71**: 157-169.
- Li, R. & G.G. Gundersen, (2008) Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 860-873.
- Liakopoulos, D., J. Kusch, S. Grava, J. Vogel & Y. Barral, (2003) Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell* **112**: 561-574.

- Liang, A., F. Ruiz, K. Heckmann, C. Klotz, Y. Tollon, J. Beisson & M. Wright, (1996) Gamma-tubulin is permanently associated with basal bodies in ciliates. *Eur. J. Cell Biol.* **70**: 331-338.
- Lichius, A., A. Berepiki & N.D. Read, (2011) Form follows function - the versatile fungal cytoskeleton. *Fungal Biol.* **115**: 518-540.
- Lichius, A., M.E. Yanez-Gutierrez, N.D. Read & E. Castro-Longoria, (2012) Comparative live-cell imaging analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* reveal novel features of the filamentous fungal polarisome. *PLoS one* **7**: e30372.
- Lindsey, R., S. Cowden, Y. Hernandez-Rodriguez & M. Momany, (2010) Septins AspA and AspC are important for normal development and limit the emergence of new growth foci in the multicellular fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **9**: 155-163.
- Lippincott, J. & R. Li, (1998) Sequential Assembly of Myosin II, an IQGAP-like Protein, and Filamentous Actin to a Ring Structure Involved in Budding Yeast Cytokinesis. *J. Cell Biol.* **140**: 355-366.
- Longtine, M., D. DeMarini, M. Valencik, O. Al-Awar, H. Fares, C. De Virgilio & J. Pringle, (1996) The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 106 - 119.
- Longtine, M.S., C.L. Theesfeld, J.N. McMillan, E. Weaver, J.R. Pringle & D.J. Lew, (2000) Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **20**: 4049-4061.
- Lopez-Franco, R., S. Bartnicki-Garcia & C.E. Bracker, (1994) Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12228-12232.
- Manck, R., Y. Ishitsuka, S. Herrero, N. Takeshita, G.U. Nienhaus & R. Fischer, (2015) Genetic evidence for a microtubule-capture mechanism during polar growth of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Sci.*
- Martin, M.A., S.A. Osmani & B.R. Oakley, (1997) The role of gamma-tubulin in mitotic spindle formation and cell cycle progression in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Sci.* **110**: 623-633.
- Martin, R., D. Hellwig, Y. Schaub, J. Bauer, A. Walther & J. Wendland, (2007) Functional analysis of *Candida albicans* genes whose *Saccharomyces cerevisiae* homologues are involved in endocytosis. *Yeast* **24**: 511-522.
- Martin, S.G., W.H. McDonald, J.R. Yates & F. Chang, (2005) Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Develop. Cell* **8**: 479-491.
- May, G.S., J. Gambino, J.A. Weatherbee & N.R. Morris, (1985) Identification and functional analysis of beta-tubulin genes by site specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **101**: 712-719.
- McCartney, B.M. & I.S. Näthke, (2008) Cell regulation by the Apc protein: Apc as master regulator of epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**: 186-193.
- McGoldrick, C.A., C. Gruver & G.S. May, (1995) myoA of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J. Cell Biol.* **128**: 577-587.
- McMurray, M.A., A. Bertin, G. Garcia, L. Lam, E. Nogales & J. Thorner, (2011) Septin filament formation is essential in budding yeast. *Develop. Cell* **20**: 540-549.
- Meluh, P.B. & M.D. Rose, (1990) KAR3, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. *Cell* **60**: 1029-1041.
- Meurer-Grob, P., J. Kasparian & R.H. Wade, (2001) Microtubule structure at improved resolution. *Biochemistry* **40**: 8000-8008.

- Michelot, A. & D.G. Drubin, (2011) Building distinct actin filament networks in a common cytoplasm. *Curr. Biol.* **21**: R560-569.
- Minc, N., A. Boudaoud & F. Chang, (2009) Mechanical forces of fission yeast growth. *Curr. Biol.* **19**: 1096-1101.
- Minderer, M., W. Liu, L.T. Sumanovski, S. Kugler, F. Helmchen & D.J. Margolis, (2012) Chronic imaging of cortical sensory map dynamics using a genetically encoded calcium indicator. *J. Physiol.* **590**: 99-107.
- Mishra, M., J. Huang & M.K. Balasubramanian, (2014) The yeast actin cytoskeleton. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**: 213-227.
- Mitchison, T. & M. Kirschner, (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**: 237-242.
- Momany, M. & J.E. Hamer, (1997) Relationship of actin, microtubules, and crosswall synthesis during septation in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **38**: 373-384.
- Momany, M., J. Zhao, R. Lindsey & P. Westfall, (2001) Characterization of the *Aspergillus nidulans* septin (asp) gene family. *Genetics* **157**: 969 - 977.
- Monshausen, G.B., M.A. Messerli & S. Gilroy, (2008) Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**: 1690-1698.
- Morris, N.R., M.H. Lai & C.E. Oakley, (1979) Identification of a gene for  $\alpha$ -tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **16**: 437-442.
- Moseley, J.B. & B.L. Goode, (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 605-645.
- Moseley, J.B., I. Sagot, A.L. Manning, Y. Xu, M.J. Eck, D. Pellman & B.L. Goode, (2004) A conserved mechanism for Bni1-and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol. Biol. Cell* **15**: 896-907.
- Mostowy, S. & P. Cossart, (2012) Bacterial autophagy: restriction or promotion of bacterial replication? *Trends Cell Biol.* **22**: 283-291.
- Motegi, F., R. Arai & I. Mabuchi, (2001) Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol. Biol. Cell* **12**: 1367-1380.
- Mulholland, J., D. Preuss, A. Moon, A. Wong, D. Drubin & D. Botstein, (1994) Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **125**: 381-391.
- Muyldermans, S., T. Atarhouch, J. Saldanha, J. Barbosa & R. Hamers, (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* **7**: 1129-1135.
- Muyldermans, S., C. Cambillau & L. Wyns, (2001) Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 230-235.
- Nagai, T., S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa & A. Miyawaki, (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 10554-10559.
- Nakata, T. & N. Hirokawa, (1995) Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. *J. Cell Biol.* **131**: 1039-1053.

- Nayak, T., E. Szewczyk, C.E. Oakley, A. Osmani, L. Ukil, S.L. Murray, M.J. Hynes, S.A. Osmani & B.R. Oakley, (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566.
- Nelson, W.J., (2003) Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**: 766-774.
- Newpher, T.M. & S.K. Lemmon, (2006) Clathrin is Important for Normal Actin Dynamics and Progression of Sla2p-Containing Patches During Endocytosis in Yeast. *Traffic* **7**: 574-588.
- Newpher, T.M., R.P. Smith, V. Lemmon & S.K. Lemmon, (2005) In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev. Cell* **9**: 87-98.
- Nguyen, Q.B., N. Kadotani, S. Kasahara, Y. Tosa, S. Mayama & H. Nakayashiki, (2008) Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. *Mol. Microbiol.* **68**: 1348-1365.
- Nienhaus, K., G.U. Nienhaus, J. Wiedenmann & H. Nar, (2005) Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 9156-9159.
- Nogales, E., S.G. Wolf & K.H. Downing, (1998) Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**: 199-203.
- Oakley, B.R., (1992)  $\gamma$ -Tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol.* **2**: 1-5.
- Oakley, B.R., (2004) Tubulins in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 420-427.
- Oakley, B.R. & N.R. Morris, (1980) Nuclear movement is  $\beta$ -tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **19**: 255-262.
- Oakley, B.R., C.E. Oakley, Y. Yoon & M.K. Jung, (1990)  $\gamma$ -Tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **61**: 1289-1301.
- Oh, Y. & E. Bi, (2011) Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol.* **21**: 141-148.
- Ohkura, H., M.A. Garcia & T. Toda, (2001) Dis1/TOG universal microtubule adaptors-one MAP for all? *J. Cell. Sci.* **114**: 3805-3812.
- Okada, K., F. Bartolini, A.M. Deaconescu, J.B. Moseley, Z. Dogic, N. Grigorieff, G.G. Gundersen & B.L. Goode, (2010) Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *J. Cell Biol.* **189**: 1087-1096.
- Okada, Y. & N. Hirokawa, (1999) A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* **283**: 1152-1157.
- Okada, Y. & N. Hirokawa, (2000) Mechanism of the single-headed processivity: diffusional anchoring between the K-loop of kinesin and the C terminus of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 640-645.
- Orlando, K., X. Sun, J. Zhang, T. Lu, L. Yokomizo, P. Wang & W. Guo, (2011) Exo-endocytic trafficking and the septin-based diffusion barrier are required for the maintenance of Cdc42p polarization during budding yeast asymmetric growth. *Mol. Biol. Cell* **22**: 624-633.
- Orr, E. & R. Rosenberger, (1976) Initial characterization of *Aspergillus nidulans* mutants blocked in the nuclear replication cycle. *J. Bacteriol.* **126**: 895-902.
- Pan, F., R. Malmberg & M. Momany, (2007) Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol. Biol.* **7**: 103.

- Pantazopoulou, A. & M.A. Penalva, (2009) Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol. Biol. Cell* **20**: 4335-4347.
- Pearson, C.L., K. Xu, K.E. Sharpless & S.D. Harris, (2004) MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3658-3672.
- Pelham, R.J. & F. Chang, (2001) Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Cell Biol.* **3**: 235-244.
- Penalva, M.A., (2010) Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 684-692.
- Piel, M. & P.T. Tran, (2009) Cell shape and cell division in fission yeast. *Curr. Biol.* **19**: R823-827.
- Pohlmann, J., C. Risse, C. Seidel, T. Pohlmann, V. Jakopec, E. Walla, P. Ramrath, N. Takeshita, S. Baumann, M. Feldbrugge, R. Fischer & U. Fleig, (2014) The Vip1 inositol polyphosphate kinase family regulates polarized growth and modulates the microtubule cytoskeleton in fungi. *PLoS Genet.* **10**: e1004586.
- Pollard, T.D., (2010) Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**: 50-56.
- Pruyne, D. & A. Bretscher, (2000) Polarization of cell growth in yeast. *J. Cell Sci.* **113**: 571-585.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmund, A. Bretscher & C. Boone, (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**: 612-615.
- Pruyne, D., A. Legesse-Miller, L. Gao, Y. Dong & A. Bretscher, (2004) Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 559-591.
- Quintero-Monzon, O., A.A. Rodal, B. Strokopytov, S.C. Almo & B.L. Goode, (2005) Structural and functional dissection of the Abp1 ADFH actin-binding domain reveals versatile in vivo adapter functions. *Mol. Biol. Cell* **16**: 3128-3139.
- Raudaskoski, M., (1970) Occurrence of microtubules and microfilaments, and origin of septa in dikaryotic hyphae of *Schizophyllum commune*. *Protoplasma* **70**: 415-422.
- Read, N.D., (2006) *Environmental sensing and the filamentous fungal lifestyle*. In *Fungi and the Environment*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Requena, N., C. Alberti-Segui, E. Winzenburg, C. Horn, M. Schliwa, P. Philippsen, R. Liese & R. Fischer, (2001) Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **42**: 121-132.
- Rida, P.C., A. Nishikawa, G.Y. Won & N. Dean, (2006) Yeast-to-hyphal transition triggers formin-dependent Golgi localization to the growing tip in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **17**: 4364-4378.
- Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt & R. Wedlich-Soldner, (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**: 605-607.
- Riedl, J., K.C. Flynn, A. Raducanu, F. Gärtner, G. Beck, M. Bösl, F. Bradke, S. Massberg, A. Aszodi & M. Sixt, (2010) Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat. Methods* **7**: 168-169.
- Rincón, S.A., Y. Ye, M.A. Villar-Tajadura, B. Santos, S.G. Martin & P. Pérez, (2009) Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **20**: 4390-4399.

- Riquelme, M., E.L. Bredeweg, O. Callejas-Negrete, R.W. Roberson, S. Ludwig, A. Beltran-Aguilar, S. Seiler, P. Novick & M. Freitag, (2014) The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Mol. Biol. Cell* **25**: 1312-1326.
- Riquelme, M., R. Fischer & S. Bartnicki-Garcia, (2003) Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* **222**: 211-215.
- Riquelme, M., G. Gierz & S. Bartnicki-García, (2000) Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **146**: 1743-1752.
- Riquelme, M. & E. Sanchez-Leon, (2014) The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**: 27-33.
- Rischitor, P.E., S. Konzack & R. Fischer, (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.
- Robertson, A.S., E. Smythe & K.R. Ayscough, (2009) Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol. Life Sci.* **66**: 2049-2065.
- Rocchetti, A., C. Hawes & V. Kriechbaumer, (2014) Fluorescent labelling of the actin cytoskeleton in plants using a cameloid antibody. *Plant methods* **10**: 12.
- Rossanese, O.W., C.A. Reinke, B.J. Bevis, A.T. Hammond, I.B. Sears, J. O'Connor & B.S. Glick, (2001) A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **153**: 47-62.
- Sagot, I., A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode & D. Pellman, (2002) An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* **4**: 626-631.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) *Molecular cloning*. Cold spring harbor laboratory press New York.
- Sanchez-Leon, E., J. Verdin, M. Freitag, R.W. Roberson, S. Bartnicki-Garcia & M. Riquelme, (2011) Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryot. Cell* **10**: 683-695.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld & B. Schmid, (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**: 676-682.
- Schliwa, M., (2006) *Molecular motors*. Springer.
- Schneggenburger, R. & E. Neher, (2005) Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**: 266-274.
- Schoch, C.L., J.R. Aist, O.C. Yoder & B.G. Turgeon, (2003) A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **39**: 1-15.
- Schuster, M., S. Treitschke, S. Kilaru, J. Molloy, N.J. Harmer & G. Steinberg, (2012) Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J.* **31**: 214-227.
- Seidel, C., N. Zekert & R. Fischer, (2012) The *Aspergillus nidulans* Kinesin-3 Tail Is Necessary and Sufficient to Recognize Modified Microtubules. *PLoS ONE* **7**: e30976.
- Seiler, S., F.E. Nargang, G. Steinberg & M. Schliwa, (1997) Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* **16**: 3025-3034.
- Sellin, M.E., L. Sandblad, S. Stenmark & M. Gullberg, (2011) Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol. Biol. Cell* **22**: 3152-3164.

- Sharpless, K.E. & S.D. Harris, (2002) Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol. Biol. Cell* **13**: 469-479.
- Shaw, B.D., D.W. Chung, C.L. Wang, L.A. Quintanilla & S. Upadhyay, (2011) A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biol.* **115**: 541-546.
- Shaw, B.D. & H. Hoch, (2000) Ca<sup>2+</sup> regulation of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospore germination and appressorium formation. *Fungal Genet. Biol.* **31**: 43-53.
- Sheir-Neiss, G., M.H. Lai & N.R. Morris, (1978) Identification of a gene for  $\beta$ -tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **15**: 639-647.
- Sheir-Neiss, G., R. Nardi, M. Gealt & N. Morris, (1976) Tubulin-like protein from *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**: 285-290.
- Shepard, K., A. Gerber, A. Jambhekar, P. Takizawa, P. Brown, D. Herschlag, J. DeRisi & R. Vale, (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 11429-11434.
- Sheu, Y.-J., B. Santos, N. Fortin, C. Costigan & M. Snyder, (1998) Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* **18**: 4053-4069.
- Sirajuddin, M., M. Farkasovsky, F. Hauer, D. Kühmann, I.G. Macara, M. Weyand, H. Stark & A. Wittinghofer, (2007) Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* **449**: 311-315.
- Skoumpla, K., A.T. Coulton, W. Lehman, M.A. Geeves & D.P. Mulvihill, (2007) Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **120**: 1635-1645.
- Smertenko, A.P., M.J. Deeks & P.J. Hussey, (2010) Strategies of actin reorganisation in plant cells. *J. Cell Sci.* **123**: 3019-3028.
- Snyder, M., (1989) The SPA2 protein of yeast localizes to sites of cell growth. *J. Cell Biol.* **108**: 1419-1429.
- Snyder, M., S. Gehrung & B.D. Page, (1991) Studies concerning the temporal and genetic control of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **114**: 515-532.
- Spiliotis, E., M. Kinoshita & W. Nelson, (2005) A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science* **307**: 1781 - 1785.
- Spiliotis, E.T. & A.S. Gladfelter, (2012) Spatial guidance of cell asymmetry: septin GTPases show the way. *Traffic* **13**: 195-203.
- Spiliotis, E.T. & W.J. Nelson, (2006) Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J. Cell Sci.* **119**: 4-10.
- Srinivasan, S., M.M. Vargas & R.W. Roberson, (1996) Functional, Organizational, and Biochemical Analysis of Actin in Hyphal Tip Cells of *Allomyces macrogynus*. *Mycologia* **88**: 57-70.
- Stearns, T., L. Evans & M. Kirschner, (1991)  $\gamma$ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* **65**: 825-836.
- Steinbach, W.J., R.A. Cramer, B.Z. Perfect, Y.G. Asfaw, T.C. Sauer, L.K. Najvar, W.R. Kirkpatrick, T.F. Patterson, D.K. Benjamin & J. Heitman, (2006) Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **5**: 1091-1103.
- Steinberg, G., (2007) On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 309-316.

- Steinberg, G., (2011) Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 660-667.
- Stiebler, A.C., J. Freitag, K.O. Schink, T. Stehlik, B.A. Tillmann, J. Ast & M. Bölker, (2014) Ribosomal readthrough at a short UGA stop codon context triggers dual localization of metabolic enzymes in fungi and animals. *PLoS Genetics* **10**: e1004685.
- Stringer, M.A., R.A. Dean, T.C. Sewall & W.E. Timberlake, (1991) Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes. Dev.* **5**: 1161-1171.
- Su, L.-K., M. Burrell, D.E. Hill, J. Gyuris, R. Brent, R. Wiltshire, J. Trent, B. Vogelstein & K.W. Kinzler, (1995) APC binds to the novel protein EB1. *Cancer research* **55**: 2972-2977.
- Suelmann, R. & R. Fischer, (2000) Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**: 42-50.
- Sun, Y., A.C. Martin & D.G. Drubin, (2006) Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity. *Dev. Cell* **11**: 33-46.
- Surka, M.C., C.W. Tsang & W.S. Trimble, (2002) The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **13**: 3532-3545.
- Taheri-Talesh, N., T. Horio, L. Araujo-Bazan, X. Dou, E.A. Espeso, M.A. Penalva, S.A. Osmani & B.R. Oakley, (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19**: 1439-1449.
- Taheri-Talesh, N., Y. Xiong & B.R. Oakley, (2012) The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**: e31218.
- Takeshita, N. & R. Fischer, (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., Y. Higashitsuji, S. Konzack & R. Fischer, (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., R. Manck, N. Grun, S.H. de Vega & R. Fischer, (2014) Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**: 34-41.
- Takeshita, N., D. Mania, S. Herrero de Vega, Y. Ishitsuka, G.U. Nienhaus, M. Podolski, J. Howard & R. Fischer, (2013) The cell end marker TeaA and the microtubule polymerase AlpA contribute to microtubule guidance at the hyphal tip cortex of *Aspergillus nidulans* for polarity maintenance. *J. Cell Sci.*
- Takeshita, N., V. Wernet, M. Tsuizaki, N. Grun, H.O. Hoshi, A. Ohta, R. Fischer & H. Horiuchi, (2015) Transportation of *Aspergillus nidulans* Class III and V Chitin Synthases to the Hyphal Tips Depends on Conventional Kinesin. *PLoS One* **10**: e0125937.
- TerBush, D.R., T. Maurice, D. Roth & P. Novick, (1996) The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**: 6483.
- Terenna, C.R., T. Makushok, G. Velve-Casquillas, D. Baigl, Y. Chen, M. Bornens, A. Paoletti, M. Piel & P.T. Tran, (2008) Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape in fission yeast. *Curr. Biol.* **18**: 1748-1753.
- Tobacman, L., (2008) Cooperative Binding of Tropomyosin to Actin. In: Tropomyosin. P. Gunning (ed). Springer New York, pp. 85-94.
- Toshima, J.Y., J. Toshima, M. Kaksonen, A.C. Martin, D.S. King & D.G. Drubin, (2006) Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent  $\alpha$ -factor derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 5793-5798.

- Tran, P., L. Marsh, V. Doye, S. Inoue & F. Chang, (2001) A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J. Cell Biol.* **153**: 397-412.
- Upadhyay, S. & B.D. Shaw, (2008) The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **68**: 690-705.
- Valdez-Taubas, J. & H.R. Pelham, (2003) Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr. Biol.* **13**: 1636-1640.
- van der Honing, H.S., L.S. van Bezouwen, A.M. Emons & T. Ketelaar, (2011) High expression of Lifeact in *Arabidopsis thaliana* reduces dynamic reorganization of actin filaments but does not affect plant development. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**: 578-587.
- Veith, D., N. Scherr, V.P. Efimov & R. Fischer, (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.
- Vidali, L., C.M. Rounds, P.K. Hepler & M. Bezanilla, (2009) Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells. *PLoS One* **4**: e5744-e5744.
- Von der Ecken, J., M. Müller, W. Lehman, D.J. Manstein, P.A. Penczek & S. Raunser, (2014) Structure of the F-actin--tropomyosin complex. *Nature*.
- Waddle, J.A., T.S. Karpova, R.H. Waterston & J.A. Cooper, (1996) Movement of cortical actin patches in yeast. *J. Cell Biol.* **132**: 861-870.
- Walther, A. & J. Wendland, (2004) Apical localization of actin patches and vacuolar dynamics in *Ashbya gossypii* depend on the WASP homolog Wal1p. *J. Cell Sci.* **117**: 4947-4958.
- Walther, T.C., J.H. Brickner, P.S. Aguilar, S. Bernales, C. Pantoja & P. Walter, (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**: 998-1003.
- Waring, R.B., G.S. May & N.R. Morris, (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**: 119-130.
- Washington, R.W. & D.A. Knecht, (2008) Actin binding domains direct actin-binding proteins to different cytoskeletal locations. *BMC Cell Biol.* **9**: 10.
- Wasserman, S., (1998) FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol.* **8**: 111-115.
- Weatherbee, J.A., G.S. May, J. Gambino & N.R. Morris, (1985) Involvement of a particular species of beta-tubulin (beta 3) in conidial development in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **101**: 706-711.
- Wegner, A., (1979) Equilibrium of the actin-tropomyosin interaction. *J. Mol. Biol.* **131**: 839-853.
- Weirich, C.S., J.P. Erzberger & Y. Barral, (2008) The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 478-489.
- Wiedenmann, J. & G.U. Nienhaus, (2006) Live-cell imaging with EosFP and other photoactivatable marker proteins of the GFP family. *Expert Rev. Proteomic.* **3**: 361-374.
- Wieland, T., (1979) Amatoxine, Phallotoxine—die Gifte des Knollenblätterpilzes. *Chem. Unserer Zeit* **13**: 56-63.
- Wolkow, T.D., S.D. Harris & J.E. Hamer, (1996) Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *J. Cell Sci.* **109**: 2179-2188.
- Wollman, R. & T. Meyer, (2012) Coordinated oscillations in cortical actin and Ca<sup>2+</sup> correlate with cycles of vesicle secretion. *Nat. Cell Biol.* **14**: 1261-1269.
- Wu, J.-Q. & T.D. Pollard, (2005) Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science* **310**: 310-314.

- Xiang, X., (2006) A+ TIP for a smooth trip. *J. Cell Biol.* **172**: 651-654.
- Xiang, X. & R. Fischer, (2004) Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 411-419.
- Xiang, X. & M. Plamann, (2003) Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 628-633.
- Xie, H., M. Surka, J. Howard & W.S. Trimble, (1999) Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **43**: 52-62.
- Yamamoto, A. & Y. Hiraoka, (2003) Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *J. Cell Sci.* **116**: 4501-4512.
- Yang, H.C. & L.A. Pon, (2002) Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 751-756.
- Yang, Y., P. Cheng, G. Zhi & Y. Liu, (2001) Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY. *J. Biol. Chem.* **276**: 41064-41072.
- Yin, H., D. Pruyne, T.C. Huffaker & A. Bretscher, (2000) Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature* **406**: 1013-1015.
- Zekert, N. & R. Fischer, (2009) The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol. Biol. Cell* **20**: 673-684.
- Zhang, J., C. Kong, H. Xie, P. McPherson, S. Grinstein & W. Trimble, (1999) Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol.* **9**: 1458 - 1467.
- Zhang, J., K. Tan, X. Wu, G. Chen, J. Sun, S.L. Reck-Peterson, J.A. Hammer, 3rd & X. Xiang, (2011) *Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. *PLoS One* **6**: e28575.
- Zheng, Y., A. Bender & R.A. Cerione, (1995) Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**: 626-630.
- Zigmond, S.H., M. Evangelista, C. Boone, C. Yang, A.C. Dar, F. Sicheri, J. Forkey & M. Pring, (2003) Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr. Biol.* **13**: 1820-1823.

## 6. Anhang

### 6.1 Curriculum Vitae

#### Persönliche Daten

---

Anna Rebecca Bergs

#### Promotion

---

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 10/2012 – 12/2015 | Promotionsarbeit am Institut für angewandte Biowissenschaften (IAB), Abteilung für Mikrobiologie, KIT Karlsruhe<br>Titel: |
| 10/2012 – 12/2015 | Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am KIT Karlsruhe   |

#### Studium

---

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 09/2010 – 08/2012 | <b>Masterstudium Biologie</b><br>KIT, Karlsruhe<br>Schwerpunkte: Mikrobiologie, Molekularbiologie, Genetik<br>Thesis: Charakterisierung sekretierter Proteine in <i>Ustilago maydis</i><br>Betreuer: Prof. Dr. Jörg Kämper<br>Institut für<br>Angewandte Biowissenschaften<br>Abteilung Genetik<br>Abschlussnote: 1,3 |
|-------------------|---|

**Bachelorstudium Biologie**

KIT, Karlsruhe

Thesis: Identifikation von Zellwandproteinen in *Ustilago maydis*

09/2007 – 07/2010

Betreuer: Prof. Dr. Jörg Kämper

Institut für Angewandte Biowissenschaften

Abteilung Genetik

Abschlussnote: 1,7

**Schule**

---

21.06.2007

Abitur (Abschlussnote 1,9)

1998 – 2007

Gymnasium Englisches Institut, Heidelberg

1994-1998

Eichendorff Grundschule, Heidelberg

**Schulungen und Praktika**

---

11/2010

„Vorschriftsmäßiges Sterilisieren im Labor“, Firma SHP

08/2005

Praktikum am IPMB Heidelberg

**Konferenzen**

---

03/2014

**Poster** 12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla

11/2013

**Vortrag** IX International Fungal Biology Conference, Karlsruhe

## 6.2 Danksagungen

Als allererstes möchte ich Prof. Dr. Reinhard Fischer und Dr. Norio Takeshita danken, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit zu verfassen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Peter Nick für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern unseres Instituts für den ständigen Wissensaustausch und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Natürlich gilt ein besonderer Dank meinen Korrekturlesern: Danke Maren, Nicole, Satur und Raphael.

Auch meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für ihre ständige Unterstützung und ihre Begleitung auf dem Weg bis hier hin, und hoffentlich auch noch weiter, danken. Ein besonderer Dank gilt hierbei meinen Eltern, die mir sowohl ideell als auch finanziell immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

# Coordinated polymerization between actin cables and microtubules in polarized growth of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

Anna Bergs<sup>1</sup>, Yuji Ishitsuka<sup>2</sup>, G. Ulrich Nienhaus<sup>2,3,4</sup>, and Norio Takeshita<sup>1,5</sup> #

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Institute for Applied Bioscience, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 76187 Karlsruhe, Germany. <sup>2</sup>Institute of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 76131 Karlsruhe, Germany. <sup>3</sup>Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany. <sup>4</sup>Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois 61801, USA. <sup>5</sup>University of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences, Tsukuba, 305-8572, Japan.

# Correspondence should be addressed to N.T. (e-mail: [Norio.Takeshita@kit.edu](mailto:Norio.Takeshita@kit.edu)).

**ABSTRACT** The highly polarized growth of filamentous fungi requires a continuous supply of proteins and lipids to the hyphal tip. This transport is managed by vesicle trafficking via the actin and microtubule cytoskeletons and their associated motor proteins. Particularly, actin cables originating from the hyphal tip are essential for hyphal growth. Although specific marker proteins to visualize actin cables have been developed in filamentous fungi, the exact organization and dynamics of actin cables has remained elusive. Here we visualized actin cables using tropomyosin (TpmA) and Lifeact fused to fluorescent proteins in *Aspergillus nidulans* and studied the dynamics and regulation. Comparison of actin markers revealed that high concentrations of Lifeact reduced the actin dynamics. Simultaneous visualization of actin cables and microtubules suggests temporally and spatially coordinated polymerization and depolymerization between the two cytoskeletons. In addition, Ca<sup>2+</sup> gradient oscillation was visualized at hyphal tips using the Ca<sup>2+</sup> sensor, cameleon. The frequency of this oscillation correlated with that of actin cable disassembly and microtubules reaching hyphal tips. Our results provide new insights into the molecular mechanism of ordered polarized growth regulated by actin cables and microtubules.

**IMPORTANCE** Filamentous fungi are extremely polarized organisms, exhibiting prolific growth at their hyphal tips. The hyphal form is related to the pathogenicity in animals and plants, and the high secretion ability for biotechnology. The highly polarized growth requires a continuous supply of proteins and lipids to the hyphal tip. This transport is managed by vesicle trafficking via the actin and microtubule cytoskeletons and their associated motor proteins. Particularly, actin cables originating from the hyphal tip are essential for hyphal growth. Here we visualized actin cables in *Aspergillus nidulans* and quantified the dynamics for the first time in filamentous fungi. In addition, the regulation of actin cable formation was analysed through the interrelation with a polarity marker, microtubules, and Ca<sup>2+</sup>. Simultaneous visualization of actin cables and microtubules suggests temporally and spatially coordinated polymerization and depolymerization between the two cytoskeletons. Our results provide new insights into the molecular mechanism of ordered polarized growth regulated by actin cables and microtubules.

The actin cytoskeleton plays a central role in cell morphology of eukaryotic cells (1). Actin filaments (F-actin), which are composed of linear polymers of G-actin subunits, generate force against the plasma membrane and also act as tracks for the movement of myosin motors. The dynamic cycles of polymerization and depolymerization of G-actin and F-actin are involved in many different key cellular processes, such as cell motility, cytokinesis, secretion and the control of cell morphology (2). Filamentous fungi are highly polarized cells, which continuously elongate at the tips. There are three higher order F-actin structures with distinct functions in filamentous fungi: actin rings, patches, and cables (3). Actin rings, in cooperation with myosin II, play an essential role in septum formation (4-6). Actin patches are peripheral punctate structures that co-localize with the endocytic machinery (7, 8). The predominant localization of these patches at subapical regions suggests spatial coupling of apical exocytosis and subapical compensatory endocytosis (9), in addition to endocytic recycling of polarized material (10). Actin cables are linear bundles of short actin filaments nucleated by formins that are present at the apex of hyphae. They are generally thought to serve as tracks for myosin V dependent secretory vesicle transport to the tip (3, 4, 11), however dynamic actin cables are generally very difficult to visualize. Phalloidin conjugated to fluorescent dyes has been widely used for imaging F-actin in eukaryotic cells including fungi such as budding yeast (12), fission yeast (13) and *Ashbya gossypii* (14) but does not work in most filamentous fungi (15). The “basic” growth machinery involved in the formation of actin cables, vesicle transport and exocytosis, such as formins, the polarisome, myosin V and the exocyst complex are relatively conserved among eukaryotic cells

and localize to the apex of hyphae of filamentous fungi (16). Before membrane fusion, the secretory vesicles accumulate at the hyphal tip in a structure called “Spitzenkörper” (17, 18). The Spitzenkörper is a special structure in filamentous fungi, which determines hyphal shape and growth direction (19, 20). The exact composition and organization is still not completely understood, although the actin cytoskeleton is necessary for the organization of the Spitzenkörper (21). Continuous supply of secretory vesicles from the hyphal cell body to the hyphal tip is essential for cell wall and cell membrane extension. Besides actin cables, microtubules and their corresponding motor proteins are involved in the secretion process (22-24). Microtubules are important for the distribution of nuclei and other organelles and serve as tracks for endosomes and other vesicles, thus they are necessary for rapid hyphal growth (25). On the other hand, hyphal growth is immediately stopped if the integrity of the actin cytoskeleton is disturbed (26). The vesicle delivery to the apical plasma membrane likely depends on the cooperation of actin and microtubule-dependent motors (4, 27-29). The coordinated organization of the actin and microtubule cytoskeletons is a crucial step to establish and maintain polarity (30-32). Specific markers for actin cables, such as Lifeact and tropomyosin, were developed and used to visualize actin cables in filamentous fungi (5, 11, 33). Lifeact, which consists of 17 amino acids from the N-terminus of Abp140p in *Saccharomyces cerevisiae*, has been shown to be a marker for F-actin binding and labeling *in vitro* and in yeast cells (34). In

# Super-resolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth

Yuji Ishitsuka<sup>1</sup>, Natasha Savage<sup>2</sup>, Yiming Li<sup>1</sup>, Anna Bergs<sup>3</sup>, Nathalie Grün<sup>3</sup>, Daria Kohler<sup>1</sup>, Rebecca Donnelly<sup>2</sup>, G. Ulrich Nienhaus<sup>\*1,4,5</sup>, Reinhard Fischer<sup>\*3</sup> and Norio Takeshita<sup>\*3,6</sup>

**Polar (directional) cell growth, a key cellular mechanism shared among a wide range of species, relies on targeted insertion of new material at specific locations of the plasma membrane. How these cell polarity sites are stably maintained during massive membrane insertion has yet remained elusive. Conventional live-cell optical microscopy fails to visualize polarity site formation in the crowded cell membrane environment due to its limited resolution. Here we have employed advanced live-cell imaging techniques to directly observe localization, assembly and disassembly processes of cell polarity sites with high spatiotemporal resolution in a rapidly growing filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. We show that the membrane-associated polarity site marker TeaR is transported on microtubules along with secretory vesicles and forms a protein cluster at that point of the apical membrane where the plus end of the microtubule touches. There, a small patch of membrane is added via exocytosis, and the TeaR cluster gets quickly dispersed over the membrane. There is an incessant disassembly and reassembly of polarity sites at the growth zone, and each new polarity site locus is slightly offset from preceding ones. Based on our imaging results and computational modeling, we propose a transient polarity model that explains how cell polarity is stably maintained during highly active directional growth.**

## INTRODUCTION

Polarity maintenance is an essential mechanism observed in a wide range of cellular contexts, including epithelial cells with apical-basal polarity, neuronal differentiation from dendrites to axons, and migrating cells (1, 2). Plasma membrane polarity marker proteins play key roles in this process. For example, the Rho-family GTPase Cdc42 is a highly conserved regulator of cytoskeleton organization and cell polarity (3). In the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, cell polarization is driven by a positive feedback loop between Cdc42-stimulated actin assembly and actomyosin-based vesicular trafficking of Cdc42 (4), which results in accumulation of Cdc42 in small patches at the plasma membrane, where cell surface growth occurs (5).

A crucial, unresolved issue in cell polarity maintenance is how the membrane-associated polarity marker complex persists during cell growth while it is continuously dispersed by new material arriving at the growth site in the form of vesicles (6). Active endocytic recycling to counter membrane diffusion of Cdc42 and recruiting effector complexes of Cdc42 from the cytoplasm contributes to polarity maintenance in the budding yeast (7, 8).

Recent mathematical models of Cdc42 trafficking predict that high membrane insertion activity via exocytosis in *S. cerevisiae* (8 – 32 times faster) can practically eradicate Cdc42 polarity complexes (9). Therefore, for very fast polarized growth, additional mechanisms may be required to avoid dispersion of clusters of polarity markers by exocytosis. Filamentous fungi are among the most polarized organisms on earth, exhibiting prolific growth at their hyphal tips. In fact, in *Aspergillus nidulans*, elongation is 10 – 30 times faster than bud formation in budding yeast and, thus, at a level at which the polarity complex is predicted to become disturbed by incoming vesicles (6, 7, 10). Still, filamentous fungi are able to maintain cell polarity in the presence of thousands of

<sup>1</sup>Institute of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 76131 Karlsruhe, Germany. <sup>2</sup>Department of Functional and Comparative Genomics, Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK. <sup>3</sup>Department of Microbiology, Institute for Applied Bioscience, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 76187 Karlsruhe, Germany. <sup>4</sup>Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany. <sup>5</sup>Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois 61801, USA. <sup>6</sup>University of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan. \*Correspondence should be addressed to G.U.N. (e-mail: uli@uiuc.edu), R.F. (e-mail: Reinhard.Fischer@kit.edu) and N.T. (e-mail: Norio.Takeshita@kit.edu).